Weiterentwicklung und Anwendung der sFIDA-Technologie für den quantitativen Nachweis von Proteinaggregaten zur Diagnose von Proteinfehlfaltungserkrankungen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Marlene Maximiliane Pils
aus Freudenstadt

Düsseldorf, Oktober 2023

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. Jun.-Prof. Dr. Wolfgang Hoyer

3. Prof. Dr. Peter Bayer

Tag der mündlichen Prüfung:

26.03.2024

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Ferner erkläre ich, dass ich in keinem anderen Dissertationsverfahren mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen.

Düsseldorf, den 18.10.2023



Marlene Maximiliane Pils

Vorwort

In der vorliegenden Arbeit wurden einzelne Abbildungen mit der wissenschaftlichen Bild- und Illustrationssoftware BioRender.com oder MS Office unter Einhaltung von akademischen Lizenzbedingungen erstellt bzw. modifiziert. Betroffene Abbildungen sind durch den Vermerk „erstellt mit BioRender.com“ bzw. „erstellt mit MS Office“ kenntlich gemacht.

Aus Gründen des ungestörten Leseflusses wird in der vorliegenden Arbeit die Sprachform des generischen Maskulinums angewandt. Es wird an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die verwendete Schreibweise in allen Fällen geschlechtsunabhängig zu verstehen ist.

Kurzzusammenfassung

Proteinfehlfaltungserkrankungen einschließlich *Morbus Alzheimer*, *Morbus Parkinson* sowie eine Subgruppe chronisch mentaler Erkrankungen zeichnen sich durch die Aggregation und Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen beispielsweise des Aβ-Peptids, Tau-, α-Synuclein- und DISC1-Proteins aus. Insbesondere die während der Aggregation gebildeten Protein-oligomere scheinen die wichtigste toxische Spezies zu sein. Folglich stellen sie einen vielversprechenden Biomarker-Kandidaten sowohl für die Diagnostik als auch für die Medikamentenentwicklung dar. Die Detektion und Quantifizierung von Proteinoligomeren aus menschlichem Gewebe oder Körperflüssigkeiten ist aufgrund der geringen Konzentration, Heterogenität und Stabilität herausfordernd, was die Entwicklung einschließlich Verifizierung und Validierung hochsensitiver und spezifischer diagnostischer Verfahren fordert. Die oberflächenbasierte Fluoreszenzintensitätsverteilungsanalyse (englisch: *surface-based fluorescence intensity distribution analysis*, sFIDA) ist eine Plattformtechnologie, welche die Quantifizierung und Größenbestimmung einzelner Proteinaggregate ermöglicht, indem die Spezifität eines Immunoassays mit der Sensitivität hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie kombiniert wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Verifizierungsplan zu etablieren und mit dessen Hilfe unterschiedliche sFIDA-Assays für den Nachweis amyloider Proteinaggregate zu entwickeln. Hierzu wurde eingangs anhand von synthetischen Aβ-Aggregaten und Aβ-konjugierten Silikananopartikeln demonstriert, dass innerhalb der Verifizierung durch Eruierung der Coating-Parameter, Optimierung der Blockadelösung und des Proben- oder Detektions-sondenpuffers sowie Wahl und Titration der Assay-Antikörper die analytische Sensitivität und Spezifität des Assays gesteigert werden konnte. Durch Implementierung einer Oligomer-basierten internen Qualitätskontrollprobe wurde die Standardisierung und Routineanwendung der sFIDA-Technologie für den Nachweis von Aβ-Aggregaten erhöht. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Detektion und Quantifizierung von Proteinaggregaten bestehend aus Aβ, Tau, α-Synuclein oder DISC1 mittels den entwickelten sFIDA-Assays bis zu femtomolaren Nachweisgrenzen in Liquorproben möglich war. Ein weiterer wichtiger Teil der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Validierung weniger bzw. nicht-invasiver Methoden, welche nun die Quantifizierung von Proteinaggregaten in komplexeren Matrices wie Plasma oder Stuhl mittels sFIDA gewährleisten. Darüber hinaus wurde die Anwendbarkeit der sFIDA-Technologie im Bereich der präklinischen Arzneimittelentwicklung zur Untersuchung des Wirkmechanismus oder des *ex-vivo* Target-Engagement in zwei Studien bestätigt.

Zusammenfassend dienen diese Ergebnisse als Grundlage für weitere Entwicklungsarbeiten und zukünftige Studien, welche die analytische und klinische Leistung der sFIDA-Technologie bewerten und so den Übergang aus der Forschung in das regulierte Umfeld der *in-vitro*-Diagnostika ermöglichen.

Abstract

Protein misfolding diseases including Alzheimer's disease, Parkinson's disease as well as a subset of chronic mental diseases are characterized by aggregation and accumulation of misfolded proteins e.g. Aβ peptide, tau, α-synuclein and DISC1 protein. Especially the small and soluble protein oligomers formed during aggregation are considered the most toxic species. Consequently, oligomers represent a promising biomarker candidate for both diagnostics and drug development, respectively. Detection and quantification of such protein oligomers in human tissues or body fluids is still challenging due to their low concentration, heterogeneity, and stability. Hence, the development of highly sensitive and specific diagnostic methods is required including assay verification and validation. The surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) is a platform technology that enables quantification and sizing of single protein aggregates by combining the specificity of an immunoassay with the sensitivity of high-resolution fluorescence microscopy.

The aim of the present work was to establish a verification protocol and apply it to develop different sFIDA assays for the detection and quantification of amyloid protein aggregates. Using synthetic Aβ-aggregates and Aβ-coated silica nanoparticles, it was shown that within assay verification the analytical sensitivity and specificity was increased by determination of coating parameters, optimization of buffer compositions of blocking, sample, or detection buffers as well as choice and titration of assay antibodies. By implementing an oligomer-based internal quality control sample, the standardization and routine application of the sFIDA technology for the detection of Aβ-aggregates could also be improved. Furthermore, it was shown that the detection and quantification of protein aggregates in human CSF samples consisting of Aβ, tau, α-synuclein, or DISC1 was possible down to low-femtomolar detection limits using the developed sFIDA assays. Another important part of the present work was the development and validation of less or non-invasive methods that now ensure the sensitive detection and accurate quantification of protein aggregates in more complex matrices such as plasma or stool using sFIDA. In addition, the applicability of sFIDA technology in the field of preclinical drug development to study the mechanism of action or *ex vivo* target engagement has been confirmed in two different studies.

In conclusion, these results of the present work provide a fundamental step for future assay developmental work and diagnostic studies evaluating the analytical as well as clinical performance of sFIDA technology, enabling the transition from research to the regulated environment of *in-vitro* diagnostics.

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure (*amino acid*)
Aβ	Amyloid β-Peptid
AD	*Morbus Alzheimer* (*Alzheimer's disease*)
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Vorläuferprotein (*amyloid percursor protein*)
APTES	3-Aminopropylsilan
BSA	Bovines Serumalbumin
CDx	Therapiebegleitendes Diagnostikum
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonat
CLSI	*Clinical and laboratory standards institute*
CMD	Carboxymethyldextran
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CV%	Varianzkoeffizient (*coefficient of variation*)
DELCODE	*DZNE-longitudinal cognitive impairment and dementia study*
DISC1	*Disrupted-in-Schizophrenia 1*
DMF	N,N-Dimethylformamid
DSM-IV	*Diagnostic and statistical manual of mental diseases*, vierte Revision
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOL	Markierungsgrad (*degree of labelling*)
DZNE	Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
Na_2EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
EOAD	*early-onset Alzheimer's disease*
ESPRIT	*Expression of soluble proteins by random incremental truncation*
EtOH	Ethanol
EXP	Experiment
FDA	*Food and drug administration*
FDG-PET	[^{18}F] Fluorodeoxyglukose Positronen-Emissions-Tomographie
FEP	Patienten mit einer ersten psychotischen Episode (*first-episode psychosis*)
FLOSS	fluoreszenzmarkierte Oberflächenspezies (*fluorescence labeling of surface species*)
HAMA	humaner anti-Maus-Antikörper (*human anti-mouse antibody*)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-Sulfonsäure

HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol
ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (*International statistical classification of diseases and related health proble*ms), zehnte Revision
Ig	Immunglobulin
ISF	Interstitialflüssigkeit
IVD	*in-vitro* Diagnostika
IVDR	Verordnung über *in-vitro*-Diagnostika (*in-vitro diagnostic device regulation*)
kD	Dissoziationskonstante
LLoQ	untere Quantifizierungsgrenze (*lower limit of quantification*)
LOAD	*late-onset Alzheimer's disease*
LoB	Leerwertsignal (*limit of blank*)
LoD	Detektionsgrenze (*limit of detection*)
MAPT	Mikrotubuli assoziiertes Protein Tau
MCI	milde kognitive Beeinträchtigungen (*mild cognitive impairment*)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MTBD	Mikrotubulibindungsdomäne
MTOC	Mikrotubuliorganisationszentrum (*microtubuli organization center*)
MW	Molekulargewicht (*molecular weight*)
NAC	nicht-Aβ Komponente (*non-Aβ component*)
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NDEL1	*nuclear distribution element-like protein 1*
NFT	neurofibrilläre Bündel (*neurofibrillary tangles*)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline*)
PD	*Morbus Parkinson* (*Parkinson's disease*)
PEG	Polyethylenglycol
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PHF	Gepaarte helikale Filamente (*paired helical filaments*)
PRD	Prolin-reiche Domäne
pTau	phosphoryliertes Tau-Protein
QMS	Qualitätsmanagementsystem
R	Wiederholungen (*repeats*)
REM	Schnelle Augenbewegung (*rapid eye movement*)
RT	Raumtemperatur
RT-QuIC	*Real-Time Quaking Induced Conversion*

SARS-CoV-2	Schweres akutes respiratorisches Syndrom Coronavirus Typ 2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2*)
SCD	subjektive kognitive Einschränkungen (*subjective cognitive decline*)
SF	gerade Filamente (s*traight filaments*)
sFIDA	oberflächenbasierte Fluoreszenzintensitätsverteilungsanalyse (*surface-based fluorescence intensity distribution analysis*)
SiNaP	Silikananopartikel
SNARE	*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*
SNCA	Synuclein
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,05% Tween20
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phospinhydrochlorid
TD	Technische Dokumentation
TDP-43	*Transactive response deoxyribonucleic acid binding protein 43 kDa*
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEOS	Tetraethylorthosilicat
TIRFM	interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (*total internal reflections fluorescence microscopy*)
tTau	Gesamt-Tau (*total Tau*)
Tween20	Polysorbat 20
ULoQ	obere Quantifizierungsgrenze (*upper limit of quantification*)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Schematische Darstellung der trichterförmigen Energielandschaft, die ein Protein während seiner Faltung oder Aggregation durchläuft. 2

Abbildung 2 – Schematische Darstellung der Aggregation amyloider Proteine. 4

Abbildung 3 – Schematische Darstellung der Prionen-artigen Vermehrung durch Katalyse der primären und sekundären Nukleation sowie Fragmentierung. 5

Abbildung 4 – Endoproteolytische Spaltung des humanen APP-Proteins. 10

Abbildung 5 – Klassifizierung der Demenzen auf Grundlage verschiedener Biomarker-Profile bezüglich einer Amyloid-Pathologie, Tau-Pathologie sowie Neurodegeneration. 14

Abbildung 6 – Alternatives Spleißen des MAPT-Gens resultiert in der Expression sechs verschiedener Tau-Isoformen. 15

Abbildung 7 – Bildung von neurofibrillären Bündeln durch Aggregation und Akkumulierung phosphorylierter Tau-Monomere im Falle von AD.....17

Abbildung 8 – Schematische Darstellung der α-Synuclein-Domänen. 19

Abbildung 9 – Schematische Darstellung des DISC1-Volllängenproteins. 23

Abbildung 10 – Schematische Darstellung des Prozessablaufs der sFIDA-Technologie. 32

Abbildung 11 – Voraussetzung für Totalreflexion und das Nutzen des evaneszenten Feldes für die Anregung von Fluorophoren im sFIDA. 34

Abbildung 12 – Bildparameter, Einfluss des Cut-offs auf die Anzahl zu analysierender Pixel sowie die Kalkulierung des Messsignals anhand eines dual-color TIRFM-Bildes.....35

Abbildung 13 – Konformitätsbewertungsverfahren und der damit verbundene regulatorische Aufwand unter Berücksichtigung der Produktklassifizierung. 38

Abbildung 14 – Übersicht über die drei Entwicklungsphasen eines Immunoassays sowie die damit verbundenen Untersuchungsparameter. 39

Abbildung 15 – Schematische Darstellung gängiger Methoden zur Immobilisierung von Capture-Antikörpern auf eine Assay-Oberfläche.....42

Abbildung 16 – Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Capture-Konzentration und Signalentwicklung. 46

Abbildung 17 – Technische Kontrollen zur Überprüfung der analytischen Spezifität. 51

Abbildung 18 – Überprüfung der Adsorption von Antikörpern an die Glasoberfläche mittels FLOSS-Experiment. 71

Abbildung 19 – Überprüfung der Immobilisierung und der Stabilität von Antikörpermolekülen auf der Glasoberfläche mittels FLOSS-Experiment. 73

Abbildung 20 – Einfluss der Immobilisierungstechnik auf die sFIDA Readouts von (A) Aβ1-15 SiNaPs und (B) synthetischen Aβ1-42 Aggregaten. 76

Abbildung 21 – Einfluss verschiedener Puffersysteme auf das Signal-Rausch-Verhältnis der (A) Aβ1-15 SiNaPs und der (B) synthetischen Aβ1-42 Aggregate. 78

Abbildung 22 – Zusammenhang zwischen sFIDA Readouts von (A) 10,26 pM Aβ1-15 SiNaPs und (B) 10 nM synthetischen Aβ1-42 Aggregaten in Abhängigkeit von der eingesetzten Capture-Konzentration. 80

Abbildung 23 – Gegenüberstellung der Coating-Varianten mit 2,5 µg/mL (dunkelrot) und 5,0 µg/mL (grau, Referenz) Nab228 als Capture-Antikörper basierend auf dem Signal-Rausch-Verhältnis von (A) Aβ1-15 SiNaPs und (B) synthetischen Aβ1-42 Aggregaten. 81

Abbildung 24 – Einfluss der verwendeten BSA-Konzentration auf das Signal-Rausch-Verhältnis von (A) Aβ1-15 SiNaPs und (B) synthetischen Aβ1-42 Aggregaten. 83

Abbildung 25 – Einfluss von Additiven im Probenpuffer auf das Signal-Rausch-Verhältnis von (A) Aβ1-15 SiNaPs und (B) synthetischen Aβ1-42 Aggregaten. 85

Abbildung 26 – Einfluss von Additiven im Probenpuffer auf das Messsignal von Aβ1-15 SiNaPs und synthetischen Aβ1-42 Aggregaten. 86

Abbildung 27 – Einfluss der verwendeten Kombination an Detektionssonden auf das Messsignal der Aβ1-15 SiNaPs und der synthetischen Aβ1-42 Aggregate. 87

Abbildung 28 – Einfluss der Detektionssonden auf das Signal-Rausch-Verhältnis von (A) Aβ1-15 SiNaPs und (B) synthetischen Aβ1-42 Aggregaten. 88

Abbildung 29 – Schematische Darstellung der möglichen Immobilisierung und Randomisierung von Capture-Antikörpern auf der Assay-Oberfläche. 89

Abbildung 30 – Vergleich des CF633-Farbstoffs und des AF647-Farbstoffs bezüglich der Photostabilität. 97

Abbildung 31 – Anwendung unterschiedlicher Immobilisierungstechniken für die Beschichtung der sFIDA-Oberfläche mit Capture-Antikörpern. 246

Abbildung 32 – Schematische Darstellung der sFIDA-Oberfläche bei gleichzeitiger Anwesenheit von Matrixeffekten, die aufgrund ihrer molekularen Ursache entweder falsch-positive oder falsch-negative Messsignale erzeugen. 251

Abbildung 33 – Theoretische Wirkungsweise des Wirkstoffkandidaten RD2.....280

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Technische Herausforderungen innerhalb der Entwicklung eines Assays zur Quantifizierung von Proteinoligomeren. 30

Tabelle 2 – Empfohlene Startkonzentrationen der Assay-Antikörper für Titrationsexperimente. 45

Tabelle 3 – Verwendete Antikörper und verwendetes Sondenprotein. 54

Tabelle 4 – Verwendete Softwareprogramme. 55

Tabelle 5 – Übersicht über getestete Coating-Puffer. 63

Tabelle 6 – Verwendete Konzentrationen an Capture-Antikörper in Anlehnung an die verwendeten Konzentrationen im EXP1b. 64

Tabelle 7 – Übersicht über die getesteten Blockadelösungen. 65

Tabelle 8 – Übersicht über die getesteten Probenpuffer. 66

Tabelle 9 – Übersicht über getestete Detektionsantikörperkombinationen. 66

Tabelle 10 – Übersicht über die verwendeten Messparameter. 67

Tabelle 11 – Übersicht des hergestellten Sondenproteins, der hergestellten Detektionssonden sowie des kommerziell erworbenen 6E10 AF488 Antikörpers. 69

Tabelle 12 – Einfluss der eingesetzten Konzentration an fluoreszenzmarkiertem Nab228 CF633 Antikörper auf die mittleren Pixelintensitäten. 70

Tabelle 13 – Mittlere Pixelintensitäten von Protein G CF633 in Abhängigkeit zur eingesetzten Konzentration an Nab228 Antikörper. 74

Tabelle 14 – Einfluss der Immobilisierungstechnik sowie der Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) des Capture-Antikörpers auf das Hintergrundrauschen. 75

Tabelle 15 – Einfluss des Coating-Puffers auf das Hintergrundrauschen der jeweiligen Assay-Variante in Anbetracht des Cut-offs (0,1% basierend auf der applizierten Pufferkontrolle). ..77

Tabelle 16 – Einfluss der Capture-Konzentration auf die Signalstärken der Aβ1-15 SiNaPs (A) und der synthetischen Aβ1-42 Aggregate (B). 79

Tabelle 17 – Einfluss der BSA-Konzentration auf die Signalstärken der applizierten Pufferkontrolle in beiden Einzelkanäle sowie der Kolokalisation unter Verwendung eines einheitlichen Cut-offs bei einem Intensitätswert von 1638 Graustufen. 82

Tabelle 18 – Einfluss von Detergenz und Blocking-Agenz als Additive im Probenpuffer auf das Hintergrundrauschen der jeweiligen Assay-Variante in Anbetracht des Cut-offs (0,1% basierend auf der applizierten Pufferkontrolle). 84

Tabelle 19 – Übersicht der durchschnittlichen Varianzkoeffizienten der Aβ1-15 SiNaPs und der synthetischen Aβ1-42 Aggregate unter Verwendung der aufgeführten Probenpuffer. 85

Tabelle 20 – Einfluss der verwendeten Detektionssonden auf das Hintergrundrauschen der jeweiligen Assay-Variante in Anbetracht des Cut-offs (0,1% basierend auf der applizierten Pufferkontrolle). 87

Tabelle 21 – Gegenüberstellung der Assay-Protokolle vor (EXP1c) sowie nach (EXP6) Verifizierung. 98

Tabelle 22 – Übersicht über verwendete Detektionssonden sowie deren eingesetzte Konzentration in µg/mL in verschiedenen Studien zur simultanen Quantifizierung von unterschiedlichen Proteinaggregaten aus einer Probe.....249

Tabelle 23 – Molare Detektionsgrenzen (LoDs) als Maß für die analytische Sensitivität verschiedener sFIDA-Assays. 258

Tabelle 24 – Vergleich der prozentualen Varianzkoeffizienten (CV%) als Maß für die Intra-Assay-Varianz verschiedener sFIDA-Assays.....261

Tabelle 25 – Vergleich der prozentualen Signalreduzierung als Maß für die analytische Spezifität verschiedener sFIDA-Assays. 264

Liste der Publikationen und Patentanmeldung

Publikationen

- **Pils, M.**, Dybala, A., Rehn, F., Blömeke, L., Bujnicki, T., Kraemer-Schulien, V., Hoyer, W., Riesner, D., Willbold, D., Bannach, O. (2023). *Development and Implementation of an Internal Quality Control Sample to Standardize Oligomer-Based Diagnostics of Alzheimer's Disease.* Diagnostics*, 13*(10), 1702. https://doi.org/10.3390/diagnostics13101702.

- Blömeke L*, Rehn F*, Kraemer-Schulien V*, Kutzsche J, Pils M, Bujnicki T, Lewczuk P, Kornhuber J, Freiesleben SD, Schneider LS, Preis L, Priller J, Spruth EJ, Altenstein S, Lohse A, Schneider A, Fliessbach K, Wiltfang J, Hansen N, Rostamzadeh A, Düzel E, Glanz W, Incesoy EI, Butryn M, Buerger K, Janowitz D, Ewers M, Perneczky R, Rauchmann BS, Teipel S, Kilimann I, Goerss D, Laske C, Munk MH, Sanzenbacher C, Spottke A, Roy-Kluth N, Heneka MT, Brosseron F, Wagner M, Wolfsgruber S, Kleineidam L, Stark M, Schmid M, Jessen F, Bannach O, Willbold D, Peters O. Aβ oligomers peak in early stages of Alzheimer's disease preceding tau pathology. Alzheimers Dement (Amst). 2024 Apr 25;16(2):e12589. doi: 10.1002/dad2.12589. PMID: 38666085; PMCID: PMC11044868.

- Blömeke, L., Rehn, F., **Pils, M.**, Kraemer-Schulien, V., Cousin, A., Kutzsche, J., Bujnicki, T., Freiesleben, S.D., Schneider, L.-S., Preis, L., Cetindag, A.C., Gref, D., Cosma, N.C., Keles, D., Wang, X., Priller, J., Spruth, E.J., Altenstein, S., Schneider, A., Fliessbach, K., Wiltfang, J., Hansen, N., Rostamzahdeh, A., Düzel, E., Glanz, W., Incesoy, E. I., Buerger, K., Janowitz, D., Ewers, M., Perneczky, R., Rauchmann, B.-S., Teipel, S., Kilimann, I., Laske, C., Munk, M.H., Spottke, A., Roy, N., Heneka, M. T., Brosseron, F., Wagner, M., Roeske, S., Ramirez, A., Schmid, M., Jessen, F., Bannach, O., Peters, O., Willbold, D. *Blood-based quantification of Aβ oligomers indicates impaired clearance from brain in ApoE ε4 positive subjects*. In Revision bei Communications medicine (2023).

- **Pils, M.**, Dybala, A., Schaffrath, A., Rehn, F., Kutzsche, J., Blömeke, L., Tusche, M., Özdüzenciler, P., Bujnicki, T., Kraemer-Schulien, V., Gramespacher, H., Schmieschek, M.H.T., Barbe, M.T., Onur, O.A., Fink, G.R., Tamgüney, G., Bannach, O., Willbold, D. *Elevated Aβ aggregates in feces from Alzheimer's disease patients: a proof-of-concept study*. In Revision bei Alzheimer's Research & Therapy (2023).

- Schaffrath, A., Schleyken, S., Seger, A., Jergas, H., Özdüzenciler, P., **Pils, M.**, Blömeke, L., Cousin, A., Willbold, J., Bujnicki, T., Bannach, O., Fink, G.R., Willbold, D., Sommerauer, M., Barbe, M.T., Tamgüney, G. (2023). *Patients with isolated REM-sleep behavior disorder have elevated levels of alpha-synuclein aggregates in stool*. NPJ Parkinson's disease, *9*(1), 14. https://doi.org/10.1038/s41531-023-00458-4.

- Blömeke, L., **Pils, M.**, Kraemer-Schulien, V., Dybala, A., Schaffrath, A., Kulawik, A., Rehn, F., Cousin, A., Nischwitz, V., Willbold, J., Zack, R., Tropea, T.F., Bujnicki, T., Tamgüney, G., Weintraub, D., Irwin, D., Grossman, M., Wolk, D.A., Trojanowski, J. Q., Bannach, O., Willbold, D. (2022). *Quantitative detection of α-Synuclein and Tau oligomers and other aggregates by digital single particle counting.* NPJ Parkinson's disease, 8(1), 68. https://doi.org/10.1038/s41531-022-00330-x.

- **Pils, M.**, Rutsch, J., Eren, F., Engberg, G., Piehl, F., Cervenka, S., Sellgren, C., Troßbach, S., Willbold, D., Erhardt, S., Bannach, O., Korth, C (2023). *Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) protein aggregates in cerebrospinal fluid are elevated in first-episode psychosis patients.* Psychiatry Clin. Neurosci. https://doi.org/10.1111/pcn.13594.

- Kass, B., Schemmert, S., Zafiu, C., **Pils, M.**, Bannach, O., Kutzsche, J., Bujnicki, T., Willbold, D. (2022). *Aβ oligomer concentration in mouse and human brain and its drug-induced reduction ex vivo.* Cell reports Medicine, *3*(5), 100630. https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100630.

- Kutzsche, J.*, Schemmert, S.*, Bujnicki, T.*, Zafiu, C., Halbgebauer, S., Kraemer-Schulien, V., **Pils, M.**, Blömeke, L., Post, J., Kulawik, A., Jürgens, D., Rossberg, W., Hümpel, M., Bannach, O., Otto, M., Araujo, J., Willuweit, A., Willbold, D (2023). *Oral treatment with the all-D-peptide RD2 enhances cognition in aged beagle dogs – a model of sporadic Alzheimer's disease*. Heliyon. 9. e18443. 10.1016. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023. e18443.

* Autoren sind gleichberechtigt

Patentanmeldung

- Tamgüney G., Willbold D., **Pils M.**, Bannach O. „Bestimmung krankheitsspezifischer Protein-Aggregate in Stuhlproben“, 02.12.2021, DE102020114278A1

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung ..... **I**
Vorwort ..... **II**
Kurzzusammenfassung ..... **III**
Abstract ..... **IV**
Abkürzungsverzeichnis ..... **I**
Abbildungsverzeichnis ..... **IV**
Tabellenverzeichnis ..... **VII**
Liste der Publikationen und Patentanmeldung ..... **IX**

1 Einleitung **1**
1.1 Proteinfaltung, Proteinaggregation und Proteostase 1
1.1.1 Proteinfaltung 1
1.1.2 Amyloide Proteinaggregation 3
1.1.3 Proteostase 6
1.2 Proteinfehlfaltungserkrankungen 8
1.2.1 Pathophysiologische Folgen der Fehlfaltung 8
1.2.2 Krankheitsassoziierte amyloide Proteine 9
1.2.3 Komorbide Proteinopathien und heterogene Proteinaggregate 26
1.2.4 Behandlungskonzepte 27
1.3 Diagnosestrategien 28
1.3.1 Oligomer-basierte Diagnostik 29
1.3.2 sFIDA 31
1.3.3 Regulatorische Anforderungen an die Entwicklung von IVDs 36
2 Zielsetzung **41**
3 Nicht publizierte Daten **42**
3.1 Etablierung eines Verifizierungsplans 42
3.1.1 Theoretischer Hintergrund zu einzelnen Festphasenparametern 42
3.1.2 Kenngrößen zur Leistungsbewertung 48
3.1.3 Tabellarischer Verifizierungsplan 52
3.2 Anwendung des Verifizierungsplans 53
3.2.1 Material 53
3.2.2 Methoden 55
3.2.3 Ergebnisse 68
3.2.4 Diskussion 89

4 Publizierte Daten 99

4.1 Aβ-Oligomer-basierte interne Qualitätskontrollprobe 100
4.2 Quantifizierung von Aβ-Oligomeren in humanen Liquorproben 116
4.3 Quantifizierung von Aβ-Oligomeren in humanen Plasmaproben 129
4.4 Quantifizierung von fäkalen Aβ-Aggregaten 149
4.5 Quantifizierung von fäkalen α-Synuclein-Aggregaten 171
4.6 Quantifizierung von α-Synuclein- und Tau-Aggregaten in humanen Liquorproben 183
4.7 Quantifizierung von DISC1 Aggregaten in humanen Liquorproben 197
4.8 *Ex-vivo* Target Engagement 205
4.9 Quantifizierung von Aβ- und Tau-Aggregaten in caninen Liquorproben 227

5 Zusammenfassung und Diskussion 242

5.1 Standardisierung der sFIDA-Festphasenentwicklung 243

5.1.1 Weiterentwicklung des SiNaPs-Kalibrationsstandards 243
5.1.2 Implementierung Oligomer-basierter interner Qualitätskontrollproben 245
5.1.3 Anwendung der Physisorption als Immobilisierungstechnik 246
5.1.4 Einfluss der Analyten und der Assay-Antikörper auf Festphasenparameter 247

5.2 Prozessentwicklung 250

5.2.1 Eruierung und Reduzierung von Matrixeffekten 250
5.2.2 Einfluss der Präanalytik auf die Probenstabilität 253
5.2.3 Zusammenhang zwischen Präanalytik und Assay-Robustheit 255

5.3 Bewertung der analytischen Leistung 257

5.3.1 Analytische Sensitivität 257
5.3.2 Analytische Spezifität 260

5.4 Bewertung der klinischen Leistung 268

5.4.1 Aβ-Oligomere als diagnostischer Biomarker für AD 269
5.4.1 Tau-Oligomere als diagnostischer Biomarker für Tauopathien 275
5.4.2 α-Synuclein-Oligomere als diagnostischer Biomarker für α-Synucleinopathien 276
5.4.3 Quantifizierung von DISC1-Oligomeren – Erster Schritt in Richtung einer Biomarker-basierten Diagnostik von chronisch mentalen Krankheiten 278
5.4.4 Anwendung der sFIDA-Technologie innerhalb der präklinischen Medikamentenentwicklung 280

6 Fazit 282
Literaturverzeichnis 285
Danksagung 302
Anhang 303

1 Einleitung

1.1 Proteinfaltung, Proteinaggregation und Proteostase

Proteine sind maßgeblich für den Zellaufbau sowie für die biologische Aktivität des menschlichen Organismus verantwortlich und können anhand ihrer Funktion beispielsweise in Enzyme, Hormone, Struktur-, Rezeptor-, Membran-, Transport- und Speicherproteine sowie Bestandteile des Immunsystems differenziert werden [1-3]. Im Zuge der Proteinbiosynthese werden Proteine basierend auf ihrer in der Desoxyribonukleinsäure kodierten genetischen Information synthetisiert. Hierzu wird der codogene Einzelstrang des Gens von der Ribonukleinsäuren-Polymerase II ausgelesen und in die sogenannte Boten-Ribonukleinsäure transkribiert, welche anschließend prozessiert und aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert wird. Dort wird diese von der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit umschlossen und mittels Transfer-Ribonukleinsäuremolekülen in ein aus Aminosäuren (englisch: *amino acid*, aa) bestehendes kettenförmiges Polymer translatiert [1, 3]. Die Klassifizierung des synthetisierten Makromoleküls erfolgt anhand der Länge der Aminosäurekette, wobei ein Polymer bestehend aus weniger als einhundert einzelnen Bausteinen als Peptid und aus mehr als einhundert Bausteinen als Protein bezeichnet wird [1, 3]. Peptide als auch Proteine werden häufig posttranslational modifiziert, bevor sie durch Faltungsprozesse in ihre durch die Aminosäuresequenz definierte, native dreidimensionale Konformation überführt werden. Sowohl eine fehlerfreie Synthese als auch eine korrekte Faltung sind essenziell für deren volle Funktionsfähigkeit und Aktivität [2, 4].

1.1.1 Proteinfaltung

Während der Proteinfaltung wird die Primärstruktur, die unstrukturierte, nicht funktionelle lineare Aminosäurekette eines Peptids oder Proteins in ihre biologisch aktive und funktionelle Konformation überführt. Zu Beginn des Faltungsprozesses bilden Carbonyl- und Aminogruppen des Rückgrats intramolekulare Wechselwirkungen in Form von Wasserstoffbrückenbindungen aus, sodass sich Teile der Aminosäurekette als Sekundärstruktur beispielsweise als rechtsgängige α-Helix, parallele bzw. anti-parallele β-Faltblätter oder als undefinierte Sekundärstruktur (Random Coil) anordnen [1, 3]. Durch anschließende Ausbildung weiterer intramolekularer Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten wie Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen, Disulfidbrücken und Van-der-Waals-Wechselwirkungen, faltet sich die Aminosäurekette in ihre tertiäre Konformation. Diese wird als nativ bezeichnet und ist meist thermodynamisch die stabilste Form [3-5]. Je nach Peptid bzw. Protein kann der Grad der Strukturierung der nativen Form variieren, wodurch neben der zuvor beschriebenen geordneten (vollständig gefalteten) Konformation

auch intrinsisch ungeordnete oder auch partiell geordnete Konformationen beschrieben werden [6, 7]. Durch nicht-kovalente Assemblierung mehrerer identischer oder nicht-identischer tertiärer Strukturen entsteht die nächsthöhere funktionelle Organisationseinheit von Proteinen, die sogenannte Quartärstruktur [1].

Während der Proteinfaltung durchläuft die noch ungeordnete, monomere Aminosäurekette verschiedene thermodynamische Prozesse, bis sie innerhalb von Mikro- oder Millisekunden ihre native und unter physiologischen Bedingungen thermodynamisch stabilste Konformation einnimmt [4]. Dabei strebt die Aminosäurekette die Reduzierung der zum Wasser hin exponierten hydrophoben Seitenketten an, um eine Stabilisierung und eine dichte Packung im Molekülinneren zu erzielen (hydrophober Effekt) [4, 5, 8, 9].

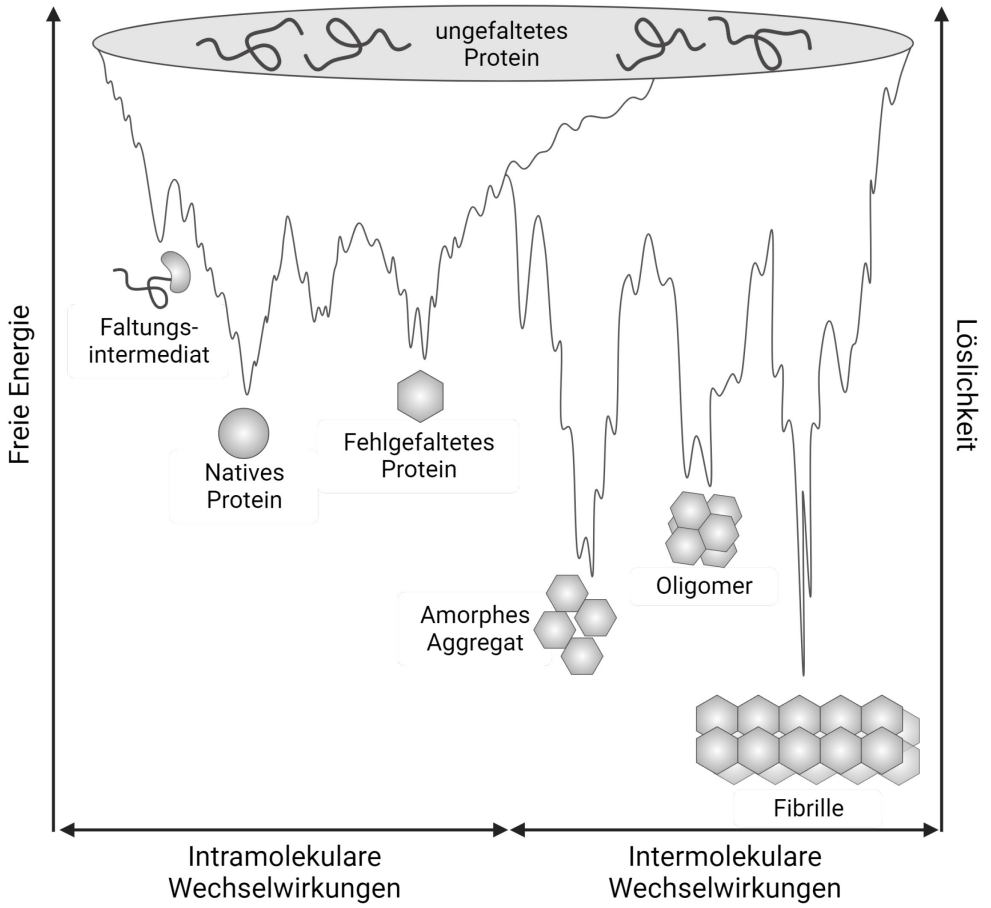


Abbildung 1 – Schematische Darstellung der trichterförmigen Energielandschaft, die ein Protein während seiner Faltung oder Aggregation durchläuft. Die ungeordnete Aminosäurekette ist hoch flexibel und hydratisiert. Sobald sie sich aufgrund von intramolekularen Wechselwirkungen zu falten beginnt, nehmen sowohl die freie Energie als auch der Hydratisierungsgrad ab. Unter physiologischen Umgebungsbedingungen durchläuft die Aminosäurekette einige geordnete Zwischenstufen, welche als Faltungsintermediate bezeichnet werden. Unter ungünstigen Bedingungen wie beispielsweise Denaturierung, niedriger pH-Wert, hohe Temperaturen oder der Austausch einer Aminosäure hervorgerufen durch Mutation oder fehlerhafte Proteinbiosynthese, können Faltungsintermediate fehlfalten. Durch anschließende Ausbildung intermolekularer Wechselwirkungen entstehen Proteinaggregate, darunter amorphe Aggregate, Oligomere oder Fibrillen, welche im Allgemeinen weniger hydratisiert sind als die native Konformation des Proteins. Modifizierte Darstellung nach Jahn & Radford [5, 8], erstellt mit BioRender.com.

Der Faltungsprozess kann anhand einer Energielandschaft in Form eines Proteinfaltungstrichters beschrieben und visualisiert werden (siehe Abbildung 1), wobei physiologische molekulare Umgebungsbedingungen wie Temperatur und Zusammensetzung der wässrigen Lösung Voraussetzung für eine korrekte und vollständige Faltung sind. Entsprechen diese Bedingungen nicht den physiologisch günstigen Konditionen, werden Proteine fehlgefaltet und neigen zur Ausbildung intermolekularer Wechselwirkungen und somit zur Assemblierung höherstrukturierter Proteinaggregate, wobei insbesondere partiell gefaltete Strukturen prädestiniert für Aggregation sind [5, 10].

1.1.2 Amyloide Proteinaggregation

Proteine, die intrinsisch zur Aggregation neigen, werden als amyloidogene Proteine bezeichnet [11, 12]. Hierbei handelt es sich entweder um Proteine mit einer wohldefinierten nativen dreidimensionalen Struktur oder um Proteine, die partiell gefaltet bzw. gänzlich ungeordnet vorliegen. Insbesondere die partiell unstrukturierten Proteinmonomere weisen insgesamt ein höheres Aggregationspotenzial auf [5, 6, 13]. Oft sind es lediglich kurze Aminosäuresequenzen in diesen ungeordneten Regionen, welche die Fehlfaltung und die Aggregation fördern [10]. Zudem können genetische Faktoren, posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, lokal erhöhte Proteinkonzentrationen aufgrund gesteigerter Proteinsynthese oder reduzierter Proteostase (siehe 1.1.3) sowie verschiedene Umwelteinflüsse wie beispielsweise physikalischer Stress oder virale und bakterielle Infektionen ebenfalls eine Fehlfaltung begünstigen [2, 11, 14].

Im Zuge der aberranten Assemblierung (siehe Abbildung 2) werden aus den fehlgefalteten Proteinmonomeren, Dimere und anschließend stabile Oligomere gebildet (Nukleation). Letztere weisen eine hohe Heterogenität auf und können anhand von Form, Größe und unterschiedlichen Anteilen an Cross-β-Struktur beispielsweise in ringförmige, globuläre oder amorphe Strukturen differenziert werden [11, 13, 15]. Die Cross-β-Struktur ist unabhängig vom jeweiligen Proteinmonomer in allen höhergeordneten amyloiden Spezies zu finden [15, 16]. Elektronenmikroskopische sowie rasterkraftmikroskopische Studien haben gezeigt, dass beispielsweise Amyloidfibrillen aus mehreren 0,1 - 10 µm langen und unverzweigte Protofilamenten bestehen und einen Durchmesser von wenigen Nanometern (70 - 120 Å) aufweisen [8, 13, 14]. Die einzelnen Protofilamente weisen einen Durchmesser von 25 - 30 Å auf und verlaufen senkrecht zur Fibrillenachse und parallel meistens verdreht zueinander. Aufgrund dieser strukturellen Anordnung entsteht ein charakteristisches Beugungsmuster, welches durch eine senkrechte Reflexion von 4,7 Å entlang der Fibrillenachse (Abstand zwischen β-Strängen) und durch eine äquatoriale Reflexion von etwa 10 Å senkrecht zur Faserrichtung (Abstand zwischen verschiedenen β-Faltblättern) gekennzeichnet ist [2, 8, 16]. Weitere Charakteristika von Cross-β-Strukturen ist die Doppelbrechung des polarisierten

Lichts nach einer Färbung mittels Azofarbstoff Kongorot sowie eine Fluoreszenzverschiebung nach der Färbung mit Thioflavin T oder Thioflavin S [13, 16]. Stabile Oligomere können aus zwei bis zu mehreren hundert Monomereinheiten bestehen und fungieren als lösliche Vorstufe von Amyloidfibrillen. Durch primäre Nukleation wird die schnelle Assemblierung zu löslichen Protofibrillen initiiert, die durch anschließende Rekrutierung und Anlagerung von Monomeren, Dimeren oder Oligomeren weiterwachsen (Elongation) bis letztendlich reife Amyloidfibrillen entstehen. Diese besitzen eine hohe thermodynamische Stabilität und sind im Gegensatz zu ihren Vorstufen unlöslich. Durch anschließende intra- oder extrazelluläre Anreicherung bilden die Amyloidfibrillen Einschlusskörper wie Kondensate oder Plaques, die lichtmikroskopisch detektiert werden können [17-19]. Insbesondere im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen galten ursprünglich die großen, unlöslichen Akkumulationen als zytotoxisch. Jedoch wurde in einer Vielzahl an Studien demonstriert, dass die kleineren, noch löslichen Proteinoligomere pathophysiologische Prozesse initiieren und fördern können [15, 17, 20].

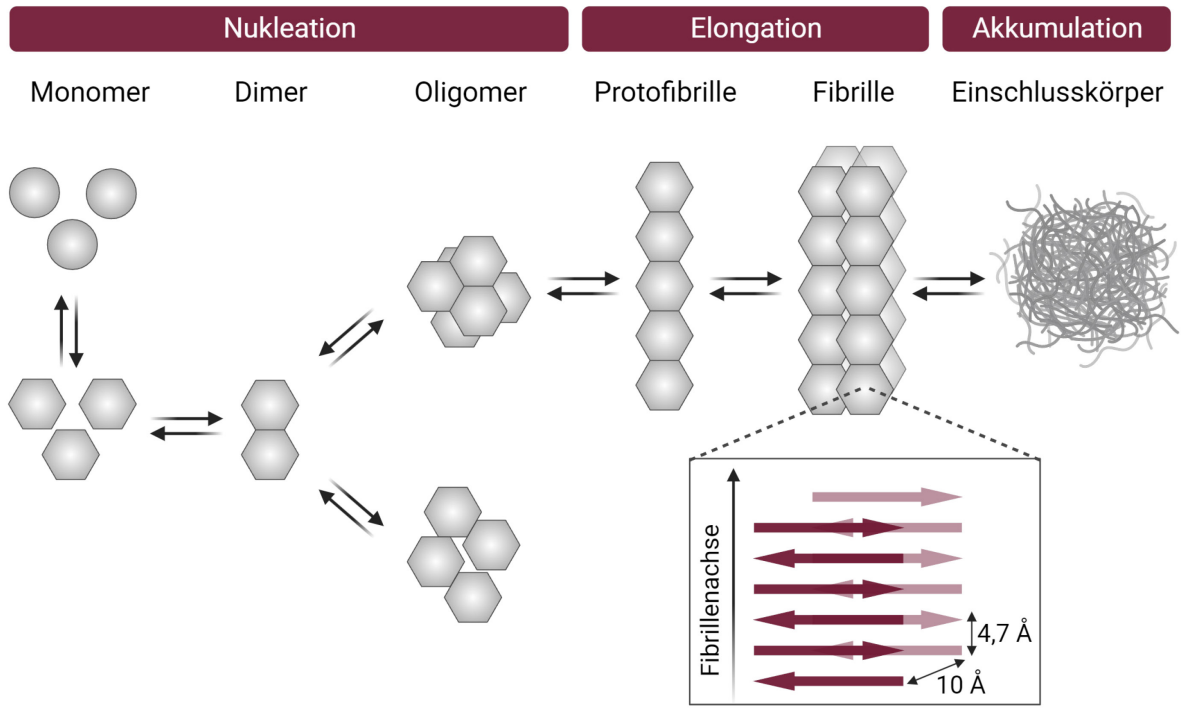


Abbildung 2 – Schematische Darstellung der Aggregation amyloider Proteine. Proteinmonomere können unter bestimmten Umständen ihre native Konformation (Kreis) verlassen und eine alternative, fehlgefaltete Konformation einnehmen (Sechseck). Anschließend entstehen aus einzelnen Monomerbausteinen Dimere und kleine, lösliche Proteinoligomere, die eine hohe Heterogenität aufweisen und entweder eine Elongation zu Protofibrillen und Amyloidfibrillen ermöglichen („On-Pathway“) oder als kleinere Oligomere verweilen („Off-Pathway“). Letztlich akkumulieren unlöslichen Amyloidfibrillen zu intra- oder extrazelluläre Einschlusskörper wie z.B. Kondensate oder Plaques. Höhergeordnete amyloide Spezies wie reife Amyloidfibrillen besitzen einen hohen Anteil an Cross-β-Struktur, welche durch die regelmäßige Anordnung von β-Strängen entlang der Fibrillenachse (Abstand zwischen den Strängen 4,7 Å) gekennzeichnet ist. Hierbei kann es sich um parallel oder anti-parallel verlaufende β-Faltblätter handeln. Diese wiederum sind mit einem Abstand von 10 Å angeordnet. Oligomere sind hochdynamisch und befinden sich sowohl mit Monomeren, Dimeren als auch mit Protofibrillen bzw. Fibrillen im Gleichgewicht. Modifizierte Darstellung nach Eisele, Jucker & Walker sowie Soto & Pritzkow [2, 17, 21], erstellt mit BioRender.com.

Amyloide Proteine oder ihre aggregierten Formen sind in der Lage, sich Prion-artig (von Prion, englisch: *proteinaceous infectious particle* [22]) zu vermehren (siehe Abbildung 3). Dabei interagieren toxische Proteine bzw. Proteinaggregate mit anderen nativen Monomeren desselben Proteins und katalysieren deren Transition sowie Aggregation zu ebenfalls toxischen Proteinspezies [10, 21, 23]. Durch sekundäre Nukleation, bei der sich fehlgefaltetes Monomer oder bereits existierende Proteinoligomere an die Oberfläche von Fibrillen anlagern, weiterwachsen und anschließend dissoziieren, können zudem weitere Aggregationskeime entstehen [18, 24]. Durch weitere Aggregation und Fragmentierung werden die Proteinaggregate exponentiell amplifiziert und führen zu einer systemisch fortschreitenden Schädigung der Zellen oder sogar zum Zelltod [21, 23, 25]. Des Weiteren können Akkumulationen einer fehlgefalteten Proteinart die Gesamtkapazität der Proteostase reduzieren, wodurch die Fehlfaltung von anderen Proteinen begünstigt wird, die sich ansonsten nicht fehlfalten würden [10].

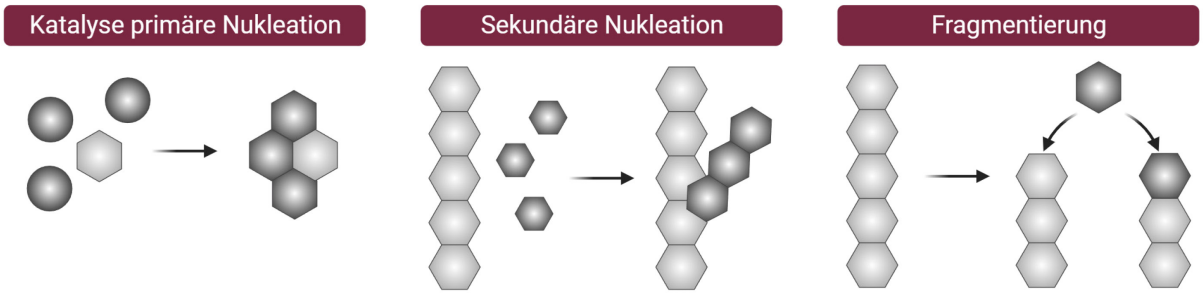


Abbildung 3 – Schematische Darstellung der Prionen-artigen Vermehrung durch Katalyse der primären und sekundären Nukleation sowie Fragmentierung. Sobald ein amyloides Protein fehlgefaltet vorliegt (hellgraues Sechseck), kann es die Fehlfaltung und Aggregation von nativen Monomeren (dunkelgraue Kreise) initiieren (primäre Nukleation). Des Weiteren ist es in der Lage, durch Rekrutierung von fehlgefalteten Monomeren (dunkelgraue Sechsecke) bzw. bereits existierenden Oligomeren zu wachsen (sekundäre Nukleation). Durch die Fragmentierung bereits erzeugter Fibrillen entstehen neue Aggregationskeime, die wiederum durch Rekrutierung von fehlgefaltetem Monomer wachsen können. Modifizierte Darstellung nach Eisele [15, 21], erstellt mit BioRender.com.

Die Mechanismen, durch die sich fehlgefaltete Proteine von einer Zelle auf eine andere sowie in benachbartes Gewebe oder in die Peripherie ausbreiten können, sind noch nicht vollständig geklärt [26, 27]. Bisher wurde die Verbreitung von Proteinaggregaten unter anderem durch intrazellulären Transport, zellvermittelten Transport beispielsweise über Mikroglia, Vesikel-basierten Transport (Endo- und Exozytose) und direkten Transport durch die Zellmembran (Rezeptoren, Nanotunnel) beobachtet. Auch die Verbreitung über Körperflüssigkeiten wie Interstitialflüssigkeit (ISF), Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) oder Blut ist möglich [10, 21, 26-28]. Zudem wurde gezeigt, dass Proteinaggregate je nach involvierter Monomerspezies oder ausgebildete Fibrillenstruktur unterschiedliche Verbreitungsmuster aufweisen [10, 26]. In der Zielzelle angekommen können Proteinaggregate durch Rekrutierung von Monomeren weiterwachsen und sich dort durch die zuvor genannten Prion-artigen Mechanismen ebenfalls

vermehren. Bisher wurde eine infektiöse Übertragung zwischen Individuen jedoch nur für das Prion-Protein selbst nachgewiesen [13, 27, 29].

1.1.3 Proteostase

Die Proteinqualitätskontrolle, auch Proteinhomöostase oder Proteostase genannt, reguliert die Biosynthese, ko- und posttranslationale Modifikationen, den (Ab)Transport sowie Neofunktionalisierung von Proteinen. Dabei gewährleistet sie die korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine, die Entfaltung aggregierter Proteine sowie die Rückfaltung, die Degradation oder den Abtransport fehlgefalteter Proteine, sodass sich das gesamte Proteom des menschlichen Organismus stets im Gleichgewicht befindet [25, 30]. Dabei dienen proteostatische Mechanismen nicht nur dem Überleben einzelner Zellen, sondern ermöglichen zudem eine schnelle Anpassung des Proteoms als Reaktion auf Umweltbelastungen. Darüber hinaus kann eine gestörte Proteostase entweder zu einer Anhäufung von normalerweise bereits degradierten Proteinen oder zu einem übermäßigen Proteinabbau führen. Sowohl das Altern als auch verschiedene Krankheiten wie Krebs, immunologische Störungen oder Neurodegeneration sind mit diesen Prozessen assoziiert [25, 31, 32].

Insgesamt neigen 30% der neusynthetisierten Proteine zur Fehlfaltung [25]. Um dennoch eine effiziente Faltung zu gewährleisten und Aggregation aufgrund von intermolekularen Wechselwirkungen zu verhindern, exprimieren Zellen molekulare Faltungshelfer, sogenannte Chaperone. Diese sind fähig, die Faltung der synthetisierten Aminosäurekette zu überwachen, zu akzelerieren und falls nötig zu korrigieren [3, 10, 25, 33]. Sollte ein fehlgefaltetes, partiell denaturiertes oder bereits vollständig denaturiertes Peptid bzw. Protein vorliegen, verhindern Chaperone dessen Aggregation und katalysieren die Rückfaltung zur nativen Konformation. Des Weiteren können Chaperone unter ATP-Verbrauch intrazellulare Proteinaggregate zu monomeren Einheiten disassemblieren und deren Rückfaltung in die lösliche, native Konformation akzelerieren [34, 35].

Sollte die Entfaltung nicht erfolgreich sein, können Chaperone verschiedene Mechanismen der Proteolyse aktivieren, sodass abnormale Proteine vollständig zerstört und abgebaut werden [10, 25]. Die beiden wichtigsten intrazellulären Proteindegradationssysteme sind das Ubiquitin-Proteasom-System sowie das Autophagie-Lysosom-System. Das Ubiquitin-Proteasom-System ermöglicht die Degradation von abnormalen einzelsträngigen Polypeptiden, jedoch ist die Degradation von amyloiden Aggregaten aufgrund ihrer thermodynamischen Stabilität erschwert [10, 19, 30]. In diesem Falle erfolgt die Degradation über das Autophagie-Lysosom-System, welches neben amyloiden Proteinaggregaten zudem den Abbau geschädigter Zellorganellen gewährleistet. Das Autophagie-Lysosom-System kann in Chaperon-vermittelte Autophagie, Mikroautophagie, Autophagie in den Mitochondrien oder endoplasmatische Retikula und Makroautophagie differenziert werden, wobei letztere derzeit

am besten charakterisiert ist. Makroautophagie beschreibt den Transport von zytosolischem Substrat zum Lysosom, einem membranumschlossenen Zellorganell, welches eine Vielzahl an Enzymen für die Proteindegradation wie Hydrolasen, Proteasen, Lipasen, Peptidasen, Nukleasen oder Phosphatasen enthält [25, 30, 32].

Ist das Autophagie-Lysosom-System aufgrund einer Überexpression amyloider Proteine oder einer Inhibierung bestimmter Proteine des Proteasesystems kurzzeitig überlastet, werden Proteinaggregate in sogenannten Aggresomen, bei denen es sich um perinukleäre, membranfreie zytosolische Einschlusskörper handelt, zwischengelagert und anschließend sukzessive degradiert [19, 30]. Dieser Vorgang wird als Aggresom-Autophagie-System bezeichnet und ist eine selektive Form der Autophagie, da lediglich große, unlösliche Proteinaggregate, welche zuvor für die Degradation mit Ubiquitin markiert wurden und mit dem Mikrotubuliorganisationszentrum (englisch: *microtubuli organization center*, MTOC) assoziiert sind, eliminiert werden. Diese Zwischenlagerung soll zum einen die proteostatischen Mechanismen entlasten und zum anderen die Zelle vor schädlichen Auswirkungen der Proteinaggregate schützen [10, 30, 34, 36]. Letzteres wird auch im Zusammenhang mit der Anreicherung von Amyloidfibrillen zu intra- oder extrazellulären Einschlusskörper wie Kondensate oder Plaques vermutet, da diese Akkumulationen im Vergleich zu den noch löslichen Oligomeren eine geringere Toxizität aufweisen [20, 31].

Des Weiteren kann die lokale Konzentration an amyloiden Proteinen und vermutlich auch an löslichen Proteinaggregaten durch Reinigung (im Folgenden als Clearance bezeichnet) basierend auf extrazellulären und peripheren Mechanismen sowie Abtransport reduziert werden. Extrazelluläre Mechanismen umfassen die proteolytische Degradation durch extrazelluläre Enzyme wie Matrix-Metalloproteasen oder Neprilysin, die Phagozytose und Endozytose durch beispielsweise Makrophagen, Mikroglia oder Astrozyten und die immunvermittelte Degradation durch Autoantikörper [37-39]. Der Transport aus der lokalen Umgebung in die Peripherie einschließlich Blutkreislauf und lymphatisches System kann unteranderem durch Drainage oder rezeptorvermittelten Transport erfolgen. Sich im Blutkreislauf befindliche amyloide Proteine können zum einen über Phagozytose von Blutzellen wie Monozyten oder neutrophilen Granulozyten sowie Proteasen degradiert werden. Zudem können sie über Carrier wie Albumin, Lipoproteine oder Erythrozyten zu peripherem Gewebe oder Organen transportiert werden, wo sie anschließend durch Makrophagen und Hepatozyten degradiert und über die Leber in die Galle und den Stuhl oder über die Niere in den Urin ausgeschieden werden können [39, 40].

1.2 Proteinfehlfaltungserkrankungen

Im Laufe der Zeit und während dem Prozess des Alterns häufen sich genetische Mutationen und intrinsische Fehler während der Proteinbiosynthese, sodass Fehlfaltungen der sekundären und/oder tertiären Proteinstruktur ebenfalls zunehmen [10, 27, 32, 41]. Da zudem proteostatische Mechanismen altersbedingt an Kapazität verlieren, resultiert die Fehlfaltung sowohl in einem Funktionsverlust der involvierten Proteine als auch in einer pathologisch erhöhten intrazellulären Konzentration, welche die amyloide Aggregation des betroffenen Proteins begünstigt. Dieser dysfunktionale zelluläre Zustand wird als Proteinfehlfaltungserkrankung oder Proteinopathie bezeichnet [27].

1.2.1 Pathophysiologische Folgen der Fehlfaltung

Im Allgemeinen lassen sich Proteinfehlfaltungserkrankungen in zwei Gruppen differenzieren: Krankheiten, die durch einen Funktionsverlust des Proteins entstehen („loss-of-function“) oder Krankheiten, die durch die erworbenen toxischen Eigenschaften des fehlgefalteten Proteins verursacht werden („toxic gain-of-function“) [23, 42].

Die erste der beiden Gruppen ist durch eine mutationsbedingte Proteinfehlfaltung gekennzeichnet, wodurch sich die Tertiärstruktur nicht korrekt ausbilden kann. Durch die Fehlfaltung und die daraus resultierende Degradation des fehlgefalteten Proteins mithilfe von zellulären Mechanismen ist das entsprechende Protein nicht fähig, seine physiologische Funktion korrekt bzw. in ausreichendem Maße auszuführen [15, 23, 42, 43]. Beispiele für solche Krankheiten sind Mukoviszidose, nephrogener Diabetes insipidus sowie eine Vielzahl an Stoffwechselerkrankungen darunter *Morbus Gaucher* und *Morbus Fabry* [44, 45].

Die Krankheiten der zweiten Gruppe sind durch ein erhöhtes Aggregationspotenzial der fehlgefalteten Proteine gekennzeichnet, wodurch diese in den meisten Fällen eine zelluläre Toxizität erwerben und letztendendes intra- oder extrazellulär akkumulieren und sich entweder lokal in einem Gewebe bzw. Organ anreichern oder sich systemisch ausbreiten [10, 33, 42]. Beispiele für solche Krankheiten sind *Morbus Alzheimer* (*englisch: Alzheimer’s disease*, AD), *Morbus Parkinson* (*englisch: Parkinson’s disease*, PD), Typ II Diabetes sowie Chorea Huntington [42, 44, 46]. Die Aggregation kann sowohl durch genetische Mutation des betroffenen Proteins verursacht werden als auch sporadisch entstehen. Insbesondere bei letzterem manifestiert sich die Fehlfaltung und Aggregation durch eine Abnahme der proteostatischen Kapazität, hervorgerufen durch Zellalterung, oxidativen Stress und Umweltfaktoren wie beispielsweise Strahlung, extreme Temperaturen und Metallionen [10, 42, 44]. Die zugrundeliegenden Mechanismen der Toxizität sind derzeit noch nicht geklärt, jedoch scheint der Erwerb toxischer Eigenschaften durch Aggregation abhängig von der jeweiligen Proteinspezies und der Lokalisierung im menschlichen Organismus zu sein [10, 33, 44]. Aufgrund der erworbenen toxischen Eigenschaften wird die Funktion zellulärer Schlüssel-

proteine der Degradierungsmechanismen zunehmend beeinträchtigt und die Integrität der Zellmembran gestört [11]. Bemerkenswert ist, dass auch Proteine beschrieben wurden, die aufgrund von Fehlfaltung zwar aggregieren, jedoch hierbei keine toxischen Eigenschaften erwerben und somit keinen Zelltod verursachen. Dennoch sind solche funktionellen Amyloide dennoch fähig, sich Prion-artig zu vermehren und auszubreiten [43, 47-49].

1.2.2 Krankheitsassoziierte amyloide Proteine

Die in Proteinfehlfaltungserkrankungen involvierten Proteine ähneln sich weder in ihrer primären Aminosäuresequenz noch in ihrer Größe oder physiologischen Funktion. Lediglich ein Funktionsverlust bzw. die aberrante Faltung, Aggregation sowie intra- oder extrazelluläre Akkumulation von sonst löslichen und funktionellen Proteinmonomeren zu fibrillären und amyloiden Proteinaggregaten, die einen hohen Anteil an Cross-β-Struktur aufweisen, haben sie gemein [11, 15, 27]. Trotz dieser gemeinsamen Quartärstruktur können krankheitsspezifische amyloide Proteine anhand ihrer zellulären als auch anatomischen Verteilung differenziert werden, was eine Klassifizierung verschiedener Erkrankungen ermöglicht [15, 46]. Bei den häufigsten Proteinfehlfaltungserkrankungen handelt es sich um Amyloidosen, Tauopathien, Synucleinopathien oder um Erkrankungen, die durch Trinukleotidexpansionen hervorgerufen werden. Beispiele hierzu wären AD, PD und Chorea Huntington [13, 46].

1.2.2.1 Aβ-Amyloidose

Der Begriff „Amyloidose“ beschreibt Proteinfehlfaltungserkrankungen, die durch Fehlfaltung, Aggregation und extrazelluläre Akkumulation von sonst löslichen und funktionellen Proteinen entstehen. Die extrazellulären Akkumulationen verursachen Gewebeschädigungen sowie organische Dysfunktion beispielsweise des Herzens, der Nieren, der Leber, des Gastrointestinaltrakts sowie dem zentralen als auch peripheren Nervensystems [46, 50]. Derzeit sind etwa 30 Proteine beschrieben, die Amyloidosen hervorrufen können, darunter Insulin im Zusammenhang mit Diabetes Typ II und das Prion-Protein im Zusammenhang mit der Creutzfeldt-Jakob- sowie der Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Krankheit. AD, die am häufigsten vorkommende Form einer Demenz, ist die bekannteste Amyloidose und kann aufgrund des involvierten Amyloid β-Peptids (Aβ) als Aβ-Amyloidose klassifiziert werden [46, 50, 51].

Struktur und Funktion des Aβ-Peptids

Aβ ist ein aus 37 bis 49 Aminosäuren bestehendes Peptid, welches durch endoproteolytische Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (englisch: *Amyloid Percursor Protein*, APP), einem Transmembranprotein, entsteht. Humanes APP wird durch das *APP-Gen*, welches auf

Chromosom 21 lokalisiert ist, kodiert. Durch alternatives Spleißen entstehen drei verschiedene Isoformen, welche entweder aus 695, 751 oder 770 Aminosäuren bestehen. Im menschlichen Körper wird APP in verschiedenen Zellen, Geweben und Organen exprimiert, wobei in den Synapsen der Neuronen sowie in Astrozyten und Mikroglia die Isoform APP695 vorrangig ist [40, 51, 52]. Die biologische Funktion von APP695 ist derzeit noch nicht vollständig geklärt, jedoch scheint es in vielen Prozessen wie der neuronalen Entwicklung und Homöostase, dem intrazellulären Transport sowie der Regulation zellulärer Signalwege involviert zu sein [53, 54]. APP695 besteht aus einer Membrandomäne und einem großen, extrazellulären glykosylierten N-Terminus sowie einem kurzen zytoplasmatischen C-Terminus.

Die Endoproteolyse des APP kann entweder in Bildung nicht-amyloider oder amyloider Proteinspezies resultieren (siehe Abbildung 4).

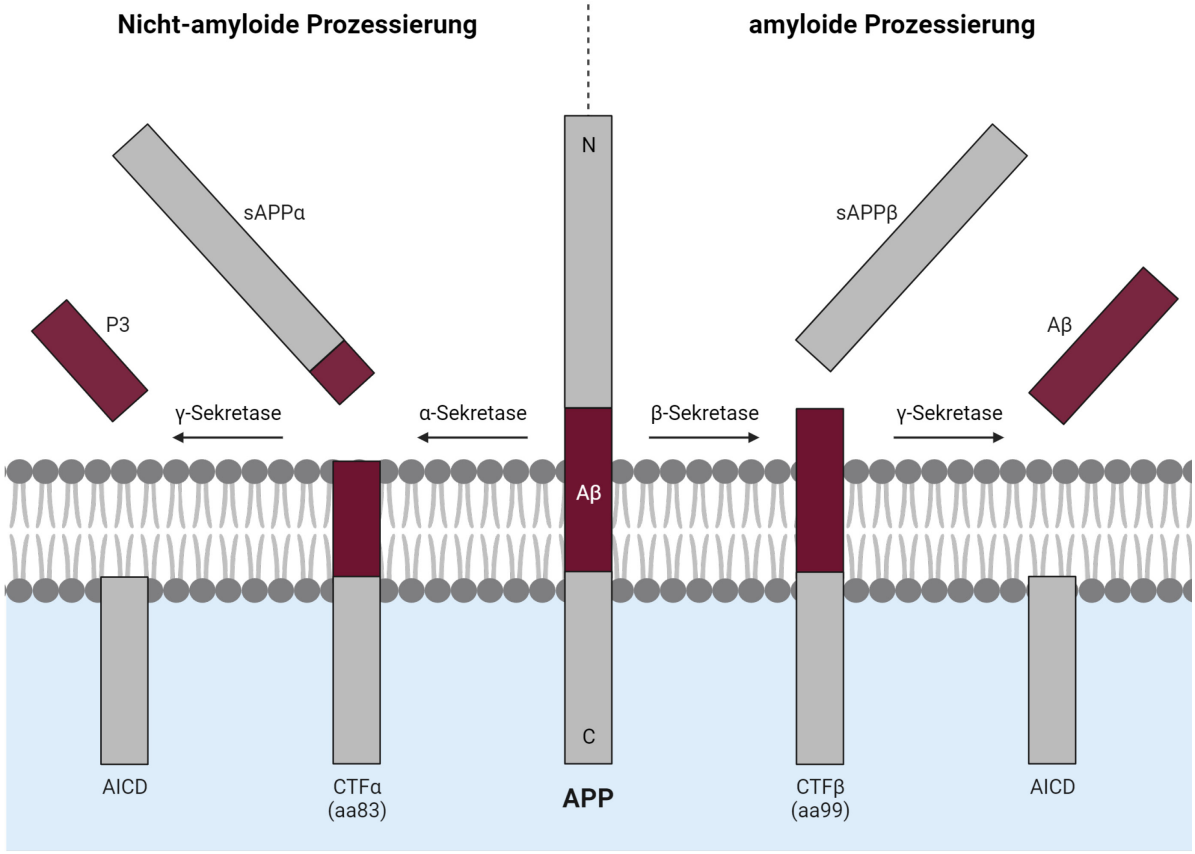


Abbildung 4 – Endoproteolytische Spaltung des humanen APP-Proteins. APP ist ein Transmembranprotein, wobei der N-Terminus im extrazellulären Raum (weiß dargestellt) und der C-Terminus im Zytoplasma (hellblau dargestellt) lokalisiert sind. Die nicht-amyloide Prozessierung wird durch die α-Sekretase initiiert, welche innerhalb der Aβ-Domäne spaltet, wodurch das lösliche N-terminale Fragment sAPPα und das membrangebundene C-terminale Fragment (CTFα) mit einer Länge von 83 Aminosäuren entstehen. Letzteres wird anschließend von der γ-Sekretase gespalten, wodurch wiederum das extrazelluläre, nicht toxische P3-Fragment freigesetzt wird und die intrazelluläre Domäne (AICD) verbleibt. Die amyloide Prozessierung von APP erfolgt durch die sequenzielle Spaltung des Proteins durch β- und γ-Sekretasen. Durch die initiale Spaltung mittels β-Sekretase wird das N-terminale Fragment sAPPβ sowie das membrangebundene C-terminale Fragment (CTFβ) mit einer Länge von 99 Aminosäuren erzeugt. Die membrangebundene Domäne wird anschließend durch γ-Sekretasen gespalten, wodurch das extrazelluläre, toxische Aβ-Fragment freigesetzt wird und ebenfalls eine intrazelluläre Domäne verbleibt. Modifizierte Darstellung nach Chen et al. [51], erstellt mit BioRender.com.

Die nicht-amyloide Prozessierung basiert auf der sequenziellen Spaltung des APP-Proteins durch α-Sekretase und γ-Sekretase, wodurch das nicht toxische P3-Fragment in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. Im Gegensatz dazu wird das APP-Protein innerhalb der amyloiden Prozessierung eingangs durch die β-Sekretase und anschließend durch die γ-Sekretase gespaltet, wodurch das toxische Aβ-Fragment in den extrazellulären Raum freigesetzt wird oder an der Plasmamembran assoziiert verbleibt. Dieses Fragment kann eine Länge zwischen 37 und 49 Aminosäuren aufweisen, wobei für AD besonders Aβ1-40 und Aβ1-42 relevant sind [51-53].
Die physiologische Funktion des Aβ-Peptids ist noch nicht geklärt. Es wurde jedoch gezeigt, dass lösliche Aβ-Spezies als Liganden für eine Vielzahl von Rezeptoren wie *N-methyl-D-aspartate receptor*, *low-density lipoprotein receptor-related protein* und der *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* und für verschiedene Moleküle wie das zelluläre Prion-Protein, Albumin, Lipoproteinen sowie Zellen einschließlich Erythrozyten und Monozyten fungieren [40, 51, 55]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Aβ über komplexe Transportwege aus dem Hirn über die Blut-Hirn-Schranke und Blut-CSF-Schranke in die Peripherie gelangt und dort die Permeabilisierung von Membranen, die Aggregation des Tau-Proteins sowie inflammatorische Prozesse und oxidativen Stress auslösen kann [51, 56, 57]. Zudem wird Aβ1-42 eine antimikrobielle Wirkung zugeschrieben, da es die Agglutination und den Tod von Mikroorganismen induziert [51, 56, 58, 59].

Aggregation des Aβ-Peptids

Monomeres Aβ kann unter Ausbildung von β-Faltblättern schrittweise zu Oligomeren, Protofibrillen und Amyloidfibrillen polymerisieren und letztlich in amyloiden Plaques akkumulieren. Obwohl solche Amyloid-Ablagerungen jahrzehntelang für das Fortschreiten von AD verantwortlich gemacht wurden, zeigen neuere Studien, dass die bei der Aggregation gebildeten fehlgefalteten Aβ-Oligomere die Hauptursache für die pathologischen Prozesse sind [20, 51, 55]. Während Amyloidfibrillen größer und unlöslich sind, zu Amyloid-Plaques akkumulieren und dadurch histologische Läsionen verursachen können, sind Aβ-Oligomere löslich und können sich im gesamten Gehirn und in der Peripherie ausbreiten. Die kleinen, löslichen Aβ-Oligomere unterscheiden sich stark in ihrer Hydrophobizität, ihren Cross-β-Anteilen sowie ihrem Molekulargewicht (MW) [20, 51]. So werden beispielsweise niedermolekulare Oligomere (englisch: *low molecular weight*), bestehend aus zwei bis drei Monomereinheiten, von Oligomeren mit einem Molekulargewicht höher 100 kDa (englisch: *high molecular weight*) differenziert [51, 60, 61].
Sowohl genetische Mutationen bzw. Prädisposition als auch posttranslationale Modifikationen, das Alter und Umweltfaktoren wie Infektionen oder Schädel-Hirn-Traumata wirken sich auf das Aggregationsverhalten und die toxischen Eigenschaften des Aβ-Peptids aus [53, 62]. Mutationen im APP-Gen, Genommutationen wie Trisomie 21 sowie Mutationen in den Genen,

welche die γ-Sekretasen kodieren (PSEN1 und PSEN2), resultieren in einer erhöhten Expression des Aβ1-42-Peptids. Dieses weist aufgrund der zwei zusätzlichen hydrophoben Aminosäuren im Vergleich zu Aβ1-40 eine reduzierte Löslichkeit und daher ein höheres Aggregationspotenzial auf [51, 53, 62]. Des Weiteren wird die Löslichkeit von Aβ durch N-terminale Trunkierung beeinträchtigt, wodurch dessen Aggregation ebenfalls gefördert wird. Zudem sind diese trunkierten Spezies mit einer erhöhten Toxizität verbunden, insbesondere wenn es sich um pyroglutamylierte Varianten handelt [18, 51, 53, 61]. Zusätzlich zu einer gesteigerten Expression kann eine reduzierte Clearance ebenfalls in einer Erhöhung der Aβ-Konzentration und Bildung aggregierter Spezies resultieren. Eine der bekanntesten genetischen Prädispositionen, welche mit einer Beeinträchtigung der Aβ-Clearance einhergeht, ist das Vorhandensein des ApoE-ε4-Allels, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen hierzu noch nicht vollständig geklärt sind [53, 62-64].

Klinische Manifestation und Aβ-Akkumulation

Die Fehlfaltung und Aggregation von Aβ resultiert in der Bildung unlöslicher extrazellulärer Einschlusskörper, den sogenannten Aβ-Plaques. Diese sind neben den Neurofibrillenbündeln, bestehend aus aggregiertem Tau-Protein (siehe Kapitel 1.2.2.2), eines der pathophysiologischen Charakteristika von AD und können bereits 15-20 Jahre vor Eintritt der ersten Symptome im Gehirn der Patienten nachgewiesen werden [53, 54]. Diese Akkumulationen breiten sich eingangs vom Neocortex über das limbische System in das Cerebellum und in den Hirnstamm aus, wobei sich keine Korrelation zu der kognitiven Beeinträchtigung des Patienten zeigt [65, 66]. Wie zuvor beschrieben initiieren Aβ-Oligomere die Aggregation von Tau, sodass als Folge Tau-Akkumulationen in Form von Neurofibrillenbündeln verzögert auftreten. Diese breiten sich zunächst von der transentorhinalen Region über das limbische System in den Hirnstamm und das Cerebellum aus und sind letzten Endes auch in der Großhirnrinde zu finden. Im Gegensatz zu den Aβ-Plaques korreliert das Auftreten der Neurofibrillenbündeln in den einzelnen Gehirnregionen stärker mit der Symptomatik der Patienten [65-67].

Sowohl das Alter, genetische Ursachen, biologisches Geschlecht sowie verschiedene Umweltfaktoren können den Zeitpunkt der klinischen Manifestation sowie die Krankheitsdauer beeinflussen. Im Allgemeinen wird zwischen der frühauftretenden Form (*englisch: early-onset Alzheimer's disease*, EOAD), die ab dem 40. Lebensjahr auftritt und schnell fortschreitet, und der spätauftretenden Form (*englisch: late-onset Alzheimer's disease*, LOAD), die sich meist ab dem 65. Lebensjahr manifestiert, unterschieden. Während bei EOAD genetische Mutationen und Prädispositionen für eine Überproduktion an Aβ verantwortlich sind, wird die Aggregation und Akkumulation von Aβ im Falle von LOAD wahrscheinlich durch eine reduzierte Proteostase sowie eingeschränkte zerebrale Clearance begünstigt [53, 54, 57].

AD wird im klinischen Alltag anhand der Schwere der kognitiven Beeinträchtigung in milde, moderate und schwere Demenz differenziert, wobei subjektive kognitive Einschränkungen (*englisch: subjective cognitive decline*, SCD) sowie milde kognitive Beeinträchtigungen (*englisch: mild cognitive impairment*, MCI) als Demenzvorstufen angesehen werden [67-69]. Individuen mit SCD können erste Veränderungen ihrer Kognition wahrnehmen, jedoch sind diese klinisch beispielsweise mittels neuropsychologischer Tests noch nicht diagnostizierbar. In dieser Phase ist das Gehirn noch fähig, die durch Aggregation und Akkumulation von Aβ ausgelösten Zellschädigungen zu kompensieren. Wird diese Kapazität jedoch überschritten, folgen verstärkt Zellschädigungen und ein Absterben von Nervenzellen, was sich in subtilen kognitiven Beeinträchtigungen wie leichten Gedächtnisproblemen sowie Denkschwierigkeiten manifestiert. Sowohl SCD als auch MCI weisen ein erhöhtes Risiko auf, an AD zu erkranken. Jedoch können sich kognitive Fähigkeiten, insbesondere wenn Amyloid- bzw. Tau-pathologische Veränderungen nicht ursächlich für die kognitiven Beeinträchtigungen sind, wieder normalisieren bzw. stagnieren, sodass Betroffene in die präklinische Phase zurückkehren oder in der derzeitigen Phase verbleiben [69]. In anderen Fällen, in denen die Kognition beispielsweise durch Medikamente beeinträchtigt wird, häufen sich die Fehldiagnosen für MCI.

Um SCD- bzw. MCI-Patienten, die aufgrund von AD an kognitiven Beeinträchtigungen leiden, von Patienten mit kognitiven Beeinträchtigungen anderen Ursprungs zu differenzieren, wurde die AT(N)-Klassifizierung (siehe Abbildung 5) etabliert [67]. Diese wird derzeit im Forschungsalltag und im Rahmen von klinischen Studien zur Klassifizierung der Patienten angewandt und basiert sowohl auf CSF-Analysen als auch auf bildgebenden Verfahren. Hierbei wird sowohl hinsichtlich vorhandener Amyloid-Pathologie (A), Tau-Pathologie (T) sowie Neurodegeneration (N) untersucht, wobei das Vorhandensein einer Amyloid-Pathologie ausschlaggebend für eine Assoziierung der kognitiven Beeinträchtigungen mit AD ist und als AD-Kontinuum bezeichnet wird [67].

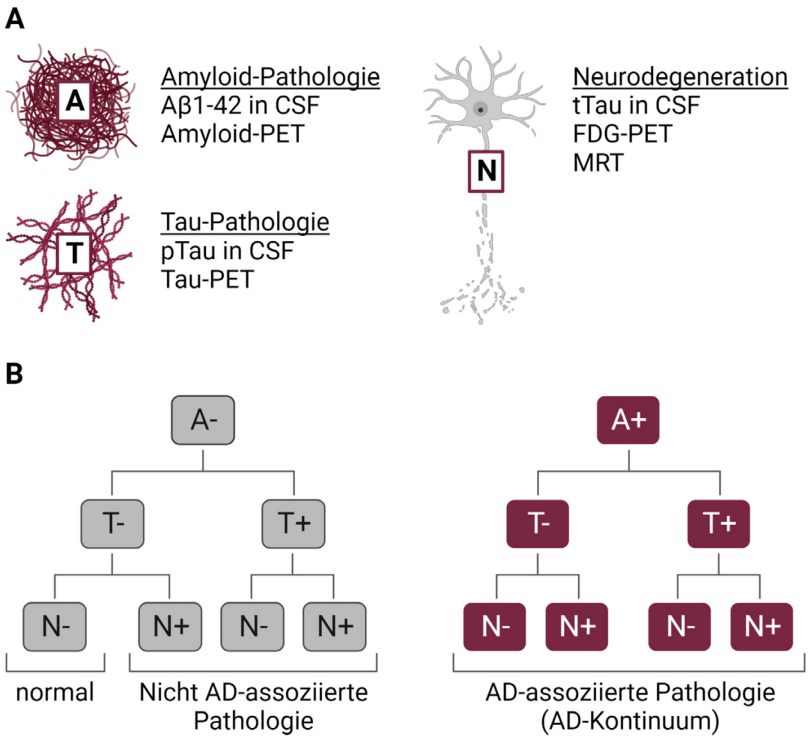


Abbildung 5 – Klassifizierung der Demenzen auf Grundlage verschiedener Biomarker-Profile bezüglich einer Amyloid-Pathologie, Tau-Pathologie sowie Neurodegeneration. (A) Etablierte Biomarker zur Diagnose einer Amyloid-Pathologie (abgekürzt mit A), Tau-Pathologie (abgekürzt mit T) sowie Neurodegeneration (abgekürzt mit N). Das Vorhandensein von Aβ-Plaques kann durch reduziertes Aβ1-42 in CSF und auffällige Amyloid-spezifische Positronen-Emissions-Tomographie (PET) bestätigt werden. Dementgegen spiegelt sich das Vorhandensein von Neurofibrillenbündeln in einer erhöhten Konzentration an phosphoryliertem Tau (pTau) in CSF sowie in einem auffälligen Tau-PET wider. Vorhandene Neurodegeneration kann durch erhöhtes Gesamt-Tau (englisch: *total tau*, tTau) in CSF, Magnetresonanztomographie (MRT) oder 18F-Fluorodeoxyglukose-PET (FDG-PET) determiniert werden. **(B)** Einteilung der Demenz erfolgt anhand verschiedener ATN-Profile. In erster Linie wird eine AD-assoziierte Pathologie, bei der ein auffälliger Amyloid-Status (A+) vorliegt, von einer nicht AD-assoziierter Pathologie, bei der das Vorhandensein von Aβ-Plaques ausgeschlossen wurde (A-), differenziert. Des Weiteren wird unterschieden, ob der Amyloid-Status unabhängig von einer Tau-Pathologie (T-) ist oder eine komorbide Proteinopathie mit Tau (T+) vorliegt. Ist letzteres der Fall, wird die vorhandene Demenz klar als AD klassifiziert. Zeigen sowohl A-, T- als auch N-Biomarker keine pathologischen Veränderungen an, wird von einem physiologischen (normalen) AD-Biomarker-Profil gesprochen. Modifizierte Abbildung angelehnt an Jack et al. [67], erstellt mit BioRender.com.

1.2.2.2 Tauopathien

Der Begriff „Tauopathien“ beschreibt eine klinisch, biochemisch sowie morphologisch heterogene Klasse an Proteinfehlfaltungserkrankungen im Gehirn, welche durch Aggregation und Akkumulation des Tau-Proteins und progressive synaptische Dysfunktion gekennzeichnet ist [70, 71]. Derzeit sind mehr als 26 verschiedene Tauopathien beschrieben, wobei Symptome von kognitiven Defiziten bis hin zu Bewegungsstörungen variieren [70]. Primäre Tauopathien, bei denen die Taupathologie maßgeblich für weitere pathologische Prozesse ist, werden von sekundären Tauopathien, bei denen die Tau-Aggregation durch andere pathologische Prozesse begünstigt wird, differenziert. Eine weitere Klassifizierung erfolgt anhand der anatomischen Verteilung, involvierten Zelltypen sowie aggregierten Tau-Isoformen [46, 70].

Struktur und Funktion des Tau-Proteins

Das Tau-Protein ist ein hydrophiles, intrinsisch ungeordnetes Protein, welches nur einen geringen Anteil an Sekundärstruktur aufweist [72]. Unter physiologischen Bedingungen wird Tau hauptsächlich von Neuronen des zentralen Nervensystems exprimiert, wobei es in den Axonen mittels seiner Mikrotubulibindungsdomäne (MTBD) mit Tubuline assoziiert und deren Polymerisierung sowie Stabilisierung zu Mikrotubuli fördert [46, 62, 70]. In geringer Konzentration wird Tau zudem von Oligodendrozyten und Astrozyten exprimiert, wohingegen in Mikroglia keine Expression stattfindet [73]. Tau ist bei der Regulierung der Myelinisierung der Nerven und der synaptischen Plastizität, Eisenhomöostase und Neurogenese beteiligt [70, 72]. Zudem weist es protektive Eigenschaften für die genetische Information auf, indem es eine Schlüsselrolle innerhalb der Genexpression sowie Chromatinremodellierung übernimmt [72].

Tau wird durch ein einziges Gen, das *Mikrotubuli assoziierte Protein Tau* (MAPT) Gen kodiert, welches auf Chromosom 17q21.3 lokalisiert ist und 16 Exons enthält. Das Tau-Protein wird in die N-terminale Region, Prolin-reiche Domäne, MTBD und die C-terminale Region gegliedert, wobei die MTBD aus drei oder vier aneinandergrenzenden, repetitiven Sequenzen besteht [74, 75]. Durch alternatives Spleißen des zweiten, dritten und zehnten Exons des Vorläufer-Boten-Ribonukleinsäuremoleküls entstehen im menschlichen Gehirn sechs unterschiedliche Isoformen des Tau-Proteins, welche eine Länge zwischen 352 und 441 Aminosäuren aufweisen und sich in ihrer Mobilität in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterscheiden [62, 70, 76] (siehe Abbildung 6).

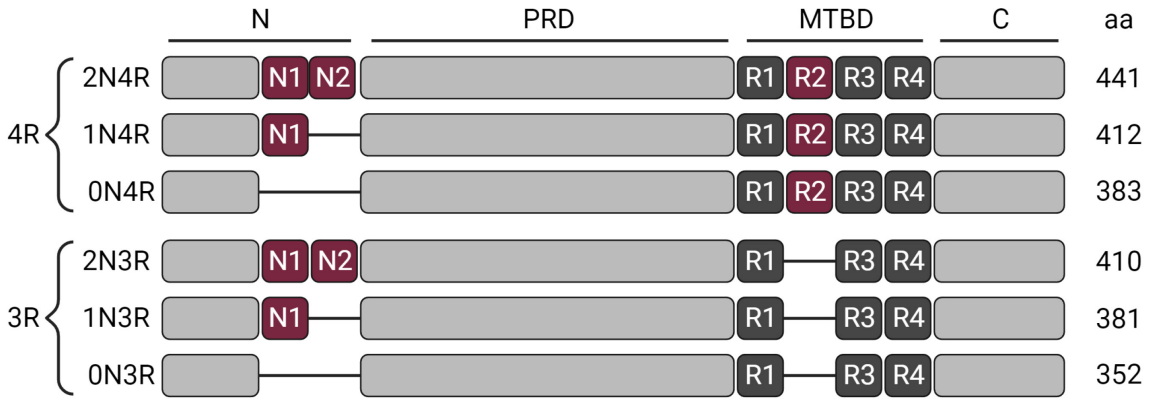


Abbildung 6 – Alternatives Spleißen des MAPT-Gens resultiert in der Expression sechs verschiedener Tau-Isoformen. Im menschlichen Gehirn werden durch alternatives Spleißen des N-terminalen Exons 2 (N1), N-terminalen Exons 3 (N2) und Exons 10 (R2), welches innerhalb der Mikrotubuli-Bindungsdomäne (MTBD) lokalisiert ist, sechs verschiedene Tau-Isoformen erzeugt. Je nachdem, ob Exon 2 und Exon 3 der N-terminalen Region ausgeschlossen bzw. eingeschlossen werden, entsteht eine 0N, 1N oder 2N Tau-Isoform. Die zentrale Region des Tau-Proteins ist die Prolin-reiche Domäne (PRD), welche unter anderem für die Interaktion mit anderen Proteinen wie Aktin von großer Bedeutung ist. Alternatives Spleißen von Exon 10 in der MTBD resultiert in Tau-Isoformen, die eine MTBD mit entweder drei oder vier Wiederholungen aufweisen und folglich als 3R- oder 4R-Isoform bezeichnet werden. Die C-terminale Region ist in allen sechs Isoformen identisch. Die Länge der Aminosäurekette der jeweiligen Tau-Isoform variiert zwischen 352 und 441 Aminosäuren (aa). Modifizierte Abbildung nach Guo et al. und Zhang et al. [70, 74], erstellt mit BioRender.com.

Ausgehend von der längsten Tau-Isoform (441 Aminosäuren, Molekulargewicht 45,8 kDa) besteht das Molekül aus einer sauren N-terminalen Domäne (aa 1-165), einer Prolin-reichen Domäne (aa 166-242), einer MTBD (aa 243-367) und einer C-terminalen Domäne (aa 368-441) [72, 74, 77]. Je nach Anzahl der Wiederholungen innerhalb der MTBD (englisch: *repeats*, R) wird zwischen 3R-Isoformen oder 4R-Isoformen, bei denen Exon 10 entweder aus- bzw. eingeschlossen wurde, differenziert [70]. Insgesamt enthält die längste menschliche Tau-Isoform 85 potenzielle Bindestellen für Phosphorylierung (Serin, Threonin, Tyrosin) sowie 102 hydrophobe Reste (Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Methionin und Phenylalanin), welche nachweislich an der Aggregation von Tau beteiligt sind. [78]. Zudem sind es vor allem die zweite und dritte Wiederholung innerhalb der MTBD, welche die Aggregation und Ausbildung einer Cross-β-Struktur fördern [72, 74, 77]. Unter physiologischen Bedingungen wird die Selbstaggregation von Tau jedoch durch den intakten N- sowie C-Terminus gehemmt.

Aggregation des Tau-Proteins

Im Zusammenhang mit Tauopathien wird die Dynamik und das Gleichgewicht der Assoziation zwischen Tau und Mikrotubuli hauptsächlich durch genetische Mutationen, extensive posttranslationale Modifikationen oder gesteigerte Phosphorylierung beeinträchtigt, wobei letztere derzeit am besten untersucht ist [77-79]. Insbesondere abnormale Phosphorylierung bzw. Hyperphosphorylierung verursachen durch Einführung negativer Ladungen Konformationsänderung und Fehlfaltung des Tau-Proteins, wodurch dessen Affinität zu Tubulin reduziert wird und es von den Mikrotubuli dissoziiert (siehe Abbildung 7) [75, 78]. Folglich werden Mikrotubuli destabilisiert und der axonale Transport stark beeinträchtigt [78]. Im Zytoplasma reichern sich zudem phosphorylierte Tau-Spezies an, welche, begünstigt durch die Erhöhung intra- und intermolekularer Wechselwirkungen, β-Faltblattstrukturen ausbilden und zu zytotoxischen Oligomeren und höheren Amyloid-Strukturen wie gepaarten helikalen Filamenten (englisch: *paired helical filaments*, PHF) oder geraden Filamenten (englisch: *straight filaments*, SF) aggregieren und letztlich zu unlöslichen Strukturen wie neurofibrillären Bündeln (englisch: *neurofibrillary tangles*, NFT) akkumulieren [80, 81].

Diese Akkumulationen können bereits Jahre vor dem Auftreten klinischer Symptome entstehen [74]. Neben Phosphorylierung können weitere posttranslationale Modifikationen wie Ubiquitinierung, Nitrierung, Glykierung, Trunkierung und Acetylierung die Bildung von toxischen Tau-Aggregaten fördern. Des Weiteren können einzelne Mutationen der MTBD die Fehlfaltung sowie Aggregation auslösen. Beispiele hierfür wären der Austausch von Asparagin mit Lysin an Stelle 279 oder der Verlust von Lysin an Stelle 280 [78, 81]. Darüber hinaus fördern sowohl chronische Inflammation, metabolisches Syndrom, Reduzierung proteostatischer Prozesse bei gleichzeitig erhöhter Tau-Expression bzw. Aufnahme Tau-gefüllter Vesikeln über Endozytose sowie endogenes Aβ die Fehlfaltung und Aggregation des Tau-Proteins [82].

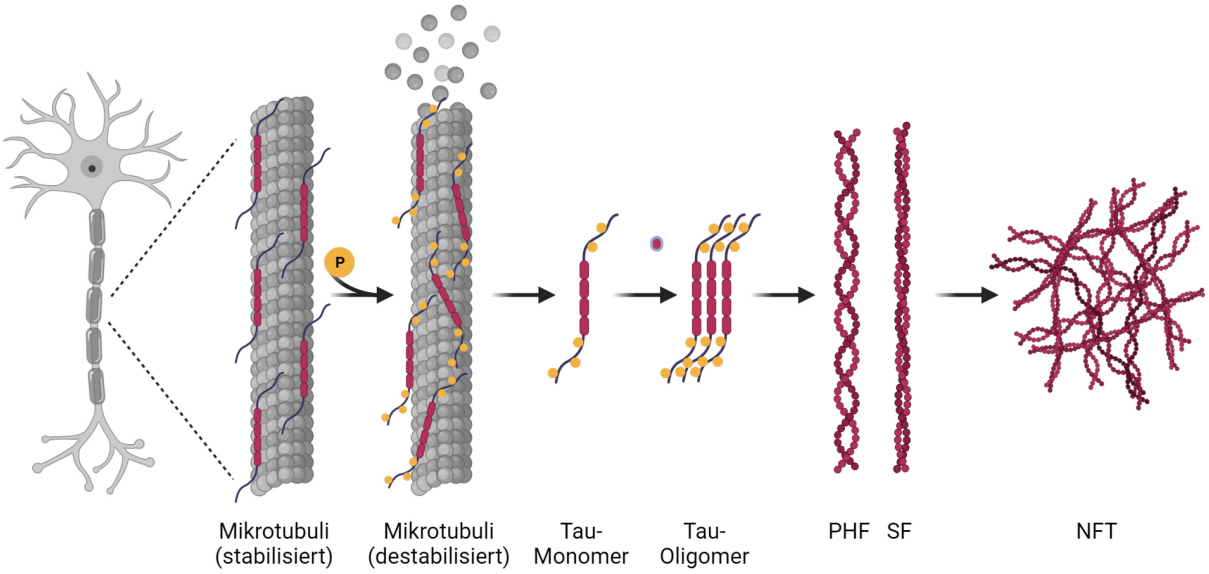


Abbildung 7 – Bildung von neurofibrillären Bündeln durch Aggregation und Akkumulierung phosphorylierter Tau-Monomere im Falle von AD. Unter pathologischen Bedingungen wird Tau posttranslational beispielsweise durch Phosphorylierung modifiziert. Als Folge dissoziiert Tau von den Mikrotubuli und reichert sich im Zytoplasma an, bis es schließlich zu Oligomeren aggregiert. Diese können wiederum durch Rekrutierung weiterer Tau-Spezies zu gepaarten helikalen Filamenten (PHF) oder geraden Filamenten (SF) wachsen. Die Akkumulierung amyloider Tau-Spezies resultiert in der Bildung von intrazellulären neurofibrillären Bündeln (NFT). Aufgrund der durch Phosphorylierung erzeugten Dissoziation der Tau-Moleküle von den Mikrotubuli werden diese in ihrer Stabilität und Dynamik so weit destabilisiert, sodass das Neuron degeneriert. Modifizierte Darstellung nach Jie et al. sowie Meraz-Ríos et al. [80, 81], erstellt mit BioRender.com.

Klinische Manifestation und Tau-Akkumulation

Im pathophysiologischen Prozess führen die abnormale Aggregation und Akkumulierung von Tau zu reduziertem Wachstum der Axone, synaptischer Dysfunktion und neuronalem Zelltod. Wie bereits beschrieben, variiert die Zusammensetzung und somit auch die Morphologie der akkumulierten Tau-Aggregate. In Neuronen kann sich Tau in Form von NFT, neurophilen Fäden sowie sogenannten Pick-Körperchen ablagern. Vor allem in primären Tauopathien akkumuliert Tau in Astrozyten, sodass hier neben Plaques und globulären Einschlusskörpern auch büschelartigen Astrozyten entstehen. Außerdem aggregiert Tau in Oligodendrozyten zu gewundenen oder globulären Einschlusskörpern [73]. In Mikroglia wurden bisher keine Akkumulationen des Tau-Proteins beschrieben, jedoch deuten mehrere Studien darauf hin, dass dieser Zelltyp an der Exosom-abhängigen Verbreitung von Tau involviert ist [73].

Obwohl Tauopathien in die primäre oder sekundäre Form sowie anhand der Isoformen in 3R-, 4R-Tauopathie oder 3R/4R-Tauopathien (ungefähr gleiche Anteile der 3R- und 4R-Isoform) differenziert werden können, gleichen sie sich häufig in ihrer klinischen Ausprägung [46, 70]. So manifestieren sich Tauopathien häufig in Krankheitsbildern mit Verhaltens-, Sprach-, Gedächtnis- und Bewegungsstörungen [70, 74]. Letztere umfassen sowohl Bradykinese und Hypokinese, Rigidität, Tremor, Muskelschwäche als auch posturale Instabilität [83]. Am häufigsten vorkommende Krankheitsbilder sind *Morbus Pick*, progressive supranukleäre

Blickparese, kortikobasale Degeneration sowie frontotemporale Demenz bzw. frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus. Zu den seltenen Tauopathien zählen Silberkornkrankheit, postenzephalitisches Parkinson-Syndrom, Guam-Parkinson-Demenz-Komplex und globuläre Glia-Tauopathien [46, 70, 83]. *Morbus Pick* ist einzigartig unter den Tauopathien, da die intraneuronalen Einschlusskörper lediglich aus Tau-Fibrillen der 3R-Isoform bestehen (sogenannte Pick-Körperchen). Zudem ist *Morbus Pick* die einzige primäre Tauopathie, die nicht mit Bewegungsstörungen assoziiert ist, sondern sich ausschließlich in Verhaltensauffälligkeiten, Persönlichkeitsveränderungen sowie Sprach- und Gedächtnisstörungen klinisch manifestiert [46, 83]. Im Gegensatz dazu sind progressive supranukleäre Blickparese, kortikobasale Degeneration, Silberkornkrankheit sowie globuläre Glia-Tauopathien durch Einschlusskörper bestehend aus Tau-Fibrillen der 4R-Isoform gekennzeichnet [46]. Einschlusskörper bestehend aus etwa gleichen Anteilen der 3R- als auch 4R-Isoform sind charakteristisch für postenzephalitisches Parkinson-Syndrom, Guam-Parkinson-Demenz-Komplex und AD, eine sekundäre Form der Tauopathie [46, 84]. PD wurde ursprünglich nicht als typische Tauopathie angesehen. Jedoch bestätigten jüngste Studien das Vorhandensein von NFT, was auf eine Tau-Pathologie hindeutet [84, 85].

1.2.2.3 α-Synucleinopathien

Proteinfehlfaltungserkrankungen, die durch Aggregation und progressive Akkumulation des α-Synuclein-Proteins im zentralen sowie peripheren Nervensystems gekennzeichnet sind, werden als α-Synucleinopathien definiert. Aufgrund klinischer als auch morphologischer Merkmale können diese weiter in Gliazellen-dominate und Neuronen-dominate α-Synucleinopathien differenziert werden, wobei letztere auch als Krankheiten mit Lewy-Körperchen bezeichnet werden [46, 86, 87].

Struktur und Funktion des α-Synuclein-Proteins

Humanes α-Synuclein ist ein 140 Aminosäure langes lösliches Protein (Molekulargewicht 14,5 kDa), welches eine dynamische Struktur aufweist. Es wurde erstmals im Zusammenhang mit Aβ-Plaques der AD untersucht und als nicht-Aβ Komponente der Plaques (englisch: *non-Aβ component*, NAC) beschrieben. α-Synuclein liegt im Zytoplasma intrinsisch ungeordnet vor und bildet während der Assoziation an Phospholipide α-helikale Sekundärstrukturen aus [86-88]. Unter physiologischen Bedingungen wird es hauptsächlich im Gehirn, genauer im Neocortex, Hippocampus, Substantia Nigra, Thalamus und Cerebellum exprimiert und im präsynaptischen Bereich angereichert. Zudem wurde das Vorkommen von α-Synuclein sowohl in Erythrozyten als auch in der Haut, in Speicheldrüsen sowie im Gastrointestinaltrakt beschrieben [87, 89].

α-Synuclein wird durch das *Synuclein* (SNCA) Gen kodiert, welches auf Chromosom 4q22.1 lokalisiert ist und sechs Exons enthält. Das Protein lässt sich in den amphipathischen N-Terminus, die hydrophobe nicht-amyloide Komponente und den sauren C-Terminus unterteilen (siehe Abbildung 8) [86, 87, 90]. Der N-Terminus von α-Synuclein (aa 1-60) ist positiv geladen und enthält vier Wiederholungen einer Abfolge aus elf Aminosäuren, welche wiederum eine hochkonservierte Abfolge aus Lysin-Threonin-Lysin-Glutaminsäure-Glycin-Valin (KTKEGV) beinhaltet. Diese Sequenz ist essenziell für die Fähigkeit, mit Lipidmembranen zu interagieren, da diese zum einen die Ausbildung α-helikaler Strukturen induziert und gleichzeitig die Formierung von β-Faltblattstrukturen reduziert [86, 88, 90]. Die hydrophobe Kernregion von α-Synuclein (aa 61-95), auch bekannt als NAC-Domäne, ist sowohl an der Aggregation als auch an der Fibrillenbildung von α-Synuclein beteiligt, da sich in diesem Bereich vermehrt Cross-β-Strukturen ausbilden können. Der C-Terminus (aa 96-140) weist aufgrund von zehn Glutamin- und fünf Asparaginsäure saure Eigenschaften auf, wodurch eine niedrige Hydrophobizität sowie eine hohe negative Teilladung erzeugt wird, sodass diese Domäne als Random Coil vorliegt [86, 88, 90].

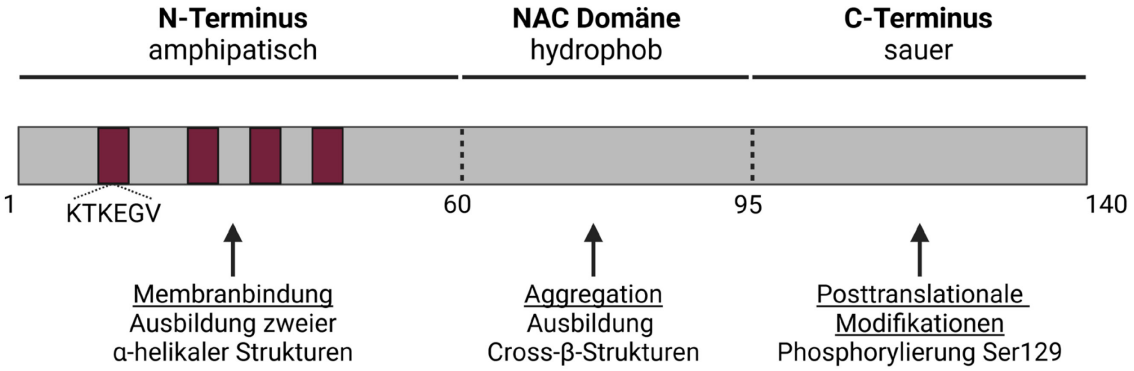


Abbildung 8 – Schematische Darstellung der α-Synuclein-Domänen. Das aus 140 Aminosäuren bestehende α-Synuclein-Protein kann in die amphipathische N-terminale Domäne (aa 1-60), die hydrophobe NAC-Domäne (aa 61-95) sowie die C-terminale Domäne (aa 96-140) unterteilt werden. Der N-Terminus enthält zahlreiche Wiederholungen, welche KTKEGV-Motive (Einbuchstabencode für die Aminosäuren (K) Lysin, (T) Threonin, (E) Glutamat, (G) Glycin, (V) Valin) enthalten und ist aufgrund der Ausbildung zweier α-helikaler Strukturen für die Membranbindung verantwortlich. Innerhalb der hydrophoben NAC-Domäne können sich vermehrt Cross-β-Strukturen ausbilden, welche ursächlich für die Aggregation und Fibrillenbildung von α-Synuclein sind. Die C-terminale Domäne ist negativ geladen und enthält die wichtigste Phosphorylierungsstelle an Serin 129. Modifizierte Darstellung nach Fan et al. und Moussaud et al. [90, 91], erstellt mit BioRender.com.

Die physiologische Funktion von α-Synuclein ist weitgehend unbekannt. Dennoch lassen Studien auf eine Beteiligung an der synaptischen Funktion und Plastizität sowie Regulierung der Neurotransmitterfreisetzung schließen. Des Weiteren ist es in verschiedenen zellulären Prozessen wie Mitochondrienfunktion oder Genregulierung involviert. [86, 92, 93]. Darüber hinaus interagiert es zudem mit Tubulin, Parkin, Phospholipasen, Tau-Protein, Dopaminrezeptor und Bestandteilen des SNARE-Komplexes (englisch: *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*, SNARE) [86-88, 94].

Aggregation des α-Synuclein-Proteins

Unter physiologischen Bedingungen befindet sich α-Synuclein in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen intrinsisch ungeordneten und membrangebundenen Monomeren, wobei bei Letzteren der N-Terminus zwei α-helikale Strukturen aufweist [86, 92]. Ungeordnetes monomeres α-Synuclein kann durch eine Konformationsänderung der NAC-Region zu β-faltblattreichen Strukturen konvertieren und schrittweise zu Oligomeren, Protofilamenten und Amyloidfibrillen polymerisieren und letztlich in Einschlusskörpern akkumulieren [86, 93, 94]. Besonders die kleinen und löslichen α-Synuclein-Oligomere variieren stark in ihrem Molekulargewicht, ihrer Hydrophobizität sowie ihren Cross-β-Anteilen [95, 96]. So besitzen instabile Oligomere mit einem geringen Molekulargewicht eine geringe Amplifikationsfähigkeit, wohingegen größere und stabilere Oligomere weiter zu Protofibrillen sowie Amyloidfibrillen wachsen können (im Folgenden auch als Seeding bezeichnet) [95].
Der exakte Mechanismus, der zur Aggregation von α-Synuclein führt, ist noch nicht vollständig geklärt. Mutationen, posttranslationale Modifikationen und ein Ungleichgewicht zwischen Synthese und Degradierung von α-Synuclein sowie oxidativer Stress oder verschiedene Umweltfaktoren können die Aggregationsfähigkeit beeinflussen [86, 92, 97]. So ist beispielsweise die Phosphorylierung von α-Synuclein am Serinrest 129 einer der wichtigsten pathologischen Marker von PD. Weitere posttranslationale Modifikation, die eine Aggregation von α-Synuclein zu toxischen Oligomeren begünstigen, sind Ubiquitinierung, Nitrierung oder C-terminale Trunkierung durch Proteolyse. Des Weiteren wird die Aggregation durch eine hohe endogene Gesamtkonzentration, eine gestörte Funktion der Mitochondrien sowie Mutationen im N-terminalen oder NAC-Bereich gefördert [86, 96]. Derzeit wurden sowohl mehrere Punktmutationen als auch die Duplikation bzw. Triplikation des SNCA-Gens als Ursache für familiäre α-Synucleinopathien identifiziert [86, 94]. Im Falle von membrangebundenem α-Synuclein resultieren beispielsweise die A30P- sowie G51D-Mutation in einer verstärkten zytosolischen Exponierung der hydrophoben NAC-Domäne, welche als Folge weiterer α-Synuclein-Monomere an sich bindet und somit die Aggregation vorantreibt, bis letztlich die Protofibrille von der Membran dissoziiert [96].

Klinische Manifestation und α-Synuclein-Akkumulation

Auf welchen Mechanismen die Neurotoxizität der α-Synuclein-Aggregate basiert, ist derzeit noch nicht geklärt. Zum einen wird vermutet, dass intrazelluläre Degradierungsmechanismen wie das Autophagie-Lysosom-System oder das Ubiquitin-Proteasom-System gestört werden. Andererseits könnte eine gestörte Ionenhomöostase als auch Schädigungen der Mitochondrien oder des endoplasmatischen Retikulums neurotoxische Prozesse initiieren [94, 95, 98]. Folgen der Neurotoxizität sind sowohl Entzündungen der betroffenen Hirnareale, synaptische Dysfunktion und Zelltod.

Obwohl α-Synucleinopathien die Aggregation und Akkumulation von α-Synuclein gemein haben, manifestieren sich einzelne Krankheiten in unterschiedlichen Krankheitsbildern, welche teilweise überlappende Symptome aufweisen [97]. Es wird vermutet, dass die bei der Aggregation entstandenen unterschiedlichen fibrillären Strukturen zu einem gewissen Grad sowohl Progression als auch klinische Manifestation durch die Akkumulation in bestimmten Zelltypen bzw. Hirnarealen beeinflussen können [97]. Am häufigsten manifestieren sich α-Synucleinopathien in Krankheiten mit Lewy-Körperchen einschließlich PD, Parkinson mit Demenz, Demenz mit Lewy-Körperchen sowie multiple Systematrophie [46, 62, 86, 99]. Neuerdings werden sowohl die reine Dysautonomie als auch die idiopathische REM-Schlafstörung (englisch: *rapid eye movement*, rasche Augenbewegung, REM) als prodromale α-Synucleinopathien definiert. Insbesondere bei Patienten mit einer idiopathischen REM-Schlafstörung wurde in 80% der Fälle im späteren Krankheitsverlauf eine Progression zu PD, Demenz mit Lewy-Körperchen oder multiplen Systematrophie determiniert [62, 93, 97, 100].
Obwohl sich bei PD als auch bei Demenz mit Lewy-Körperchen Einschlusskörper in Neuronen oder Neuriten nachweisen lassen, manifestieren sich beide Krankheiten in unterschiedlichen klinischen Symptomen [46]. Bei PD, der häufigsten Krankheit unter den α-Synucleinopathien, ist das Auftreten von Lewy-Körperchen mit einem progressiven Verlust von dopaminergen Neuronen in der Substantia Nigra verbunden, was sich in motorischen Symptomen einschließlich Bradykinesie, Ruhetremor, Rigidität sowie posturale Instabilität manifestiert [93, 94, 100]. Zusätzlich zu den motorischen Einschränkungen des Parkinsonismus entwickeln etwa 90% der Patienten mindestens ein nicht-motorisches Symptom wie beispielsweise Obstipation, Orthostase sowie Harn- bzw. Stuhlinkontinenz [93, 100]. Neben der Akkumulation von α-Synuclein zählen sowohl lysosomale als auch proteosomale Beeinträchtigungen, mitochondriale Dysfunktion, Neuroinflammation und erhöhte Eisenwerte zu den klinischen Charakteristika von PD [94]. Die Demenz mit Lewy-Körperchen unterscheidet sich von PD durch die Entwicklung einer Demenz innerhalb des ersten Jahres. Während der neuronale Verlust bei PD insbesondere den Hirnstamm sowie das limbische System betreffen, überwiegt die Neurodegeneration bei Demenz mit Lewy-Körperchen im Neocortex, was Symptome wie fluktuierende Kognition, wiederkehrende visuelle Halluzinationen und REM-Schlafstörungen verursacht [93, 94, 100]. Im Gegensatz zu PD und Demenz mit Lewy-Körperchen akkumuliert α-Synuclein bei der multiplen Systematrophie im Zytoplasma von Oligodendriten der Gliazellen zu sogenannten gliazytoplasmatischen Einschlusskörpern, was zur Neurodegeneration in Bereichen der Substantia Nigra, Cerebellum, Nervenkerne der Pons, Striatum sowie Rückenmark führt. Klinisch manifestieren sich diese Schädigungen sowohl als Parkinsonismus (Rigor, Bradykinesie, posturale Instabilität, Haltetremor), Kleinhirnanomalien (Ataxie, Dysmetrie, Nystagmus) sowie autonome Insuffizienz (orthostatische Hypotonie, Obstipation, Harn- und Stuhlinkontinenz) [46, 97, 100].

1.2.2.4 DISC1opathie

Das *Disrupted-in-Schizophrenia 1* (DISC1) Gen wurde innerhalb einer großen schottischen Familie aufgrund einer Chromosomentranslokation t(1;11) (q42.1;q14.3) als ein Risikofaktor für ein breites Spektrum chronisch mentaler Erkrankungen identifiziert. 2009 wurde der Begriff „DISC1opathie“ eingeführt, der eine Subgruppe chronisch mentaler Erkrankungen beschreibt, welche die Fehlfaltung, Misassemblierung und Aggregation des DISC1-Proteins gemein haben [101]. Hierzu zählen beispielsweise Schizophrenie sowie rekurrente affektive Störungen einschließlich bipolarer Störung und unipolarer Depression [43, 102]. Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Proteinopathien resultiert die Fehlfaltung von DISC1 zwar in einer Aggregation der Proteinmonomere, jedoch wurden bisher keine toxischen Eigenschaften nachgewiesen [103].

Struktur und Funktion des DISC1-Proteins

DISC1 wird ubiquitär als Gerüstprotein exprimiert und ist in mehreren Zellkompartimenten einschließlich Zellkern, Zentrosom, Zytoskelett, Mitochondrien sowie in Axonen und Synapsen lokalisiert [104, 105]. Als Gerüstprotein vermittelt es den Zusammenhalt und reguliert die Aktivität verschiedener Proteine, welche an Signaltransduktionswegen beteiligt sind, wobei derzeit Interaktionen mit mehr als 300 Bindepartner darunter Huntingtin, Dopaminrezeptor D2 und *nuclear distribution element-like protein 1* (NDEL1) beschrieben sind [43, 102, 106]. Folglich ist DISC1 an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt. Studien haben gezeigt, dass DISC1 bei der Entstehung von Verhaltensstörungen sowie der Aufrechterhaltung der psychischen Gesundheit eine Schlüsselrolle einnimmt. Darüber hinaus scheint DISC1 in der neuronalen Entwicklung einschließlich in der neuronalen Proliferation, Differenzierung, Migration und Bildung von Synapsen involviert zu sein [102, 105, 107].

DISC1 wird durch das DISC1-Gen kodiert, welches auf Chromosom 1q42 lokalisiert ist und 13 Exons enthält. Durch alternatives Spleißen können im menschlichen Körper unterschiedlich lange Isoformen exprimiert werden. Die bekanntesten Isoformen bestehen aus 369 Aminosäuren (extrem kurze Spleißvariante), 678 Aminosäuren (kurze Spleißvariante) oder 832 Aminosäuren (lange Spleißvariante), wobei das Volllängenprotein 854 Aminosäuren umfasst [105, 108].

Obwohl der Zusammenhang zwischen DISC1 und schweren psychischen Erkrankungen bereits vor über zwei Jahrzehnten demonstriert und seitdem in einer Vielzahl unabhängiger Studien bestätigt wurde, stehen derzeit immer noch keine vollständigen Strukturinformationen des 93,6 kDa großen schwer löslichen Volllängenproteins zur Verfügung [102, 105, 109]. Hierbei wird angenommen, dass die N-terminalen Region intrinsisch ungeordnet vorliegt, durch Exon 1 und 2 kodiert wird und voraussichtlich bis zu 350 Aminosäuren umfasst (siehe Abbildung 9). Im Gegensatz zur N-terminale Domäne weist die C-terminale Domäne, welche wahrscheinlich aa 351-854 umfasst und durch Exon 3 bis 13 kodiert wird, eine höhere

Konservierung auf. In diesem Bereich wurden sowohl α-Helices als auch Doppelwendelhelices (englisch: *coiled-coil*) gefunden. Der Bereich zwischen aa 400-500 wurde als Selbstassemblierungsdomäne identifiziert, welche die Ausbildung quartärer Strukturen wie funktionelle Dimere, Oligomere und Multimere ermöglicht. Diese Domäne ist essenziell für die kortikale Entwicklung [109-111]. Des Weiteren wurden innerhalb einer Studie von Yerabham et al. [109] lösliche Proteine durch *Expression of Soluble Proteins by Random Incremental Truncation* (ESPRIT) exprimiert und analysiert. Hierbei wurden die vier Domänen „D“, „I“, „S“ und „C“ gefunden, die sowohl löslich als auch strukturiert vorliegen und die Bereiche zwischen aa 257-383, aa 539-655, aa 635-738 sowie aa 691-836 umfassen [102, 109].
Innerhalb der C-terminalen Region weisen mehrere Bereiche ein erhöhtes Aggregationspotential auf, wobei der Grad der Assemblierung der entstehenden DISC1-Species variiert. So ist der Bereich zwischen aa 765-854 mit der Dimerisierung von DISC1 assoziiert, während intermolekulare Wechselwirkungen von DISC1 in den Bereichen zwischen aa 668-747 mit der Bildung größere Aggregate wie Oktamere einhergehen, wobei diese wiederum die Interaktion mit NDEL1 fördern [102, 110, 111].

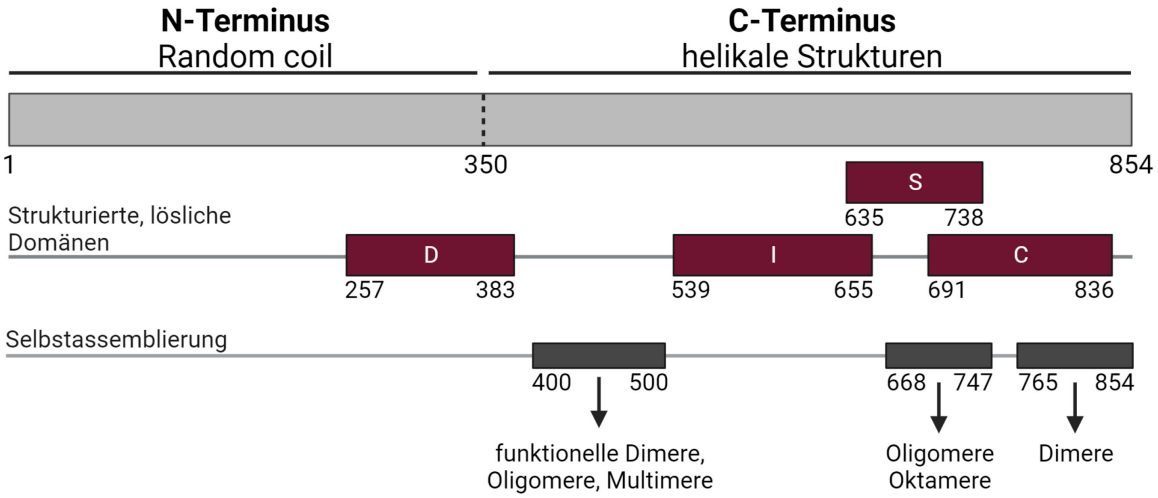


Abbildung 9 – Schematische Darstellung des DISC1-Volllängenproteins. Das aus 854 Aminosäuren bestehende DISC1-Volllängenprotein kann in die intrinsisch ungeordnete N-terminale Domäne (aa 1-350) sowie die durch helikale Strukturen (α-Helices und Doppelwendelhelices) gekennzeichnete C-terminale Domäne (aa 351-854) unterteilt werden. Darüber hinaus wurden mittels ESPRIT-Analysen vier weitere Domänen (rot) determiniert, welche sowohl löslich als auch strukturiert vorliegen: D-Domäne (aa 257-383), I-Domäne (aa 539-655), S-Domäne (aa 635-738) und die C-Domäne (aa 691-836). Innerhalb der C-terminalen Region wurden mehrere Bereiche (dunkelgrau) identifiziert, die mit der Selbstassemblierung von DISC1 assoziiert werden können. Die sogenannte Selbstassemblierungsdomäne (aa 400-500) ermöglicht die Assemblierung von funktionellen Dimeren, Oligomeren und Multimeren, wohingegen die Bereiche aa 765-854 mit der Assemblierung von Dimeren und aa 668-747 mit der Assemblierung von Oligomeren bzw. Oktameren assoziiert werden können. Modifizierte Darstellung nach Soares et al., Cukkemane et al. und Yerabham et al. [102, 105, 109], erstellt mit BioRender.com.

Aggregation des DISC1-Proteins

Auf welchen Mechanismen die Aggregation und der Funktionsverlust von DISC1 basiert, ist derzeit noch nicht vollständig geklärt [47]. Im Zusammenhang mit chronisch mentalen Erkrankungen scheinen insbesondere strukturelle Veränderungen der C-terminalen Region des DISC1-Proteins die Aggregatbildung zu begünstigen. Diese Veränderungen können entweder durch genetische Mutationen hervorgerufen werden oder sporadisch durch proteolytische Degradierung, posttranskriptionale oder posttranslationale Modifikationen entstehen [43, 102, 109, 110, 112]. Die Erhöhung der intrazellulären DISC1-Konzentration durch Überexpression bei gleichzeitig beeinträchtigter Proteostase korreliert mit einer gesteigerten Aggregatbildung, wobei für das DISC1-Volllängenprotein sowohl kleine Dimere, mittelgroße Oktamere sowie größere, unlösliche Aggregatspezies beschrieben wurden. Dimere und Oktamere scheinen frei im Zytoplasma vorzuliegen, wohingegen große Aggregate in Form von unlöslichen Aggresomen akkumulieren [110-112]. DISC1-Aggregate weisen zudem Prion-ähnliche Mechanismen auf, indem sie endogenes lösliches DISC1 rekrutieren und dadurch die funktionelle Aktivität von DISC1 in der Zelle reduzieren. Darüber hinaus wurde zudem die Rekrutierung anderer Proteine wie beispielsweise Dysbindin zu den Aggresomen beschrieben [107, 112].

Da DISC1 als Scaffold-Protein an einer Vielzahl von zellulären Prozessen einschließlich der neuronalen Entwicklung involviert ist, kann eine durch Aggregation hervorgerufene Dysfunktion schwerwiegende Folgen für die Zellfunktion, neuronale Entwicklung und psychische Gesundheit haben [102, 105, 107]. So verlieren beispielsweise unlösliche DISC1-Aggregate die Fähigkeit, mit NDEL1 zu interagieren, wodurch die Assemblierung von Neurofilamenten, die Neurogenese und Ausbildung von Neuriten innerhalb der neuronalen Entwicklung beeinträchtigt werden [103, 113]. Des Weiteren stehen die Bildung unlöslicher DISC1-Aggregate sowohl mit einem gestörten intrazellulären Transport von Mitochondrien als auch mit einer beeinträchtigten sensorischen Reizweiterleitung im Zusammenhang [43, 47, 112].

Genetische Mutationen, welche die C-terminale Struktur des DISC1-Proteins verändern, stehen im Zusammenhang mit einer erhöhten Aggregationsneigung sowie einer gesteigerten Akkumulation unlöslicher DISC1-Spezies. Hierzu zählen sowohl die balancierte Translokation, Einzelnukleotidpolymorphsimen S704C [43, 111, 113, 114] oder L607F [105, 114, 115] als auch Rasterschubmutation [43, 109]. Des Weiteren können sporadische Faktoren wie oxidativer Stress, eine erhöhte lokale Dopaminkonzentration und das Vorhandensein von trunkierten DISC1-Fragementen das Aggregationspotenzial von DISC1 erhöhen. Letztere können durch proteolytische Degradation, posttranskriptionale Modifikationen wie alternatives Spleißen oder auch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung entstehen [43, 47, 103, 110]. In ersten Studien wurde zudem eine Prion-artige Verbreitung von DISC1-

Aggregaten determiniert, wobei kleine C-terminale Fragmente durch direkten Zell-Zell-Kontakt transmittieren und Aggregate bestehend aus DISC1-Volllängenprotein mittels Nanotunnel in benachbarte Zellen gelangen. Kleine DISC1-Aggreagte weisen dabei eine schnellere Transmission auf als größere, jedoch ist die Effizienz des Zell-Zell-Transfers der DISC1-Aggregate deutlich geringer als die von Aβ-, Tau- oder α-Synuclein-Aggregaten [43, 47, 112, 116].

Klinische Manifestation und DISC1-Akkumulation

Wie zuvor beschrieben akkumulieren große DISC1-Aggregate intrazellulär zu Aggresomen, welche durch die Assoziation mit der MTOC perinukleär immobilisiert vorliegen und von Vimentinfilamenten umgeben sind. DISC1-Aggregate innerhalb der Aggresome weisen zudem eine Kolokalisation mit γ-Tubulin, S26 Proteosom, Ubiquitin und Hitzeschockprotein 70 auf. Darüber hinaus sind diese DISC1-Akkumulationen selbst in Gegenwart des starken Detergenz Sarkoysl unlöslich [112, 113, 117]. Ihr Vorhandensein wurde biochemisch in *post mortem* Gehirnen untersucht, wobei dies lediglich für etwa ein Fünftel der Proben von chronisch mental erkrankten Personen, die an Schizophrenie, bipolaren Störungen oder Depressionen litten, bestätigt werden konnte. In Proben von gesunden Kontrollen oder Kontrollen, welche an einer neurodegenerativen Erkrankung wie AD, Demenz mit Lewy-Körperchen oder frontotemporale Demenz litten, wurden hingegen keine DISC1-Akkumulationen gefunden [103, 113].

Ansonsten wurden bisher keine weiteren spezifischen neuropathologischen Veränderungen im Gehirn von chronisch mental erkrankten Personen eruiert, die für eine klinische Diagnose genutzt werden könnten. Es wurden zwar eine leichte Vergrößerung des dritten Ventrikels sowie vereinzelte zelluläre Veränderung der kortikalen Neuronen in *post mortem* Hirnen gefunden, jedoch ist der klinische Nutzen derzeit noch zu gering [47, 62, 113, 118]. Das Fehlen validierter Biomarker in Körperflüssigkeiten wie CSF oder Blut trägt dazu bei, dass die Diagnose chronisch mentaler Erkrankungen, vor allem die sporadisch auftretenden Fälle, derzeit lediglich auf der subjektiven Einschätzung des Arztes und der klinischen Ausprägung basiert [113, 119]. Letzteres kann durch die Heterogenität der klinischen Ausprägung erschwert sein. So können die Symptome einzelner Individuen derselben Erkrankung stark variieren, zum anderen kann sich die Symptomstärke eines Individuums aufgrund von zeitlich variierenden Krankheitsschüben verändern. Um dennoch im Klinikalltag eine Diagnose stellen zu können, werden derzeit Kombinationen an charakteristischen Symptomclustern untersucht und Krankheitsbilder anhand der DSM-IV oder ICD-10-Klassifizierung differenziert [62, 113, 118-120].

Chronisch mentale Erkrankungen sind durch eine fortschreitende Beeinträchtigung der sozialen sowie kognitiven Funktionen gekennzeichnet, wobei Schizophreniepatienten an der schwerwiegendsten kognitiven Beeinträchtigung leiden [62, 112, 113, 120]. Schizophrenie manifestiert sich klinisch durch komplexe, lebenslange rekurrente Positivsymptome wie

Halluzinationen, Wahnvorstellungen und inhaltliche Denkstörungen sowie progressive Negativsymptome wie Antriebslosigkeit, Apathie und soziale Isolation. Hinzu kommen zudem kognitive Symptome wie Beeinträchtigung des Gedächtnisses und der Aufmerksamkeit [103, 113, 118, 121]. Die Beeinträchtigung der visuellen und akustischen Wahrnehmung, der Sensibilität, der Kognition und der Emotionen kann dabei so stark ausgeprägt sein, dass Betroffene den Bezug zu sich selbst oder ihrer Umwelt gänzlich verlieren. Darüber hinaus kann es in schweren Fällen zu einer dissoziativen Identitätsstörung kommen [62, 118, 120, 122].
Affektive Störungen hingegen sind insbesondere durch zeitlich wiederkehrende Episoden gekennzeichnet, wobei zwischen depressiven Phasen wie beispielsweise extreme Traurigkeit, soziale Isolation und Antriebslosigkeit sowie manischen Phasen wie extreme Heiterkeit, Selbstüberschätzung und auch Aggressivität differenziert wird. Beginn, Dauer und Stärke der klinischen Ausprägung affektiver Störungen sind von mehreren Faktoren einschließlich genetischer Prädisposition, Geschlecht, sozialem Status, Persönlichkeitsstörung, Virusinfektionen, Drogenkonsum sowie frühkindliches Trauma abhängig [62, 118, 120].

1.2.3 Komorbide Proteinopathien und heterogene Proteinaggregate

Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, können amyloide Proteinaggregate die Fehlfaltung sowie Aggregation von Proteinmonomeren derselben Spezies initiieren. Jedoch haben *in-vitro* sowie *in-vivo* Studien bestätigt, dass unter bestimmten Umständen Homoaggregate beispielsweise bestehend aus Aβ-Peptiden die Fehlfaltung und Aggregation anderer Proteine wie Tau oder α-Synuclein auslösen können. Dieser Vorgang wird als heterogenes Seeding oder Cross-Seeding bezeichnet, was das Auftreten komorbider Proteinopathien erklärt. Daher können Aβ- bzw. Tau- und α-Synuclein-Aggregate zusätzlich zu den entsprechenden Proteinopathien auch in anderen Erkrankungen vorkommen [10, 17, 99, 123]. So sind beispielsweise pathologische Veränderung des Aβ-Peptids in Krankheiten mit Lewy-Körperchen, insbesondere Demenz mit Lewy-Körperchen oder PD mit Demenz, nachweisbar, wobei Lewy-Körperchen ebenfalls in AD-Patienten auftreten [46, 124]. Weitere Studien haben zudem einen Zusammenhang zwischen psychischen Erkrankungen und dem Vorhandensein von aggregiertem Aβ-Peptid, α-Synuclein- sowie Tau-Protein bestätigt. Zum einen treten Negativsymptome wie depressive Störungen sowie Positivsymptome wie Halluzinationen sowohl bei PD- als auch bei AD-Patienten auf, zum anderen besitzen Menschen mit Schizophrenie ein erhöhtes Risiko an AD, PD oder einer anderen Krankheit mit Parkinsonismus zu erkranken [62, 112, 120, 125].
Insbesondere im Rahmen der Medikamentenentwicklung sind solche komorbiden Proteinopathien von Wichtigkeit, da der klinische Verlauf durch die Co-Pathologie möglicherweise beeinträchtigt wird. Folglich ist eine entsprechende Entwicklung und Validierung von Biomarker für die Diagnose von komorbide Proteinopathien ebenfalls

obligatorisch, was jedoch aufgrund der durch die pathologische Heterogenität erzeugte reduzierte statistische Trennschärfe sowie Assay-Sensitivität besonders herausfordernd ist [46, 90, 99, 123]. Da das Auftreten von komorbiden Proteinopathien mit dem Vorhandensein genetischer Mutationen oder Prädispositionen korreliert, kann die diagnostische Sensitivität durch Kombination mit diesen genetischen Markern gesteigert werden [46].
Nicht nur komorbide Proteinopathien, sondern auch Proteinaggregate, bestehend aus zwei oder mehreren Arten von krankheitsassoziierten Proteinen, sogenannte Heteroaggregate, können ursächlich für die Überlappung klinischer Ausprägungen von Proteinopathien sein. So wurden beispielsweise Heteroaggregate bestehend aus Aβ und α-Synuclein, α-Synuclein und Tau, DISC1 und Huntingtin bzw. DISC1 und *Transactive response DNA binding protein 43 kDa* (TDP-43) beschrieben [43, 126]. Daher sind analytische und diagnostische Verfahren, die einen zeitgleichen Nachweis verschiedener aggregierter Proteine sowie Heteroaggregate durch Multiplexing ermöglichen von großem Interesse. So können nicht nur Zusammenhänge zwischen einzelnen amyloiden Proteinen, sondern auch Zusammenhänge zwischen verschiedenen Proteinopathien eruiert werden [29, 123].

1.2.4 Behandlungskonzepte

In Deutschland sind bisher lediglich Medikamente zugelassen, welche die Symptomatik von Proteinfehlfaltungserkrankungen reduzieren, jedoch nicht fähig sind, das Fortschreiten der jeweiligen Erkrankung zu beeinflussen. Beispiele für die Behandlung der Symptomatik von AD sind Hemmstoffe der Acetylcholinesterase (Donepezil, Galantamin, Rivastigmin) sowie ein Antagonist des NMDA-Rezeptors (Memantin) [51, 62, 127]. Im Gegensatz dazu werden Levodopa, Carbidopa und Dopaminagonisten zur Behandlung von PD eingesetzt [62, 93, 100]. Da der zugrundliegende Pathomechanismus aller Proteinfehlfaltungserkrankungen die Fehlfaltung, Aggregation und Akkumulation von sonst löslichen und funktionellen Proteinen zu amyloiden Strukturen ist, stellen sowohl fehlgefaltete Proteinaggregate sowie deren Aggregationsprozess das primäre Ziel verschiedener krankheitsverändernder Behandlungsstrategien dar. Derzeit befinden sich mehrere Hundert Wirkstoffkandidaten zur Behandlung von Proteinfehlfaltungserkrankungen in der klinischen Entwicklung, wobei der Großteil eine krankheitsverändernde Wirkung anstrebt [51, 128, 129].
Um die Fehlfaltung sowie Aggregation von amyloiden Proteinen zu verhindern, kann die native Konformation durch spezifische Liganden kinetisch stabilisiert werden. Dieser Ansatz wurde zur Behandlung der Transthyretin-Amyloidose bereits erfolgreich umgesetzt [2, 15, 130, 131]. Eine weitere Strategie basiert auf der Destabilisierung und Disassemblierung bereits aggregierter Spezies. Dies kann entweder direkt durch den Einsatz spezifischer Liganden oder indirekt durch aktive bzw. passive Immunisierung erfolgen. Ein Beispiel hierfür ist der in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Willbold entwickelte Wirkstoffkandidat RD2, welcher Aβ-

Monomere stabilisiert und dadurch die Disassemblierung von Aβ-Aggregaten gewährleistet [11, 132, 133]. In den USA wurden mittlerweile der monoklonale Antikörper Aducanumab (Zulassung 2021) und der humanisierte monoklonale Antikörper Lecanemab (beschleunigte Zulassung 2023) durch die *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen. Beide Antikörper zeigten in den klinischen Studien eine Reduzierung der Aβ-Plaques und zumindest eine Verlangsamung der kognitiven Beeinträchtigung.

Weitere therapeutische Ansätze richten sich gegen mögliche Ursachen und Folgen der Fehlfaltung bzw. Aggregation. So stehen zudem Prozesse wie die Nukleation, Elongation und Prion-artige Vermehrung und Verbreitung im Fokus [2, 15, 27, 134]. Um die kritische Konzentration an fehlgefalteten Proteinen zu reduzieren und somit die Keimbildung und das weitere Wachstum zu verhindern, könnte die Proteinexpression beispielsweise durch Reduzierung der Konzentration an Boten-Ribonukleinsäure oder durch Verwendung Ribonukleinsäure-Interferenz- als auch Anti-Sense-Oligonukleotid-Technologien gehemmt werden [11, 21]. Neben einer reduzierten Proteinexpression könnten sowohl die Inhibierung posttranslationalen Modifikationen sowie eine Steigerung proteostatischer Prozesse beispielsweise durch induzierte Aktivierung oder Hochregulierung von Chaperonen, Steigerung der Ubiquitinierung sowie induzierte Autophagie die Konzentration an amyloiden Proteinen senken. Insbesondere im Falle der Therapie von AD befinden sich mehrere Sekretaseinhibitoren und Sekretasemodulatoren in der klinischen Entwicklung, welche die Produktion von aggregierendem Aβ reduzieren sollen [11, 15, 128]. Darüber hinaus könnte die Stabilisierung bestehender Aggregate ebenfalls von therapeutischem Wert sein, da sie deren Fragmentierung sowie Wachstum und damit die Vermehrung und Verbreitung neuer Aggregationskeime in das umliegende Gewebe und Peripherie verhindert [2, 15].

1.3 Diagnosestrategien

Proteinfehlfaltungserkrankungen und insbesondere neurodegenerative Erkrankungen werden in der klinischen Routine anhand der Anamnese, klinischer Erscheinung, Symptomatik und neurophysiologischen Tests diagnostiziert [127, 135-137]. Da sich Proteinfehlfaltungserkrankungen jedoch erst im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf klinisch manifestieren, bleiben beispielsweise neurodegenerative Prozesse lange unentdeckt. Zudem ist die symptombasierte Differenzialdiagnose oft fehlerhaft, da sich gerade zu Beginn der klinischen Manifestation Symptome verschiedener Proteinfehlfaltungserkrankungen gleichen. Nur in Ausnahmefällen werden zur Erstellung der Differenzialdiagnose sowohl bildgebende Verfahren wie MRT oder PET als auch Biomarkeranalysen in Liquor angewandt [67, 127]. Bildgebende Verfahren ermöglichen die direkte oder indirekte Darstellung von Proteinakkumulationen, indem Veränderungen der Gehirnstruktur und Veränderungen der Gehirnaktivität nachgewiesen werden können. So können beispielsweise Aβ-Plaques mittels

Amyloid-PET, Neurofibrillenbündel mittels Tau-PET, Expressionslevel von Dopamintransportern mittels Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie, eine vorhandene Gehirnatrophie mittels MRT sowie ein reduzierter Glukosestoffwechsel mittels FDG-PET als Folge der Neurodegeneration diagnostiziert werden [57, 62, 67, 138-140]. Aufgrund hoher Kosten, limitierter Verfügbarkeit und der Strahlenbelastung bzw. Magnetfeldstärken sind derzeitige bildgebende Verfahren nicht für jeden Patienten anwendbar und somit nicht für Routinezwecke geeignet [12, 20, 55]. Im Vergleich dazu sind Biomarkeranalysen in Liquorproben kostengünstiger. Jedoch handelt es sich bei der notwendigen Lumbalpunktion um ein invasives Probeentnahmeverfahren, welches Risiken sowie Unannehmlichkeiten für den Patienten birgt [141, 142]. Dennoch haben Liquor-basierte Biomarker aufgrund der Interaktion mit der ISF das Potenzial, pathophysiologische Veränderungen des Gehirns akkurat abzubilden. Mittels diagnostischer Verfahren wie beispielsweise des enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (englisch: *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) können Proteinmonomere wie Aβ, tTau oder pTau quantifiziert werden [51, 57, 62, 67, 141].

1.3.1 Oligomer-basierte Diagnostik

Wie bereits in Kapitel 1.1.2 beschrieben, sind es die löslichen Proteinoligomere, die im Gegensatz zu ihrer monomeren als auch akkumulierten Form eine erhöhte Toxizität aufweisen. Veränderungen der Oligomerkonzentration im Körper stellen somit einen direkten Biomarker sowohl für diagnostische als auch therapeutische Zwecke dar [15, 17, 20, 132]. Insbesondere im Zusammenhang mit den zuvor beschriebenen krankheitsverändernden Behandlungsstrategien (siehe Kapitel 1.2.4), könnten so klinische Studien bezüglich der Patientenselektion bzw. Stratifizierung optimiert und darüber hinaus eine personalisierte Medizin (Wirksamkeit, Verträglichkeit und Dosierung) ermöglicht werden [12, 20, 132].
Um Oligomere quantifizieren und als diagnostischen sowie therapeutischen Biomarker nutzen zu können, bedarf es hochsensitive und hochspezifische Nachweismethoden. Sowohl die geringe Konzentration in Körperflüssigkeiten, die heterogenen Eigenschaften wie Größe, Struktur und dynamisches Verhalten sowie die Vergänglichkeit von Oligomeren erschweren die Entwicklung solch akkurater Nachweisverfahren (siehe Tabelle 1) [12, 20]. Zudem können sich fehlgefaltete und aggregierte Proteine Prion-artig vermehren und im Organismus durch verschiedene Mechanismen verteilen (siehe Kapitel 1.1.2). Folglich besteht eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, Proteinoligomere auch außerhalb des betroffenen Gewebes in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Liquor, Speichel, Blut, Urin, Stuhl sowie Tränenflüssigkeit detektieren zu können, wobei geringere Konzentrationen und Interferenzen der Probenmatrix zu erwarten sind [12, 17, 141]. Eine weitere Herausforderung ist die Etablierung eines geeigneten Kalibrationsstandards, da synthetische Oligomere sowohl eine hohe strukturelle Diversität als auch eine reduzierte Stabilität aufweisen [20, 143].

Tabelle 1 – Technische Herausforderungen innerhalb der Entwicklung eines Assays zur Quantifizierung von Proteinoligomeren. Dargestellt sind die einzelnen Komplexitäten mit einer kurzen Beschreibung der Problematik sowie die Ziele, die innerhalb der Assay-Entwicklung umgesetzt werden sollten. Tabelle in Anlehnung an Kulenkampff et al. [20]**.**

Problematik	Beschreibung	Anforderungen an den Assay
Geringe Abundanz	(Sub)femtomolare Konzentrationen von Proteinoligomeren in CSF oder Plasma	Hohe Sensitivität, bestenfalls Einzelpartikelsensitivität
Interferenz mit Monomer	Überschuss an Proteinmonomer in der Probe	Insensitivität gegenüber Proteinmonomer
Heterogenität	Proteinoligomere sind polymorph in Form, Molekulargewicht, Struktur und dynamischen Verhalten	Mögliche Differenzierung der beschriebenen Eigenschaften
Generische Konformations-eigenschaften	Cross-β-Struktur ist generisch für amyloide Proteine → Differenzierung zwischen Oligomeren und Fibrillen bzw. zwischen verschiedenen Proteinen wie Aβ und Tau bei Verwendung von konformationsspezifischen Antikörpern erschwert	Differenzierung zwischen Oligomeren und Fibrillen
Stabilität	Proteinoligomere sind nur vorübergehend stabil → Dissoziierung zu Monomeren → Aggregation zu Fibrillen	Herausforderung für Präanalytik: schnelle Durchführung und Erfassung der Messdaten, Verbesserung der Stabilität durch Pufferoptimierung
Probenmatrix	Proteinoligomere können mit Matrix interferieren → Mögliche Änderung der Struktur, Komposition oder posttranslationale Modifikation → Maskierung der Epitope	Bewertung und ggf. Reduzierung der Matrixeffekte
Kalibration	Übersetzung der Messwerte in molare Konzentrationen → Modell für Proteinoligomere aufgrund der polymorphen, transienten Eigenschaften erschwert	Entwicklung eines hochreinen, gut charakterisierten und stabilen Kalibrationsstandard, der bestenfalls die Gesamtheit an Proteinoligomeren abbilden kann

Bei den am häufigsten verwendeten Nachweismethoden handelt es sich um Fluoreszenzmikroskopie-basierte Verfahren oder um Immunoassays einschließlich Bead-basierte Einzelmolekül-Assays, Western Blot oder ELISA [12, 17, 20]. Insbesondere bei Letzterem wird die Spezifität gegenüber Oligomeren bzw. Intensivität gegenüber monomeren Proteinspezies entweder durch strukturspezifische Antikörper oder mit konkurrierenden Fänger- und Detektionsantikörpern, welche dasselbe oder überlappende Epitop erkennen, erzielt [144-148]. Darüber hinaus kann die Quantifizierung von Oligomeren mittels Massenspektrometrie, Biosensorik, chromatographischen Verfahren sowie Amplifikations-Assays wie beispielsweise *protein misfolding cyclic amplification* oder *real-time quaking-induced conversion* (RT-QuIC) erfolgen [12, 17, 20]. Eine weitere Methode, die hochselektiv

gegenüber aggregierter Proteinspezies ist und Einzelpartikelsensitivität erlaubt, ist die sogenannte oberflächenbasierte Fluoreszenzintensitätsverteilungsanalyse (englisch: *surface-based fluorescence intensity distribution*, sFIDA) [20, 149].

1.3.2 sFIDA

sFIDA ist eine Plattformtechnologie, welche die Quantifizierung von Proteinaggregaten ermöglicht. Sie wurde 2007 für den diagnostischen Nachweis einzelner Prion-Protein-Aggregate in Hirnhomogenat- und Liquorproben von Scrapie-infizierten Hamstern und BSE-infizierten Rindern entwickelt [150-152] und anschließend für den klinischen Nachweis von Aβ-Aggregaten aus humanen Liquorproben optimiert [153-156]. Durch die Einführung eines Kalibrationsstandards [143, 157] sowie die Implementierung eines vollautomatisierten Liquid-Handling-Systems [158] wurde die Übertragung der sFIDA-Methode von der angewandten Forschung in die Routinediagnostik initiiert. Erste Studien bestätigten bereits das Potenzial der sFIDA-Technologie zukünftig als *in-vitro* Diagnostikum (IVD) eingesetzt zu werden, um bei der (Früh-)Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen wie AD oder PD zu unterstützen [153, 157-160]. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass die sFIDA-Technologie im Bereich der Medikamentenentwicklung für die Überprüfung des Wirkmechanismus (englisch: *mechanism of action*, MoA) nützlich ist [161]. Zukünftig könnte sFIDA sowohl für die Optimierung und Validierung eines Wirkstoffkandidaten (englisch: *Target Engagement*) sowie als therapiebegleitendes Diagnostikum (CDx) Anwendung finden.

1.3.2.1 sFIDA-Prinzip

Um die Quantifizierung einzelner Proteinaggregate zu ermöglichen, nutzt die sFIDA-Technologie eine Kombination aus einem Sandwich-ELISA und hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie, wodurch eine ausreichend hohe Sensitivität und Spezifität des erzielt wird (siehe Abbildung 10). Hierzu werden im ersten Schritt Fängerantikörper (im Folgenden als Capture-Antikörper bezeichnet) auf der Glasoberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach anschließender Blockierung der noch freien Glasoberfläche erfolgt die Inkubation mit der zu untersuchenden Probe, wobei sowohl monomere als auch aggregierte Proteinspezies eingefangen werden. Ungebundene Proteinspezies werden durch Waschen entfernt und die immobilisierten Proteinaggregate anschließend mit fluoreszenzkonjugierten Antikörpern (im Folgenden als Detektionsantikörper oder Detektionssonden bezeichnet) markiert. Da sowohl Capture- als auch Detektionsantikörper gegen das gleiche bzw. überlappende Epitop gerichtet sind, werden lediglich aggregierte Spezies detektiert, da im Falle von einem Monomer das Epitop bereits durch den Capture-Antikörper blockiert ist. Dadurch gewährleistet der Assay eine Unempfindlichkeit gegenüber monomeren Spezies. Die Assay-Oberfläche wird anschließend mit hochauflösender interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (englisch:

total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM) abgelichtet. Im Gegensatz zu einem ELISA wird der Messwert nicht aus der mittleren Fluoreszenz einer Kavität (im Folgenden als Well bezeichnet), sondern aus einzelnen Pixeln, welche Intensitäten oberhalb eines gewissen Intensitätsschwellenwerts aufweisen, generiert. Die ermittelten Werte werden entweder im Falle einer Einkanalanalyse als Pixel Count oder im Falle einer Zweikanalanalyse als sFIDA Readout bezeichnet, wobei beide mit der Konzentration an Proteinaggregaten in der Probe korrelieren [55]. Durch Verwendung von Kalibrationsstandards können die Pixelwerte anschließend in molare Konzentrationen umgewandelt werden (siehe Kapitel 1.3.2.2) [143, 159]. Durch die Verwendung eines zweiten, mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markierten Detektionsantikörper kann die analytische Spezifität zusätzlich erhöht werden, da lediglich kolokalisierte Pixel, d.h. Proteinaggregate, die mindestens drei zugängliche Epitope aufweisen, gewertet werden. Zusätzlich wird die analytische Sensitivität erhöht, da durch die Auswertung der Kolokalisation das Hintergrundrauschen reduziert wird und einzelne Detektionssonden, die unspezifisch an die Assay-Oberfläche gebunden haben, nicht gewertet werden.

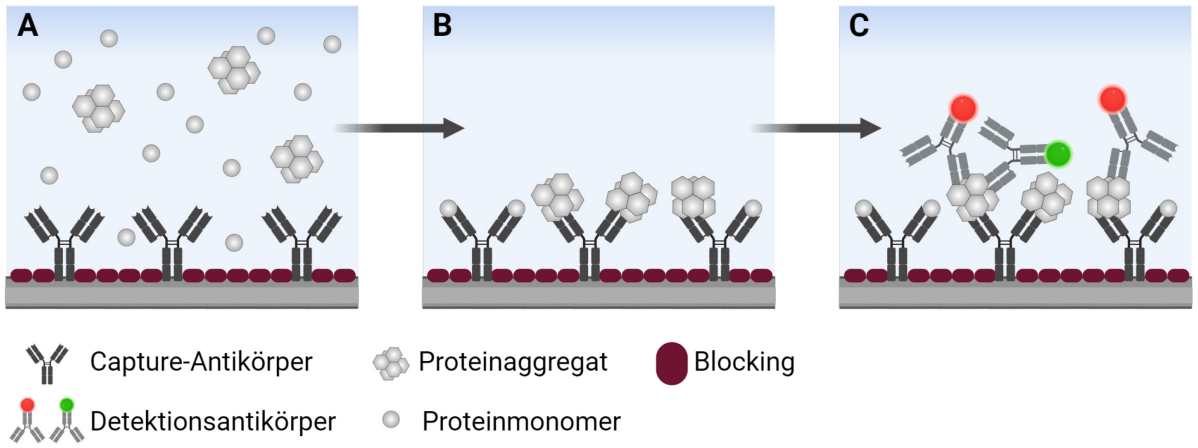


Abbildung 10 – Schematische Darstellung des Prozessablaufs der sFIDA-Technologie. (A) Nach der Immobilisierung der Capture-Antikörper und Blockierung freier Glasoberfläche wird die Probe im Well inkubiert. Hierbei werden sowohl monomeres als auch aggregiertes Protein auf der Oberfläche durch die Capture-Antikörper eingefangen. **(B)** Ungebundene Analyten werden durch mehrfaches Waschen entfernt. **(C)** Nach anschließender Markierung der gebundenen Proteinaggregate durch fluoreszenzmarkierte Detektionsantikörper wird die Assay-Oberfläche mittels TIRFM gescannt. Eigene Darstellung, erstellt mit BioRender.com.

1.3.2.2 Biokonjugierte Silikananopartikel als Kalibrationsstandards

Da Kalibrationsstandards neben der Übersetzung der Messwerte in molare Konzentrationen zudem der Beurteilung der Assay-Validität dienen, sind sie wesentliche Bestandteile von Immunoassays [55, 162]. Wie bereits in Kapitel 1.3.1 gezeigt, stellt die Wahl eines geeigneten Kalibrationsstandards für die Quantifizierung von Proteinaggregaten aufgrund ihrer Eigenschaften eine Herausforderung dar. Neben einer hohen Reinheit, einer guten

Charakterisierung und einer ausreichender Stabilität sollte der Kalibrationsstandard eine hohe Ähnlichkeit zum eigentlichen Analyten aufweisen [55].
Unter Berücksichtigung dieser Eigenschaften wurden 2016 von Hülsemann et al. protein-konjugierte Silikananopartikel (SiNaPs) als Kalibrationsstandard für die sFIDA-Technologie entwickelt, welche eine grundlegende Verbesserung für den Standardisierungsprozess von Oligomer-basierten diagnostischen Methoden darstellen [143].
Im Wesentlichen werden Grundkörper aus Siliziumoxid synthetisiert, wobei Größe und Morphologie über die eingesetzten Eduktmengen sowie Prozessparameter wie Temperatur, pH-Wert und Lösungsmittel variiert werden können [143]. Nach Einführung funktioneller Gruppen auf der homogenen Partikeloberfläche kann das gewünschte Protein wie beispielsweise α-Synuclein [159] oder Peptid wie beispielsweise Aβ [143, 158] in multipler Ausführung immobilisiert werden, sodass ein Aggregat imitiert wird. Die molare Konzentration der SiNaP-Stammlösung dient anschließend als Ausgangspunkt für die Verdünnungsreihe der Kalibrationsstandards und ermöglicht die Rückrechnung der determinierten Pixelwerte in molare Partikelkonzentrationen [55, 143].

1.3.2.3 Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie

Wie in Kapitel 1.3.2.1 beschrieben, erfolgt die Datenakquise im sFIDA mittels TIRFM. Anstatt die Fluorophore direkt mit Licht anzuregen, nutzt TIRFM das Phänomen der Totalreflexion (siehe Abbildung 11). Dafür wird Licht durch die Grenzschicht zweier Medien mit unterschiedlichen Brechungsindices geleitet. Ein Beispiel hierfür wäre das Glas eines Deckglases (höherer Brechungsindex, n_1) und eine wässrige Lösung (niedrigerer Brechungsindex, n_2). Trifft das Licht dabei in einem Winkel θ_1, der größer als der sogenannte kritische Winkel θ_2 ist, auf die Grenzschicht beider Medien, wird das gesamte Licht parallel zur Grenzfläche reflektiert [163-165]. Das reflektierte Licht erzeugt dabei ein elektromagnetisches Feld, welches als evaneszente Welle durch das Glas des Objektträgers in die wässrige Lösung eindringt. Da die Intensität des evaneszenten Feldes jedoch exponentiell mit der Wegstrecke zur Grenzschicht der beiden Medien abnimmt, werden lediglich Fluorophore mit einer maximalen Entfernung von 200 nm angeregt. Aufgrund der dadurch entstehenden minimalen Hintergrundfluoreszenz und der hohen axialen Auflösung eignet sich TIRFM im Vergleich zu anderen Lichtmikroskopietechniken für die Detektion von Einzelmolekülen [163-165].
sFIDA nutzt dieses Potenzial der Einzelpartikelsensitivität und unterscheidet sich daher essenziell von ELISA-Techniken, bei denen Messwerte auf mittleren Fluoreszenzintensität eines Wells basieren [157].

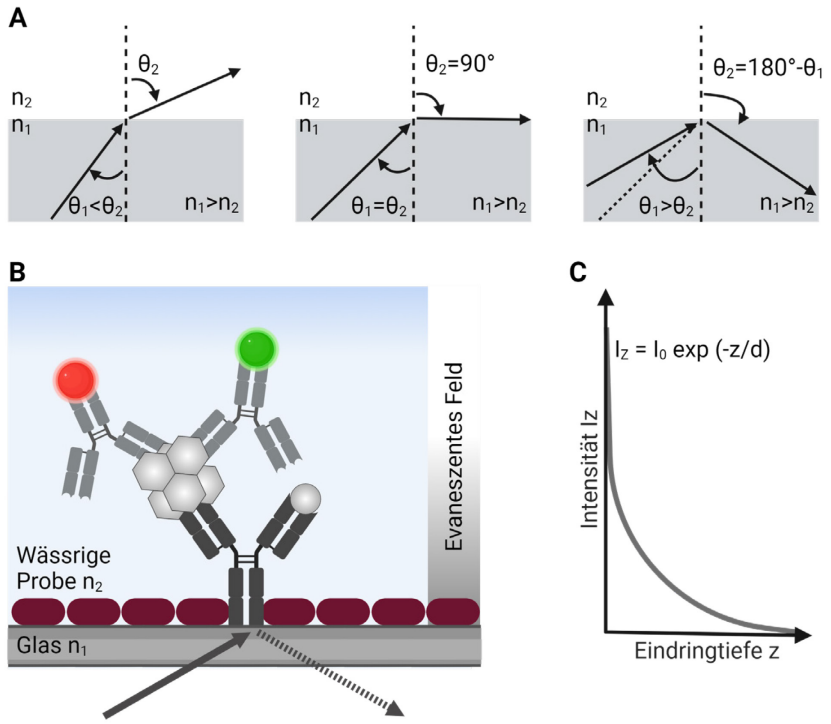


Abbildung 11 – Voraussetzung für Totalreflexion und das Nutzen des evaneszenten Feldes für die Anregung von Fluorophoren im sFIDA. (A) Trifft einfallendes Licht auf die Grenzschicht zweier Medien mit unterschiedlichen Brechungsindices (Glas = n_1, wässrige Probe = n_2), kann es je nach Einfallswinkel unterschiedlich abgelenkt werden. Solange der Einfallswinkel θ_1 kleiner (links) oder gleich (mittig) dem kritische Winkel θ_2 ist, wird der Lichtstrahl nicht vollständig reflektiert. Erst bei einem Einfallswinkel, der größer als der kritische Winkel ist (rechts), erfolgt die Reflektion des Lichtstrahls. **(B)** Um immobilisierte und mit Detektionssonden markierte Proteinaggregate zu detektieren, nutzt sFIDA Totalreflexion. Während das einfallende Licht vollständig an der Grenzfläche zwischen Glas und wässriger Probe reflektiert wird, wird ein elektromagnetisches Feld (evaneszentes Feld) erzeugt, welches als Welle durch die wässrige Lösung wandert und Fluorophore bis zu 200 nm oberhalb der Grenzschicht anregt. **(C)** Die Intensität dieses Feldes (I_z) nimmt exponentiell mit größer werdendem Abstand (z) zur Grenzfläche (d) ab. I_0 ist hierbei die Intensität des evaneszenten Feldes an der Grenzfläche (z = 0). Modifizierte Darstellung nach Verveer und Fish [163, 166], erstellt mit BioRender.com.

1.3.2.4 Bildanalyse

Die Analyse der TIRFM-Bilder erfolgt mittels der intern entwickelten Software sFIDAta. Die Auswertung erfolgt dabei auf Pixelebene, wobei aufgrund der verwendeten Kamera jedes TIRFM-Bild insgesamt 1.000.000 Pixel (1000 × 1000) umfasst. Da für die Erfassung der Bilder eine 14 Bit-Kamera verwendet wurde, kann jeder Pixel einen Intensitätswert zwischen 0 und 16.384 Graustufen einnehmen (siehe Abbildung 12A). Wie in Kapitel 1.3.2.1 beschrieben, wird für die Generierung der Pixel Counts bzw. sFIDA Readouts ein Intensitätsschwellenwert (im Folgenden als Cut-off bezeichnet) benötigt, um unspezifisches Signal wie Streulicht, Hintergrundrauschen der Kamera oder durch die Detektionssonden erzeugtes Hintergrund-rauschen von spezifischem Signal des Analyten zu unterscheiden.

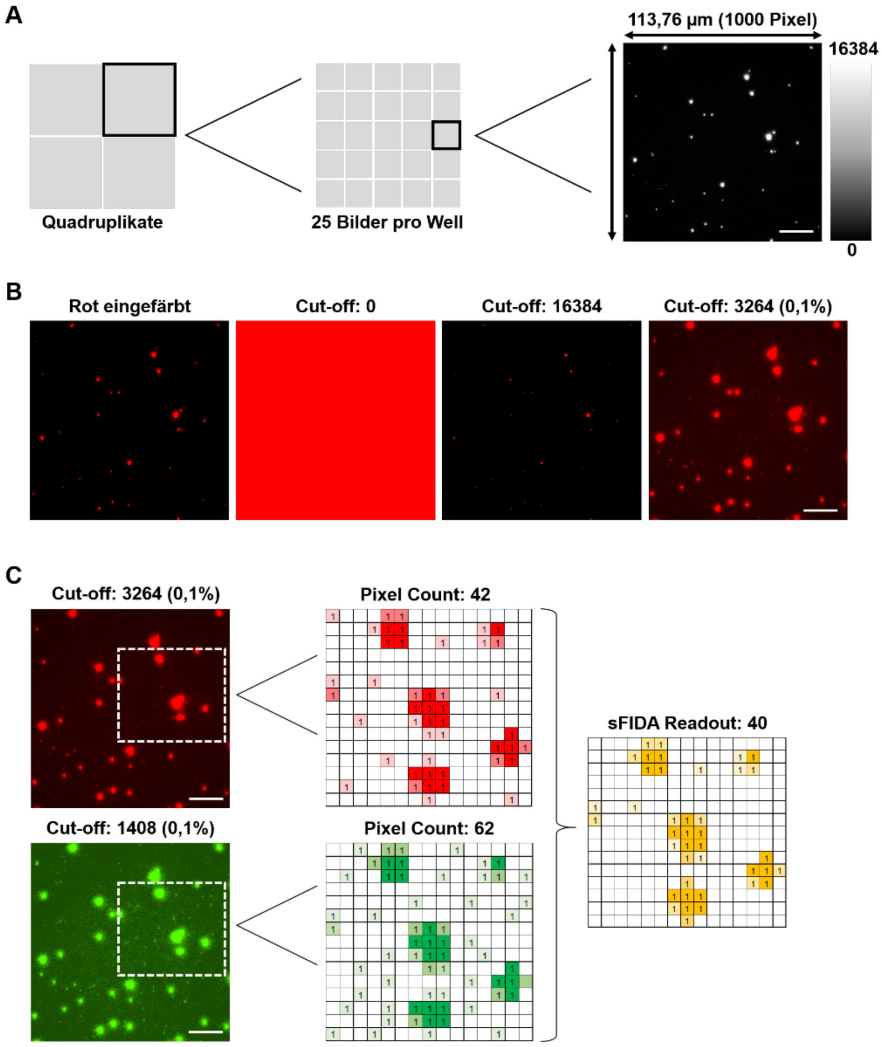


Abbildung 12 – Bildparameter, Einfluss des Cut-offs auf die Anzahl zu analysierender Pixel sowie die Kalkulierung des Messsignals anhand eines dual-color TIRFM-Bildes. (A) Jede Probe wird in Vierfachbestimmung auf die vorbereitete Assay-Oberfläche appliziert. Bei der anschließenden TIRFM-Messung werden pro Well 25 Bilder generiert, was 3,15% der Gesamtwellfläche entspricht. Jedes Bild (Kantenlänge 113,76 µm) umfasst 1000 × 1000 Pixel, wobei jeder Pixel aufgrund der verwendeten 14 Bit-Kamera 16.384 Graustufen annehmen kann. **(B)** Vor der Analyse werden die Rohdaten dem jeweiligen Fluoreszenzkanal entsprechend eingefärbt. Anschließend erfolgt die Ermittlung des für die Analyse notwendigen Cut-offs. Wird ein Cut-off von 0 angewandt, werden alle Pixel in die Analyse aufgenommen, wobei bei einem Cut-off von 16.384 lediglich die hellsten Pixel im Anschluss gezählt werden. **(C)** Um eine Vergleichbarkeit zwischen mehreren Experimenten zu gewährleisten, wird der Cut-off in der Regel über eine prozentuale Pixelanzahl z.B. 0,1% ermittelt. Im Anschluss werden die Pixel gezählt, die Intensitäten gleich oder mehr als beispielsweise 3264 Graustufen (Kanal 00, rot, Pixelanzahl 42) bzw. 1408 Graustufen (Kanal 01, grün, Pixelanzahl 62) aufweisen. Anschließend erfolgt die Kalkulation kolokalisierter Pixel, wobei die jeweilige Intensität nicht relevant ist (sFIDA Readout 40). Maßstabsbalken: 20 µm. Eigene Darstellung, erstellt mit MS Office.

In Abbildung 12B ist der Zusammenhang zwischen Cut-off und zu analysierenden Pixel für die spätere Analyse dargestellt. Für die Eruierung des Cut-offs werden in der Regel die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Fluoreszenzkanäle der applizierten Pufferkontrolle verwendet, da in dieser kein spezifisches, sondern lediglich unspezifisches Messsignal zu erwarten ist. Dabei wird entweder über einen gewissen Intensitätswert oder einer definierten prozentualen Anzahl an verbleibenden Pixeln der Pufferkontrolle normalisiert. Da jedoch die

Fluoreszenzsignale der applizierten Pufferkontrolle von Experiment zu Experiment schwanken können, ist die Normalisierung über die prozentuale Pixelzahl zu favorisieren. Unter Annahme einer Gesamtanzahl von 1.000.000 Pixeln und der Anwendung eines Intensitätsschwellenwert von beispielsweise 0,1%, wird derjenige Graustufenwert ermittelt, bei dem 1000 Pixel der Pufferkontrolle im jeweiligen Fluoreszenzkanal eine gleiche oder höhere Intensität aufweisen. Anschließend wird basierend auf den ermittelten Cut-offs für jeden Pixel entschieden, ob dessen Intensität höher oder niedriger im Vergleich zum gesetzten Intensitätsschwellenwert ist (siehe Abbildung 12C). Die Summe aller Pixel, die oberhalb des eruierten Cut-offs liegen, werden im Falle einer Einkanalanalyse als Pixel Count definiert. Im Falle einer Zweikanalanalyse werden anschließend alle Pixel, die in den jeweiligen Fluoreszenzkanälen an derselben Position gleiche bzw. höhere Intensitäten als die des jeweiligen Schwellenwerts aufweisen, gezählt. Die jeweilige Intensität der kolokalisierten Pixel ist hierbei nicht relevant. Sowohl für die ermittelten Pixel Counts bzw. sFIDA Readouts der 25 Einzelbilder bzw. der 100 Einzelbilder der Quadruplikate wird anschließend der Mittelwert mit Standardabweichung generiert und dem Operator für weitere Analysen als Excel-Datei zur Verfügung gestellt. sFIDAta ermöglicht neben einer teilautomatisierten Aussortierung artifizieller Bilder zudem die sogenannten Min-Max-Filterung, bei der ein prozentualer Anteil an Bildern eines Wells aufgrund vergleichsweise zu niedrigen bzw. zu hohen Intensitäten von der Analyse ausgeschlossen wird [55, 158].

1.3.3 Regulatorische Anforderungen an die Entwicklung von IVDs

Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, könnte die sFIDA-Technologie zukünftig als IVD zur Diagnose von Proteinfehlfaltungserkrankungen eingesetzt werden. IVDs werden laut der europäischen Verordnung (EU) 2017/746 über *in-vitro*-Diagnostika (englisch: *in-vitro diagnostic device regulation*, IVDR) als Medizinprodukte, welche auf Grundlage von *in-vitro* Untersuchungen menschlicher Proben wie beispielsweise Gewebe, Liquor, Blut oder Stuhl, Rückschlüsse über physiologische bzw. pathologische Zustände sowie Prädispositionen für bestimmte Erkrankungen ermöglichen, definiert [167, 168]. Zu dieser Gruppe zählen laut Artikel 2, Nummer 7 der IVDR auch CDx, welche im Rahmen der personalisierten Medizin die sichere und wirksame Verwendung eines Arzneimittels gewährleisten. So können mittels CDx vor Behandlungsbeginn die Patienten selektiert werden, welche mit größter Wahrscheinlichkeit von einer Behandlung profitieren bzw. diejenigen ausgeschlossen werden, bei denen ein erhöhtes Risiko für Nebenwirkungen besteht [167].

Um sFIDA-Assays zukünftig als IVDs innerhalb des europäischen Wirtschaftsraums in Verkehr bringen zu können, auf dem Markt bereit stellen zu können oder in Betrieb nehmen zu können, ist die Transition aus dem Forschungsumfeld in den regulierten Bereich sowie die Zulassung unter Einhaltung der IVDR obligatorisch. Neben der IVDR müssen zudem weitere Regulatorien

wie beispielsweise das Medizinprodukterecht-Durchführungsgesetz [169], welches die IVDR durch Ergänzungen in nationales Recht übersetzt, eingehalten werden. Darüber hinaus fordert die IVDR vom Hersteller ein Qualitätsmanagementsystem (QMS) sowie ein Risikomanagementsystem für Medizinprodukte, welche durch die harmonisierten Standards ISO 13485 [170] bzw. die ISO 14971 [171] zertifiziert werden können.

Um für einzelne sFIDA-Assays eine Zulassung als IVD zu erhalten, muss die Konformität der Assays in einem umfangreichen Verfahren bewertet werden. Der regulatorische Aufwand des Konformitätsbewertungsverfahren hängt dabei in erster Linie von der Zweckbestimmung und der damit verbundenen Klassifizierung ab (siehe Abbildung 13). Die Klassifizierung von IVDs in Klasse A, Klasse B, Klasse C und Klasse D erfolgt analog der in Anhang VIII der IVDR definierten sieben Regeln. Diese kalkulieren sowohl das individuelle als auch das öffentliche Gesundheits- und Sicherheitsrisiko vor allem im Falle einer Nicht-Konformität mit ein. So weisen Produkte der Klasse A, welche selbst keinen Informationsgehalt liefern, den geringsten Risikograd auf. Hierzu zählen beispielsweise Probenbehältnisse, Pufferlösungen oder allgemeiner Laborbedarf, wobei sterile Produkte differenziert betrachtet werden (Regel 5). Im Gegensatz dazu tragen Produkte der Klasse D das höchste Risiko, da diese beispielsweise das Vorhandensein von infektiösen Erregern wie dem humanen Immundefizienzvirus oder dem Coronavirus Typ 2 (englisch: *severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2*, SARS-CoV-2) ausschließen oder bestätigen (Regel 1 und Regel 2). CDx, Gentests, Tests zur Pränataldiagnostik und einige Produkte zur Eigenanwendung beispielsweise Blutzuckerbestimmung werden pauschal Klasse C zugeordnet (Regel 3). Alle Produkte, die nicht Klasse C oder Klasse D zugeordnet werden können, gehören Klasse B an (Regel 6). Dazu zählen neben Kontrollproben (Regel 7) auch IVDs zur Selbstanwendung, die nur einen geringen bis mittleren Risikograd aufweisen wie beispielsweise Schwangerschaftstests, Fertilitätstests sowie Untersuchungen des Urins bzgl. des Gehalts an Glukose, Leukozyten, Erythrozyten oder Bakterien (Regel 4) [167]. Folglich würden sFIDA-Assays je nach Zweckbestimmung entweder in Klasse B oder Klasse C fallen.

Wie in Abbildung 13 dargestellt, müsste die Konformität der sFIDA-Assays durch eine benannte Stelle beispielsweise durch TÜV Süd bewertet werden, da dies für die Klasse A steril und für die Klassen B-D gesetzlich vorgeschrieben ist. Lediglich für Klasse A-Produkte kann der Hersteller selbst die Konformität des Produktes aussprechen. Für die Konformitätsbewertung müssen für alle Produktklassen die allgemeinen Sicherheits- und Leistungsanforderungen (Anhang I, IVDR) vorliegen und eine technische Dokumentation (TD) analog Anhang II und Anhang III der IVDR erstellt werden. Im Falle von Klasse B oder Klasse C zugehörigen sFIDA-Assays wäre darüber hinaus eine Bewertung der TD durch eine benannte Stelle obligatorisch. Zudem schreibt die IVDR für alle Produktklassen eine Bewertung und Überwachung des QMS durch eine benannte Stelle vor, wobei sich die Bewertung bei sterilen

Klasse A-Produkten auf Aspekte des Sterilisationsprozesses beschränkt und das von Klasse B-Produkten keiner Überwachung unterliegt. Alternativ können Hersteller für Produkte der Klasse C und Klasse D ein Konformitätsbewertungsverfahren basierend auf einer Baumusterprüfung und einer Qualitätssicherung der Produktion auswählen. Sollten einzelne sFIDA-Assays zukünftig als CDx eingesetzt werden, ist für das jeweilige Konformitäts-bewertungsverfahren zudem die Konsultation der zuständigen Behörde in diesem Falle die Konsultation des Paul-Ehrlich-Instituts notwendig. Darüber hinaus müssen sich Klasse D-Produkte einer Chargenprüfung durch ein Referenzlabor unterziehen.

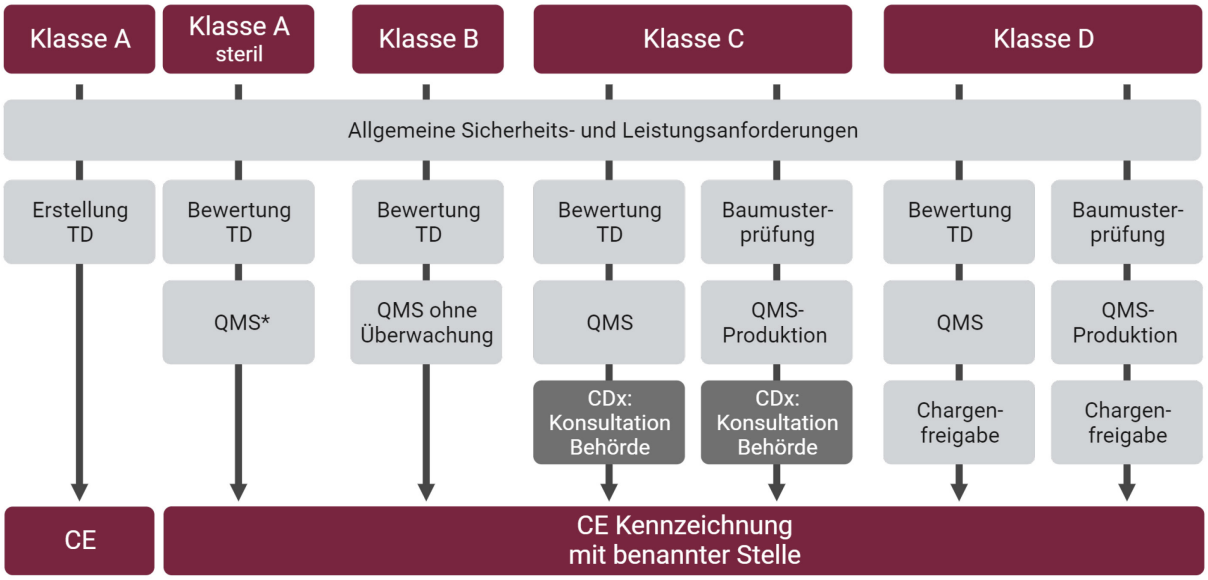


Abbildung 13 – Konformitätsbewertungsverfahren und der damit verbundene regulatorische Aufwand unter Berücksichtigung der Produktklassifizierung. Für alle Produktklassen werden die allgemeinen Sicherheits- und Leistungsanforderungen (Anhang I, IVDR) gefordert. Darüber hinaus ist zumindest die Erstellung einer TD analog Anhang II und Anhang III der IVDR obligatorisch, wobei für alle Produkte mit Ausnahme von Klasse A-Produkten zudem eine Bewertung der TD durch die benannte Stelle für die Konformitätsbewertung notwendig ist. Gleiches gilt auch für das QMS, welches entweder vollständig oder in Teilen durch die benannte Stelle bewertet und für die Mehrheit auch überwacht werden muss. Im Falle von sterilen Klasse A-Produkten beschränkt sich die Bewertung des QMS auf Aspekte des Sterilisationsprozesses (mit * gekennzeichnet). Modifiziert nach [172, 173], erstellt mit BioRender.com.

Sowohl die allgemeinen Sicherheits- und Leistungsanforderung (Artikel 5 bzw. Anhang I, IVDR) als auch Teile der TD (Anhang II, Nummer 6) sowie die ISO 13485 (Kapitel 7.3, ISO 13485) fordern eine Leistungsbewertung des IVDs. Daher müssen im Rahmen der Produktentwicklung von sFIDA-Assays verschiedene Leistungsbewertungsstudien gemäß Artikel 56 IVDR durchgeführt werden, welche die wissenschaftliche Validität, die Analyseleistung und die klinische Leistung bewerten. Dabei beschreibt die wissenschaftliche Validität den Zusammenhang zwischen dem Analyten und einem bestimmten physiologischen oder pathologischen Zustand, während mittels Analyseleistung überprüft wird, ob mittels sFIDA ein bestimmter Analyt korrekt nachgewiesen und quantifiziert werden kann. Im Gegensatz dazu beschreibt die klinische Leistung die Fähigkeit des sFIDA-Assays, den

Analyten im Zusammenhang mit einem physiologischen oder pathologischen Zustand unter Einhaltung seiner Zweckbestimmung nachzuweisen [167].

Die qualitativen Anforderungen an die Produktentwicklung eines IVDs, demzufolge auch an die Produktentwicklung eines sFIDA-Assays, sind innerhalb des Kapitels 7.3 der ISO 13485 geregelt, wobei die einzelnen Entwicklungsstudien geplant und dokumentiert werden müssen. Die ISO 13485 schreibt zudem vor, dass innerhalb der Entwicklungsplanung für jede Entwicklungsphase sogenannte Entwicklungspläne etabliert werden müssen, die kritische Parameter und dazugehörige Kennzahlen sowie Studienpläne basierend auf dem allgemeinen Stand der Technik definieren.

Der Entwicklungsprozess eines IVDs, insbesondere eines Immunoassays, kann in die Phasen Verifizierung (Festphasenentwicklung), Übertrag der Entwicklung (Prozessentwicklung) und Validierung gegliedert werden, wobei letztlich anhand der analytischen als auch klinischen Leistung der klinische Nachweis des Biomarkers sowie des entsprechenden IVDs beurteilt wird (siehe Abbildung 14) [55, 170].



Abbildung 14 – Übersicht über die drei Entwicklungsphasen eines Immunoassays sowie die damit verbundenen Untersuchungsparameter. Die Verifizierung ist der erste Schritt der Entwicklung und dient der Definition verschiedener Festphasenparameter, wobei stets die Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses im Vordergrund steht. Anschließend wird innerhalb der Prozessentwicklung der systematische Fehler des Assays durch Steigerung der Reproduzierbarkeit und Reduzierung der Intra-Assay-Varianz durch Anpassung diverser Prozessparameter weitestgehend reduziert, bevor schließlich der klinische Nachweis des Biomarkers sowie des Assays basierend auf der analytischen und klinischen Leistung validiert wird. Eigene Darstellung, erstellt mit BioRender.com.

Innerhalb der Assay-Verifizierung sollen Einflussgrößen wie beispielweise Antikörperkonzentrationen, Puffersysteme und Blocking-Substanzen durch empirische Herangehensweise so ausgewählt werden, dass eine optimale Wechselwirkung zwischen Assay-Antikörpern und Analyt gewährleistet wird. Dabei soll nicht nur das Messsignal, sondern das Verhältnis zwischen Hintergrund und spezifischem Signal (Signal-Rausch-Verhältnis) maximiert werden [174, 175]. Der Prozess der Immobilisierung der Capture-Antikörper wird als Coating bezeichnet [175, 176], wobei die Qualität des Coatings und der Blockierung direkt mit der analytischen Sensitivität und Spezifität sowie mit der Reproduzierbarkeit des Assays korrelieren [175, 177]. Neben den oben genannten Coating-Parametern können Proben- sowie Detektionsantikörperpuffer die Sensitivität und Spezifität des Assays weiter maximieren, da die Antigenpräsentation als auch die Reduzierung an Hintergrundrauschen über beide Parameter reguliert werden können [174, 175].

Um den systematischen Fehler innerhalb der Validierungsstudien auf ein Minimum zu reduzieren, empfiehlt es sich noch innerhalb der Methodenentwicklung Prozessparameter zu überprüfen, neu zu definieren und in das zuvor verifizierte Assay-Protokoll zu implementieren, sodass Reproduzierbarkeit und Robustheit des Assays erhöht und die Intra-Assay-Varianz minimiert werden [178, 179]. Zu untersuchende Parameter können Inkubationsbedingungen, Präanalytik und Probenstabilität betreffen [174, 175, 180]. Je nach Relevanz können die Ergebnisse der Prozessentwicklungsstudien zusätzlich im späteren Validierungsbericht aufgeführt werden, da beide Entwicklungsphasen teilweise ähnliche Thematiken abdecken.

Nach erfolgreicher Verifizierung und Prozessentwicklung werden innerhalb mehrerer Validierungsstudien Kennzahlen zur analytischen als auch klinischen Leistung des Assays eruiert. Messeigenschaften sowie der bestimmungsgemäße Gebrauch des entwickelten Assays werden mittels der analytischen Validierung erfasst. Hierbei werden sowohl Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen wie das Leerwertsignal (englisch: *limit of blank*, LoB), die Detektionsgrenze (englisch: *limit of detection*, LoD) sowie die untere (englisch*: lower limit of quantification*, LLoQ) als auch obere Quantifizierungsgrenze (englisch: *upper limit of quantification*, ULoQ), der dynamische Messbereich und die Linearität ermittelt [175]. Die analytische Spezifität oder auch analytische Selektivität genannt, wird anhand der Richtigkeit, Genauigkeit und Präzision des Assays bewertet. Darüber hinaus sollte zudem der Einfluss von möglichen Interferenzen und Kreuzreaktivitäten auf das Messsignal untersucht werden [175, 181]. Im Gegensatz dazu beschreibt die klinische Leistung die Fähigkeit des Assays, die biologischen Proben wie Liquor, Plasma oder Stuhl basierend auf der determinierten Analytkonzentration in positive oder negative zu klassifizieren. Um dies zu bewerten, sollten sowohl die diagnostische Sensitivität (Wahr-positiv-Rate) als auch Spezifität (Wahr-negativ-Rate), der positive und negative prädiktive Wert, das Wahrscheinlichkeitsverhältnis (englisch: *Likelihood ratio*) sowie der klinische Cut-off ermittelt werden [167, 176, 182]

2 Zielsetzung

Proteinfehlfaltungserkrankungen einschließlich AD, PD sowie eine Subgruppe chronisch mentaler Erkrankungen zeichnen sich durch die Aggregation und Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen aus, die dadurch ihre physiologische Funktion verlieren oder toxische Eigenschaften erwerben. Jahrzehntelang wurde den unlöslichen fibrillären Akkumulationen die pathophysiologische Krankheitsursache zugeschrieben, jedoch wurde mittlerweile belegt, dass die kleineren und löslichen Proteinoligomere die wesentliche toxische Spezies darstellen. Folglich können diese Oligomere als vielversprechende Biomarker-Kandidaten sowohl im Bereich der Diagnostik als auch in der Medikamentenentwicklung eingesetzt werden. Da sich Oligomere in menschlichem Gewebe sowie in Körperflüssigkeiten hinsichtlich ihrer Konzentration, Heterogenität und Stabilität unterscheiden, ist die Entwicklung und Validierung sensitiver und spezifischer diagnostischer Verfahren zwingend notwendig. Die sFIDA-Technologie ermöglicht die Quantifizierung einzelner Partikel im femtomolaren Konzentrationsbereich und stellt somit ein hoch sensitives, spezifisches und quantitatives Nachweisverfahren dar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst ein Verifizierungsplan für die Festphasenentwicklung etabliert werden, mit dessen Hilfe die analytische Sensitivität als auch analytische Spezifität in wenigen Experimenten gesteigert werden sollen. Hierzu soll der theoretische Hintergrund zu einzelnen Parametern der Festphasenentwicklung beschrieben sowie Kenngrößen für die Bewertung verschiedener Leistungsparameter definiert und ein tabellarischer Plan zur Festphasenentwicklung etabliert werden. Um die Effektivität einer systematischen Festphasenentwicklung zu demonstrieren, sollen Coating-Parameter, Komposition der Blockadelösung sowie des Probenpuffers und das Detektionssystem des sFIDA-Assays für die Quantifizierung von Aβ-Aggregaten eruiert werden.

Im Anschluss sollen mit Hilfe des Verifizierungsplans weitere sFIDA-Assays entwickelt und in einzelnen Studien hinsichtlich ihrer analytischen als auch klinischen Leistung validiert werden. Der Fokus soll hierbei auf der Diagnose von AD liegen, wobei eingangs der sFIDA-Assay bezüglich Standardisierung und Anwendbarkeit für Routinemessungen durch Implementierung einer internen Qualitätskontrollprobe erhöht werden soll. Zudem soll die eruierte Festphase unter Berücksichtigung wichtiger Parameter der Prozessentwicklung für verschiedene Probenmatrices wie Liquor, Plasma und Stuhl adaptiert werden. Des Weiteren soll die Anwendbarkeit der sFIDA-Technologie sowohl für die Diagnose von PD und auch einer Subgruppe chronisch mentaler Erkrankungen sowie im Bereich präklinischer Studien innerhalb der Medikamentenentwicklung demonstriert werden.

3 Nicht publizierte Daten

3.1 Etablierung eines Verifizierungsplans

Um einen sFIDA-Assay zukünftig innerhalb des europäischen Wirtschaftsraums als IVD anbieten zu können, müssen regulatorische und qualitative Hürden auch innerhalb der Assay-Entwicklung überwunden werden. Hierfür haben Organisationen wie beispielsweise die FDA [183], die *European Medicines Agency* [184] oder das *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) [185] Validierungspläne etabliert, welche von IVD-Herstellern für die Bewertung der analytischen als auch klinischen Leistung angewandt werden können. Jedoch stehen derzeit keine Studienpläne mit solch einer hohen Standardisierung und nationalen bzw. internationalen Akzeptanz für die Assay-Verifizierung zur Verfügung.
Daher war das erste Ziel dieser Arbeit, ein Protokoll für die Festphasenentwicklung der sFIDA-Technologie zu etablieren, mit dessen Hilfe die analytische Sensitivität sowie Spezifität innerhalb weniger Experimente gesteigert werden kann. Hierzu sollten wichtige Festphasen-parametern sowie verschiedene Kenngrößen für die Bewertung der Assay-Leistung ermittelt und auf deren Grundlage ein tabellarischer Verifizierungsplan für die sFIDA-Technologie etabliert werden.

3.1.1 Theoretischer Hintergrund zu einzelnen Festphasenparametern

3.1.1.1 Immobilisierungstechnik

Die Immobilisierung von Proteinen auf eine Oberfläche wie beispielsweise die von Capture-Antikörpern auf die Glasoberfläche einer Mikrotiterplatte kann auf diversen molekularen Wirkungsmechanismen wie Physisorption, bioaffine Wechselwirkungen und kovalente Bindungen basieren (siehe Abbildung 15) [174, 177, 181, 186].

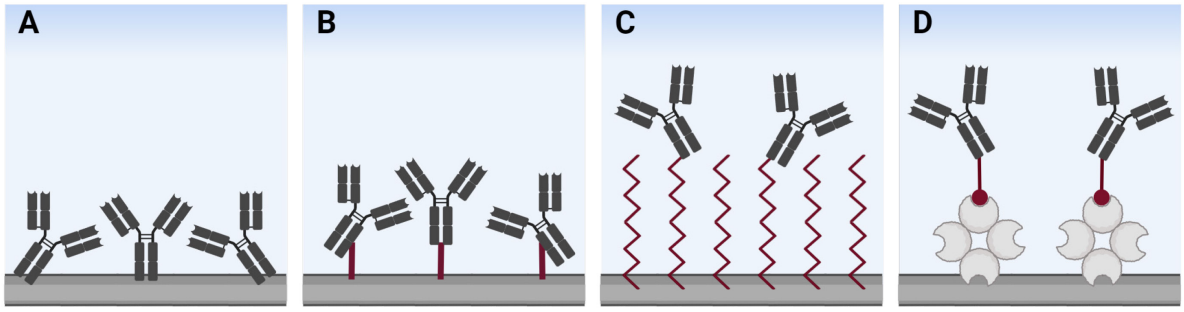


Abbildung 15 – Schematische Darstellung gängiger Methoden zur Immobilisierung von Capture-Antikörpern auf eine Assay-Oberfläche. (A) Capture-Antikörper können entweder nicht-kovalent über intermolekulare Kräfte, **(B)** kovalent über reaktive Gruppen der Oberfläche oder **(C)** kovalent über reaktive Gruppen der Spacer-Moleküle binden. **(D)** Des Weiteren können bioaffinen Wechselwirkungen wie die zwischen biotinylierten Antikörpern und einer mit Avidin/Streptavidin beschichteten Oberfläche eine starke und spezifische Immobilisierung des Capture-Antikörpers ermöglichen. Modifizierte Darstellung nach Kim & Herr [177], erstellt mit BioRender.com.

Die mit dem geringsten Aufwand umsetzbare Immobilisierungstechniken ist die Physisorption (Abbildung 15A). Hierbei adsorbieren die Capture-Antikörper über intermolekulare Kräfte wie hydrophobe Wechselwirkungen, Van-der-Waals Kräfte und Wasserstoffbrücken oder über eine Kombination der verschiedenen Kräfte an die Assay-Oberfläche. Hierfür sind weder eine Vorbehandlung der Oberfläche, die Verwendung toxischer Substanzen noch die Umsetzung aufwendiger Protokolle für die Oberflächenfunktionalisierung von Nöten. Folglich ist die Physisorption sehr häufig die Methode der Wahl. Um eine möglichst gleichmäßige und reproduzierbare Oberflächenbeschichtung gewährleisten zu können, ist die Etablierung eines Standardprotokolls für den Coating-Prozess obligatorisch, da intermolekulare Kräfte stark von den Umgebungsbedingungen wie beispielsweise pH-Wert, Ionenstärke und Temperatur abhängig sind. [19, 174, 177, 186].

Die Bindungsstärke zwischen Capture-Antikörper und Oberfläche ist bei Verwendung einer kovalenten (Abbildung 15B) bzw. bioaffinen Immobilisierungstechnik (Abbildung 15D) um ein Hundert- bis Tausendfache höher, da es sich hierbei um starke spezifische Bindungen sowie um Elektronenpaarbindungen handelt [177, 187]. Dabei basiert erstere auf der Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen der Assay-Oberfläche und den Aminosäureseitenketten des Antikörpers wie beispielsweise Aminogruppen, Carboxylgruppen, Thiolgruppen oder Phenolringe. Dementgegen basieren Systeme für bioaffine Immobilisierungstechniken beispielsweise auf der Wechselwirkung zwischen biotinylierten Capture-Antikörpern und einer mit Avidin bzw. Streptavidin beschichteten Oberfläche oder zwischen dem Capture-Antikörper und einer mit Protein A bzw. Protein G beschichteten Oberfläche. Jedoch bedarf sowohl eine kovalente als auch eine bioaffine Immobilisierungstechnik im Vergleich zur Physisorption eine chemische oder physikalische Vorbehandlung der Oberfläche bzw. eine Funktionalisierung des Antikörpers [174, 181, 186-189].

Um unspezifische Bindungen zwischen dem Analyten und der Assay-Oberfläche zu reduzieren, wird zudem der Einsatz von Abstandshaltern, sogenannten Spacer-Molekülen, empfohlen (Abbildung 15C). Hierbei entstehen kovalente Bindungen zwischen den reaktiven Gruppen des Spacer-Moleküls und dem Antikörper, wobei nach der Kopplung zusätzliche Schritte benötigt werden, um die aktivierten funktionellen Gruppen abzusättigen [177, 187-189]. Die technische Umsetzung solcher Modifikationen ist chemisch sehr aufwendig sowie kosten- und zeitintensiv. Daher sollte vor Beginn der Assay-Verifizierung der Kosten-Nutzen-Faktor für die jeweilige Immobilisierungsmethode bewertet werden [177, 189]. Des Weiteren sollte neben der technischen Umsetzung zudem die Stabilität der Immobilisierung und die Reaktivität des Antikörpers nach der Immobilisierung überprüft werden. Durch den Verzicht einer spezifischen Immobilisierung beispielsweise über den Fc-Teil des Antikörpers kann es zu einer randomisierten Ausrichtung der Capture-Antikörper auf der Assay-Oberfläche kommen, wodurch Paratope für das spätere Zielantigen durch sterische Hinderungen teilweise

oder vollständig unzugänglich werden. Diese Problematik sollte vor allem bei der Physisorption, jedoch auch bei kovalenten Immobilisierungstechniken, deren Chemie auf der Bindung omnipräsenter Gruppen wie beispielsweise primärer Amine basieren, überprüft werden [176, 177, 186, 188-190].

3.1.1.2 Wahl des Coating-Puffers

Die physikochemischen Eigenschaften der zu immobilisierenden Proteine wie beispielweise Molekulargewicht, Glykosylierungsgrad, der isoelektrische Punkt und die Art der Kopplung variieren von Assay zu Assay. Daher sollte nach der Eruierung der Immobilisierungstechnik ein geeigneter Puffer für die Immobilisierung definiert werden. Das Testen verschiedener Puffersysteme ist hierbei obligatorisch, da diese die native Konformation und die Löslichkeit des Proteins beeinflussen [174, 176, 177, 181, 187]. Die drei am häufigsten verwendeten Coating-Puffer sind 50 mM Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) pH 9,6, 10 mM Tris pH 8,5 und 10 mM phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,2 [174, 176, 187]. Lediglich bei der kovalenten Kopplung des Antikörpers über primäre Amine können aminhaltige Puffer wie Tris oder Glycin nicht verwendet werden, da diese mit den Capture-Antikörpern um die reaktiven Gruppen konkurrieren würden [176, 177, 191]. Weiterführend kann die Coating-Effizienz mittels Feinjustierung des pH-Wertes, des Salzgehalts sowie der Ionenstärke erhöht werden. Um dabei kompetitive Coating-Effekte zu verhindern, sollte der Coating-Puffer weder Detergenzien noch Fremdproteine wie beispielsweise bovines Serumalbumin (BSA) enthalten [174, 176].

3.1.1.3 Wahl und Titration der Assay-Antikörper

Da die Spezifität eines Immunoassays weitestgehend von den verwendeten Assay-Antikörpern abhängig ist, sollten diese je nach Probenart, Probenmatrix und der zu erwartenden Analytkonzentration anhand ihrer Spezifität, Affinität und Avidität sowie deren Arbeitskonzentrationen ausgewählt werden.

Die Spezifität ist hierbei die wichtigste Eigenschaft der Antikörper. Monoklonale Antikörper binden im Gegensatz zu polyklonalen nur ein einziges Epitop, wodurch sie hoch spezifisch sind und daher für den Einsatz in Immunoassays empfohlen werden [175, 176, 181, 192]. Des Weiteren können unspezifische Bindungen zwischen Antikörper und endogenen Substanzen in der biologischen Probe durch den Einsatz monoklonaler Antikörper weitestgehend reduziert werden, da diese im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern ein geringes Risiko für Kreuzreaktivitäten aufweisen [175, 181, 192]. Darüber hinaus ist die Chargenvariabilität von monoklonalen Antikörper vernachlässigbar, sodass der jeweilige Immunoassay diesbezüglich eine hohe Robustheit aufweisen kann [175, 176, 181].

Zusätzlich sollten Antikörper mit einer hohen Affinität verwendet werden, da diese in kürzester Zeit eine große Anzahl stabiler Wechselwirkungen mit dem Antigen erzeugen und somit die analytische Sensitivität steigern. Als Bindungsaffinität wird die Stärke einer einzelnen biomolekularen Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen bezeichnet, wobei diese mittels Dissoziationskonstante (K_D in mol/L) beschrieben wird. Kleinere K_D-Werte indizieren hierbei eine hohe Affinität. Um eine ausreichende analytische Sensitivität erzielen zu können, werden in der Literatur K_D-Werte im pikomolaren Bereich empfohlen [174-176, 181].
Die Avidität beschreibt hingegen die Gesamtstabilität aller Bindungen, welche der jeweilige Antikörper eingehen kann und variiert je nach Klasse des Immunglobulins (Ig) sowie Isotyps. Natürliche Antikörper wie IgE, IgD und IgG besitzen zwei identische Paratopregionen und weisen folglich bivalente Eigenschaften auf. Im Gegensatz dazu weisen IgM-Antikörper eine pentamere Struktur auf, verfügen somit über polyvalente Eigenschaften und besitzen dadurch eine höhere Avidität [174, 175, 181, 192].
Im Rahmen der Assay-Verifizierung soll sowohl die Arbeitskonzentration an Capture- als auch Detektionsantikörpern mittels Titrationsversuche eruiert werden. Die empfohlenen Startkonzentrationen variieren dabei je nach verwendetem Antikörpertyp und sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2 – Empfohlene Startkonzentrationen der Assay-Antikörper für Titrationsexperimente. Modifizierte Darstellung nach R&D Systems [193]. Capture-Antikörper: C, Detektionsantikörper: D.

	C: Monoklonal D: Polyklonal	**C: Monoklonal D: Monoklonal**	**C: Polyklonal D: Polyklonal**
Capture [µg/mL]	1; 2; 4; 8	0,5; 1; 2; 4	0,2; 0,4; 0,8
Detektion [ng/mL]	50; 100; 200; 400	0,25; 0,5; 1; 2	50; 100; 200; 400

Neben der klassischen Schachbrett-Titration, bei der gleichzeitig die geeigneten Konzentrationen an Capture- und Detektionsantikörpern determiniert werden, kann für die Ermittlung der Capture-Konzentration ein sogenanntes Stufencoating durchgeführt werden. Hierbei wird die eingesetzte Konzentration an Antikörper schrittweise erhöht. In Abbildung 16 ist der Zusammenhang zwischen eingesetzter Capture-Konzentration und Signalentwicklung mittels Stufencoating dargestellt. Dieses Verfahren kann ebenfalls für die Ermittlung der Detektionsantikörper angewandt werden [174-176, 187, 193]. Im Gegensatz zu herkömmlichen Immunoassays können für sFIDA gleichzeitig mehrere unterschiedlich markierte Detektionssonden zum Einsatz kommen. Um hierbei in beiden Fluoreszenzkanälen ähnliche Signalstärken zu erhalten und so die analytische Sensitivität für kolokalisierte Aggregate zu erhöhen, empfiehlt sich zudem die Feinjustierung beider Sonden.

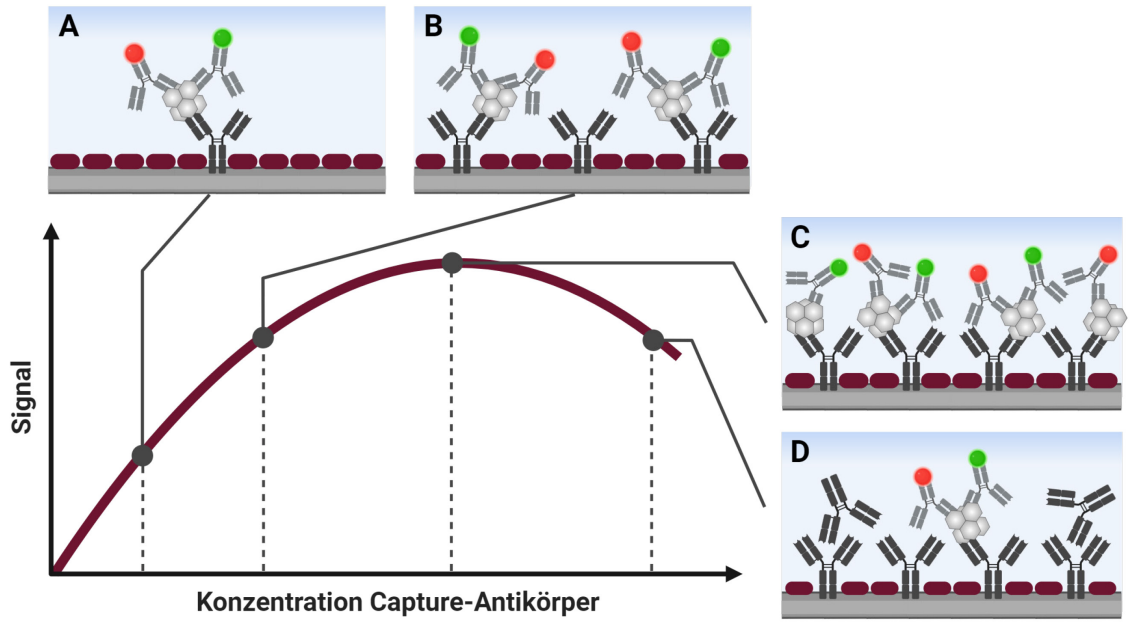


Abbildung 16 – Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Capture-Konzentration und Signalentwicklung. (A) Der Einsatz einer zu geringen Antikörperkonzentration korreliert basierend auf einer ungenügenden Beschichtung der Oberfläche mit einer geringen Signalentwicklung. **(B)** Durch stetiges Erhöhen der Antikörperkonzentration bis zur Sättigung **(C)**, bei der sich eine einheitliche Schicht an Antikörpern auf der Oberfläche (Monolayer) ausbildet, kann die analytische Sensitivität sukzessive erhöht werden. **(D)** Wird die Antikörperkonzentration darüber hinaus weiter erhöht, entsteht eine instabile Multilayerschicht. Dabei interagieren überschüssige Antikörpermoleküle nicht nur mit freier Oberfläche, sondern zudem über Protein-Protein-Wechselwirkungen mit bereits immobilisierten Antikörpern. Wird anschließend der Analyt von solch einem Antikörper gebunden, wird der Antigen-Antikörper-Komplex durch anschließende Waschschritte von der Assay-Oberfläche gelöst. Aufgrund dessen und der gleichzeitigen Paratopmaskierung der immobilisierten Antikörper resultiert dies in einer Reduzierung der Signalentwicklung sowie der analytischen Sensitivität. Modifizierte Darstellung nach [187], erstellt mit BioRender.com.

3.1.1.4 Wahl der Blockadelösung

Nach der Immobilisierung der Capture-Antikörper wird noch freie Oberfläche mit Fremdprotein wie beispielsweise Milchpulver, Casein oder BSA gesättigt. Dieser Schritt, das sogenannte Blocking, hat direkten Einfluss auf die analytische Sensitivität und Spezifität des Assays, da zum einen unspezifische Bindungen der Detektionssonden als auch schwache intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Analyten und Glasoberfläche erschwert werden [174-176, 181, 187, 194].

Die ideale Blockadelösung verhindert jegliche unspezifischen Bindungen und reduziert gleichzeitig das Hintergrundrauschen auf ein Minimum, ohne dass dabei Paratope der Antikörper für die spätere Antigenbindung verändert oder maskiert werden. Ungenügende Mengen an Blocking-Agenz resultieren in falsch-positiven Signalen, da entweder Detektionssonden direkt oder Analyt, der anschließend mittels Sonden markiert wird, unspezifisch an die freie Glasoberfläche adsorbieren. Interferiert der Analyt mit der Blocking-Substanz, resultiert dies ebenfalls in falsch-positiven Messignalen. Im Gegensatz dazu kann eine zu hohe Konzentration an Blocking-Agenz zu falsch-negativen Messsignalen führen, da

Paratope der Capture-Antikörper durch Ausbildung einer multiplen Schicht an Blocking-Moleküle maskiert werden [174-176, 181, 187].
Innerhalb der Festphasenentwicklung sollten daher Puffer sowie Blocking-Agenz und dessen Konzentration eruiert werden, wobei zusätzlich verschiedene Additive zum Einsatz kommen können. So kann die Verwendung von Detergenzien wie beispielsweise Polysorbat 20 (Tween20) oder Sarkosyl die Intra-Assay-Varianz reduzieren, da durch Herabsetzen der Oberflächenspannung eine homogene Verteilung der Blocking-Proteine zustande kommen kann. Sollte der Analyt mit den verwendeten Blocking-Agenzien interferieren, kann anionisches Detergenz wie Natriumdodecylsulfat in niedrigen Konzentrationen der Blockadelösung zugesetzt werden. Des Weiteren wird in der Literatur der Einsatz von Bioziden wie Azid oder ProClin empfohlen, um das Risiko einer Kontamination während der Blockierung bei Raumtemperatur (RT) zu minimieren [176, 187, 194].

3.1.1.5 Wahl des Probenpuffers

Die Eruierung eines geeigneten Probenpuffers ermöglicht eine weitere Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses sowie der analytischen Sensitivität und Spezifität. Bei der Formulierung des Probenpuffers sollten Parameter so definiert werden, dass das Epitop für die spätere Antikörperbindung frei zugänglich vorliegt [174-176, 181, 187]. Dabei sollten insbesondere die Charakteristika des Analyten wie Größe, Ladung und Art der Epitope berücksichtig werden. Je nach Größe des Antigens unterscheidet sich die Anzahl an Aminosäuren, die mit dem Paratop des Antikörpers interagieren. Kleinere Epitope, bei denen die Interaktionen möglicherweise nur auf ein oder zwei Aminosäuren basieren, reagieren daher sensibler auf Pufferänderungen als größere Epitope, bei denen durchschnittlich 15 bis 20 Aminosäuren planar mit dem Paratop interagieren [174]. Um die Bindung zwischen Antigen und Antikörper zu stabilisieren, können Ionenstärke, Salzgehalt und pH-Wert justiert werden. Beispielsweise kann der Antigen-Antikörper-Komplex im Falle von stark geladenen Antigenen durch Neutralisierung der Oberflächenladung stabilisiert und somit die Spezifität erhöht werden [174]. Um mögliche Epitopmaskierungen zu reduzieren, können Detergenzien wie Tween20, Sarkosyl oder Triton-X eingesetzt werden. Handelt es sich beim Zielantigen jedoch um ein strukturspezifisches Epitop, können zu hohe Konzentrationen an Detergenz und Salz nachteilig für die Faltung des Proteins und somit für die spätere Antikörperbindung sein [174, 175]. Des Weiteren wird der Einsatz von geringkonzentrierten inerten Blocking-Agenzien empfohlen, um unspezifische Bindungen zwischen Analyt und Kunststoffoberflächen wie beispielsweise die der Reaktionsröhrchen oder der Pipettenspitzen zu reduzieren [176, 181].

3.1.1.6 Wahl des Detektionssystems

Wie bereits in Kapitel 3.1.1.3 ausführlich erläutert, beeinflussen Wahl und Arbeitskonzentration der Assay-Antikörper die analytische Sensitivität. Im Falle von sFIDA kann diese darüber hinaus zusätzlich durch die Auswahl geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe sowie Konjugationstechniken gesteigert werden [181, 190, 195, 196]. Hierbei sollten Parameter wie Mikroskopausstattung (Lichtquelle, Filterset, Detektionssystem), Eigenschaften des Fluorophors (Quantenausbeute, Photostabiliät, spektrale Überlappung) und Eigenschaften der Probenmatrix (Autofluoreszenz, pH-Wert) berücksichtigt werden. Durch die Konjugation des Antikörpers mit Fluorophormolekülen reduziert sich dessen Löslichkeit, sodass verstärkt Wechselwirkungen mit der Assay-Oberfläche auftreten und dadurch falsch-positive Messsignale erzeugt werden können. Um das daraus resultierende Hintergrundrauschen weitestgehend zu reduzieren und gleichzeitig eine Amplifikation des spezifischen Signals zu gewährleisten, können dem Sondenpuffer verschiedene Additive wie geringkonzentrierte Blocking-Agenzien oder Detergenzien zugesetzt werden. Das Signal-Rausch-Verhältnis kann zudem durch Feinjustierung des pH-Wertes, der Ionenstärke, des Salzgehalts sowie durch Titration der Konzentrationen an Additiven weiter optimiert werden [174, 175]. Durch den Einsatz von Bioziden kann zudem mikrobielles Wachstum und somit die Erhöhung der Autofluoreszenz insbesondere bei einer Wellenlänge von 488 nm verhindert werden.

3.1.2 Kenngrößen zur Leistungsbewertung

Die geeignete Assay-Variante der oben beschriebenen Untersuchungsparameter zeichnet sich durch ein Zuwachs an spezifischem Signal bei gleichzeitiger Reduzierung des Hintergrundrauschens, Erweiterung des dynamischen Messbereichs sowie durch eine hohe Präzision aus [174, 175]. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Indikatoren für die Bewertung der Assay-Leistung implementiert und angewandt. Diese basierten teilweise auf bereits etablierten Validierungsprotokollen zur Bewertung der analytischen Leistung; teilweise wurden jedoch auch neue Kenngrößen etabliert.

3.1.2.1 Indikator für Effektivität der Oberflächenbeschichtung

Eine einfache Methode, um die Effektivität der Adsorption sowie die Stabilität der Capture-Antikörper auf der Assay-Oberfläche zu bestimmen, basiert auf Messung der mittleren Fluoreszenzintensität sogenannter fluoreszenzmarkierter Oberflächenspezies (englisch: *Fluorescence Labeling of Surface Species,* FLOSS) [197]. Die Art des Modellsystems ist in erster Linie von der verwendeten Immobilisierungstechnik abhängig. Beispielsweise kann die Effektivität der Antikörperimmobilisierung mittels Physisorption durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper bewertet werden, indem diese auf die Oberfläche adsorbieren und das Fluoreszenzsignal anschließend gemessen wird. Eine weitere

Möglichkeit wäre der Einsatz von fluoreszenzmarkiertem Protein G, welches spezifisch an den Fc-Teil der bereits zuvor immobilisierte Capture-Antikörper bindet. Wie in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben, sind für die kovalente als auch für die bioaffine Immobilisierung verschiedene Oberflächenmodifikationen von Nöten, wobei eine der häufigsten die Silanisierung der Oberfläche mit primären Aminen ist. Die Effektivität dieser Modifikation könnte beispielsweise anhand des Fluoreszenzsignals eines mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) konjugierten Farbstoffs überprüft werden, da dieser unter Abspaltung der reaktiven Gruppe kovalent an die primären Amine der Oberfläche bindet. Darüber hinaus kann die kovalente Bindung zwischen Capture-Antikörper und Carboxylgruppen der Assay-Oberfläche mithilfe eines fluoreszenzmarkierten Amins simuliert werden, um die Reaktivität der funktionellen Gruppen zu überprüfen.

3.1.2.2 Indikatoren für die analytische Sensitivität und Hintergrundreduzierung

LoB, LoD und LLoQ beschreiben den Hintergrund sowie die kleinste Analytkonzentration, welche mit dem Analyseverfahren zuverlässig gemessen und quantifiziert werden kann [178, 183, 198]. Als Grundlage für die Berechnung dieser Nachweisgrenzen wird meistens der Messwert der Nullkontrolle (Verdünnungspuffer oder biologische Matrix ohne Analyt) verwendet. Hierzu sollten mindestens 20 Messwerte erfasst werden. Unter Annahme einer Normalverteilung der Messwerte werden im Anschluss je nach Grenzwert ein Vielfaches der Standardabweichung zum berechneten Mittelwert der Nullkontrolle addiert (siehe Formel 1, Formel 2 und Formel 3), wobei in der Literatur für die Berechnung des LoDs verschiedene Variationen (+3σ oder +4σ) beschrieben werden [178, 198].

$$\mathrm{LoB} = \mathrm{Mittelwert}_{\mathrm{Nullkontrolle}} + 1{,}645\ \sigma \tag{1}$$

$$\mathrm{LoD} = \mathrm{Mittelwert}_{\mathrm{Nullkontrolle}} + 2\ \sigma \tag{2}$$

$$\mathrm{LLoQ} = \mathrm{Mittelwert}_{\mathrm{Nullkontrolle}} + 10\ \sigma \tag{3}$$

Eine Steigerung der analytischen Sensitivität durch Optimierung der Festphasenbedingungen spiegelt sich folglich in niedrigeren Nachweisgrenzen wider. Darüber hinaus kann im Falle von sFIDA der Cut-off als Indikator für die Hintergrundreduzierung dienen, vorausgesetzt dieser bezieht sich stets auf denselben Prozentsatz an verbleibenden Pixeln der Nullkontrolle.

3.1.2.3 Indikator für den dynamischen Messbereich

Die höchste Analytkonzentration, die mittels des Messverfahrens zuverlässig quantifiziert werden kann, wird als ULoQ bezeichnet. Die obere Quantifizierungsgrenze wird in den häufigsten Fällen anhand der Analytkonzentration definiert, die sich noch signifikant von der nächsthöheren unterscheidet (Bestimmung mittels T-Test oder Mann-Whitney U Test). LLoQ und ULoQ umschließen den dynamischen Messbereich des Analyseverfahrens, der ein lineares Verhalten aufweisen sollte [175, 178, 183]. Für die Bewertung der Linearität können entweder artifizielle oder natürliche Proben, welche eine hohe Analytkonzentration aufweisen, sukzessive verdünnt werden. Anschließend wird die prozentuale Verdünnungslinearität analog Formel 4 berechnet, wobei Werte zwischen 80 und 120% eine akzeptable Linearität indizieren [178, 183].

$$\text{Verdünnungslinearität} = \frac{\text{Messwert}_{\text{Probe}}}{(\text{Messwert}_{\text{Referenz}}/\text{Verdünnungsfaktor})} \times 100\% \quad (4)$$

Zusätzlich kann anhand des Bestimmtheitsmaß einer Regressionsanalyse die Linearität des Assays ermittelt werden, wobei Werte kleiner 0,95 entweder auf eine Streuung der Messwerte oder auf einen nichtlinearen Zusammenhang hinweisen [175].

3.1.2.4 Indikatoren für die analytische Spezifität

Als analytische Spezifität bzw. Selektivität wird die Fähigkeit einer Analysemethode, den Analyten trotz Anwesenheit anderer Komponenten in der Probe zu differenzieren und quantifizieren zu können, bezeichnet [175, 178, 183]. Um die analytische Spezifität bewerten zu können, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene technische Kontrollen wie die sogenannte Capture-Kontrolle, Autofluoreszenzkontrolle sowie verschiedene Kreuzreaktivitätskontrollen etabliert (siehe Abbildung 17). Hierbei wird der Analyt in Puffer verdünnt und auf verschiedene Assay-Formate appliziert, wobei entweder einzelne Komponenten omittiert oder durch andere, nicht Analyt-spezifische Komponenten ersetzt werden. Durch gleichzeitige Analyse der Referenzvariante kann im Anschluss die Güte der analytischen Spezifität anhand der prozentualen Signalreduzierung (siehe Formel 5) bewertet werden.

$$\text{Signalreduzierung}\,[\%] = \left(1 - \frac{\text{Messwert}_{\text{Assay-Kontrolle}}}{\text{Messwert}_{\text{Referenz}}}\right) \times 100\% \quad (5)$$

Im Falle einer geringen analytischen Spezifität sind falsch-positive Messsignale zu erwarten, was in einer geringen Signalreduzierung resultieren sollte. Im Gegensatz dazu werden im Falle

einer ausreichenden bis hohen analytischen Spezifität prozentuale Werte zwischen 70% und 95% sowie <95% erwartet.

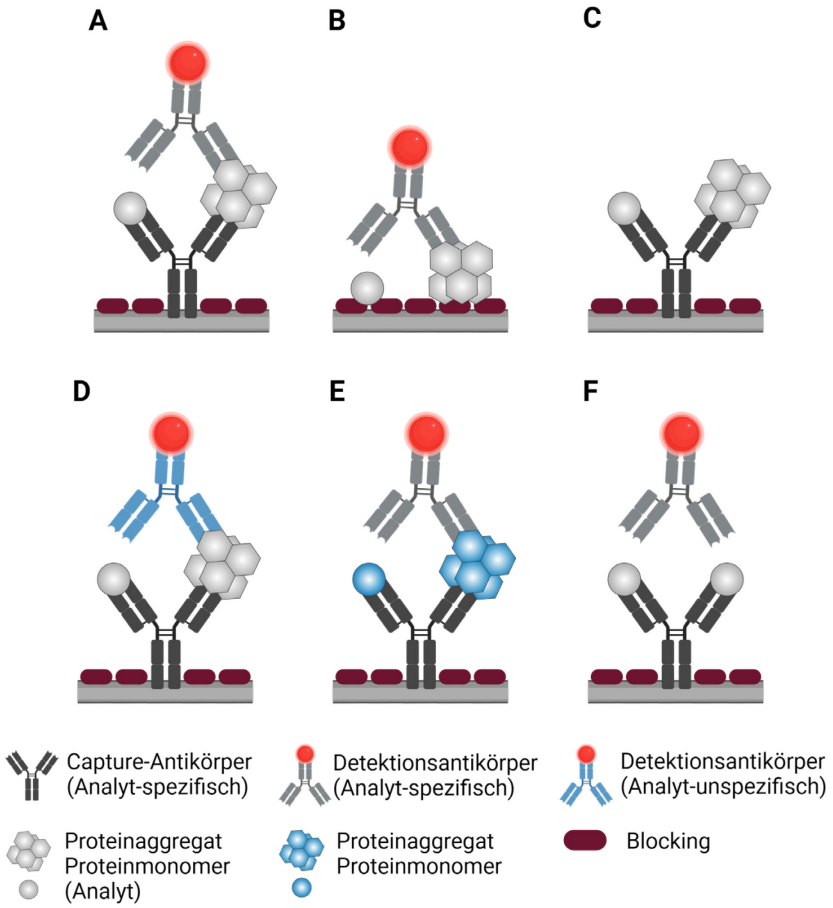


Abbildung 17 – Technische Kontrollen zur Überprüfung der analytischen Spezifität. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde für diese Darstellung auf die Verwendung einer zweiten Detektionssonde verzichtet. **(A)** zeigt die spezifische Immobilisierung und Fluoreszenzmarkierung eines Proteinaggregats. Das ebenfalls immobilisierte Proteinmonomer kann aufgrund des sFIDA-Prinzips nicht markiert werden (Sollzustand, Referenz). **(B)** Mittels Capture-Kontrolle wird überprüft, ob der Analyt trotz Abwesenheit des Capture-Antikörpers an die Assay-Oberfläche bindet und detektiert wird. Im Falle einer hohen analytischen Spezifität sollten keine bzw. vernachlässigbare Fluoreszenzsignale detektiert werden. **(C)** Durch den Verzicht von Detektionssonden kann überprüft werden, ob es sich bei dem detektierbaren Signal um spezifisches Signal oder um Autofluoreszenz z.B. der Assay-Puffer handelt. Ein häufiges Problem bei Immunoassays ist die Kreuzreaktivität der verwendeten Assay-Antikörpern oder des Analyten mit endogenen Substanzen in der Matrix. Daher wird überprüft, ob **(D)** der Einsatz Analyt-unspezifischer Detektionsantikörper sowie **(E)** die Verwendung eines anderen Analyten falsch-positive Signale aufgrund von Kreuzreaktivitäten verursachen, was eine geringe analytische Spezifizität indizieren würde. **(F)** Insbesondere bei aggregatspezifischen Assay-Formaten wie dem sFIDA-Assay muss die Unempfindlichkeit gegenüber Proteinmonomer überprüft werden. Eigene Darstellung, erstellt mit BioRender.com.

3.1.2.5 Indikator für die Amplifikation des spezifischen Signals

Wie in Abbildung 14 dargestellt, ist das Ziel der Assay-Verifizierung das sogenannte Signal-Rausch-Verhältnis zu erhöhen. Wie Formel 6 beschreibt, handelt es sich dabei um das Verhältnis zwischen dem Messwert einer Probe mit Analyten (spezifisches Signal) und dem Messwert einer Probe ohne Analyten (Nullkontrolle, Hintergrundrauschen). Im Falle von mehreren Proben mit unterschiedlichen Analytkonzentrationen kann somit auch die

Amplifikation des spezifischen Signals über den dynamischen Messbereich bewertet werden. Um eine Steigerung zur eingesetzten Referenzvariante zu erzielen, sollte das Signal-Rausch-Verhältnis mindestens um Faktor 2 oder 3 höher sein [175, 181].

$$\text{Signal-Rausch-Verhältnis} = \frac{\text{Messwert}_{\text{Probe mit Analyt}}}{\text{Messwert}_{\text{Nullkontrolle}}} \quad (6)$$

3.1.2.6 Indikator für die Präzision des Assays

Die Präzision einer Analysemethode beschreibt die Wiederholbarkeit der Messwerte mehrere Replikate derselben Probe. Dabei wird unterschieden, ob die Messwerte einer Probe innerhalb eines Assays (Intra-Assay-Varianz, englisch: *within-run precision*) oder zwischen zwei Assays (Inter-Assay-Varianz, englisch: *between-run precision*) miteinander verglichen werden [175, 176, 178]. Die Ungenauigkeit eines Assays, die sogenannte Unpräzision, wird durch den prozentualen Varianzkoeffizienten (CV%) beschrieben. Dieser wird als prozentuale Abweichung vom Mittelwert ausgedrückt und zeigt etwaige Unstimmigkeiten und Ungenauigkeiten in den Ergebnissen (siehe Formel 7).

$$\text{Varianzkoeffizient (CV\%)} = \frac{\text{Standardabweichung}_{\text{Replikate}}}{\text{Mittelwert}_{\text{Replikate}}} \times 100\% \quad (7)$$

Eine größere Varianz deutet auf eine größere Unstimmigkeit und Fehler und letztlich je nach Akzeptanzkriterien ggf. auf eine unpräzise, nicht valide Analysemethode hin. Für die Bewertung der Inter-Assay-Varianz können zum einen Korrelationsanalysen als auch der direkte Vergleich der Messwerte oder der durchschnittliche Varianzkoeffizient beider Messungen betrachtet werden [175, 176, 178].

3.1.3 Tabellarischer Verifizierungsplan

Der in diesem Teil der vorliegenden Arbeit etablierte tabellarische Verifizierungsplan basiert auf den in Kapitel 3.1.1 aufgeführten Festphasenparametern und den in Kapitel 3.1.2 dazugehörige Kenngrößen und wurde in Anhang 1 verzeichnet. Während einige Testvarianten stets analysiert und unter Verwendung verschiedener Kenngrößen bewertet werden müssen (obligatorisch), kann der Umfang der jeweiligen Verifizierungsstudie durch weitere Testvarianten optional erweitert werden. Da gerade im Kontext von Proteinfehlfaltungs-erkrankungen bzw. neurodegenerativen Erkrankungen die Anzahl und das Volumen an biologischen Proben für die Eruierung all dieser Parameter und Testvarianten limitiert ist, wurden entsprechende Modellsysteme wie SiNaPs oder synthetische Proteinaggregate implementiert. Falls vorhanden, können die Studienpläne durch die Verwendung biologischer

Proben ergänzt werden, wobei im tabellarischen Verifizierungsplan die Mindestanzahl an Proben und deren Eigenschaften verzeichnet wurden. Darüber hinaus wurden für jeden einzelnen Festphasenparameter mögliche Limitierungen sowie weiterführende Literatur herausgearbeitet und dokumentiert.

3.2 Anwendung des Verifizierungsplans

Um die Effektivität einer systematischen Festphasenentwicklung anhand des erstellten Verifizierungsplans zu demonstrieren, wurden anschließend Coating-Parameter, Komposition der Blockadelösung sowie des Probenpuffers und das Detektionssystem des sFIDA-Assays für die Quantifizierung von Aβ-Aggregaten eruiert. Aufgrund der limitierten Anzahl an biologischen Proben erfolgte die Verifizierung ausschließlich unter Verwendung von Aβ1-15 SiNaPs sowie synthetischen Aβ1-42 Aggregaten. Im Folgenden wurden sowohl verwendete Materialien als auch angewandte Methoden detailliert beschrieben und die Ergebnisse der einzelnen Verifizierungsstudien aufgeführt sowie diskutiert.

3.2.1 Material

Alle Experimente wurden am Forschungszentrum Jülich in den Laboratorien des Instituts für Strukturbiochemie unter Einhaltung der ISO 9001:2015 durchgeführt. Um den Standard der guten wissenschaftlichen Laborpraxis zu sichern, wurden ausschließlich geprüfte Materialien und kalibrierte Gerätschaften verwendet. Detaillierte Angaben zu den Verbrauchsmaterialien und den verwendeten Gerätschaften sind mit Herstellerangaben Anhang 2 und Anhang 3 zu entnehmen. Selbsthergestellte Puffer und Lösungen wurden ausschließlich mit hochreinem Milli-Q-Wasser angesetzt und anschließend falls möglich bei 20 min und 121 °C autoklaviert oder alternativ unter Verwendung von 0,22 µm Membranfiltern sterilfiltriert. Bei den verwendeten Prozentangaben handelt es sich um Gewichtsprozent. Alle Puffer und Lösungen wurden vor Verwendung auf RT temperiert, wobei der pH-Wert der einzelnen Puffer mittels pH-Meter überprüft und ggf. mit Natriumhydroxid (5 M oder 10 M) sowie Salzsäure (16% oder 32%) justiert wurde. In Anhang 4 sind die für diesen Teil der vorliegenden Arbeit relevanten Chemikalien und Lösungen aufgelistet. Materialien, die im Rahmen der Entwicklungsarbeiten verwendet wurden, sind in den jeweiligen Kapiteln verzeichnet. Falls nötig, wurden Chemikalien oder Lösungen bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

3.2.1.1 Verwendete Mikrotiterplatten

Um die Erfassung einzelner Proteinaggregate mittels hochauflösender TIRFM technisch umsetzten zu können, wurden für diese Arbeit unbeschichtete 384-Well-Mikrotiterplatten mit Glasboden der Sorte SensoPlate Plus von Greiner Bio-One GmbH (Artikelnummer 781856, Frickenhausen, Deutschland) verwendet. Das verwendete Borsilicat ist optisch transparent,

ermöglicht die für TIRFM nötige Ölimmersion und weist zudem im Vergleich zu polymerbasierten Materialien eine geringe Eigenfluoreszenz auf [199, 200], wodurch Hintergrundrauschen minimiert und eine höhere optische Auflösung erzielt werden konnte.

3.2.1.2 Verwendete Assay-Antikörper und verwendetes Sondenprotein

Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, weisen lösliche Proteinaggregate insbesondere Proteinoligomere heterogene Eigenschaften bezüglich des Molekulargewichts, der Form, der Struktur sowie der Dynamik auf. Die Verwendung konformationsspezifischer Antikörper kann folglich in einer Reduzierung der analytischen Sensitivität resultieren [20]. In diesem Teil der Arbeit wurden daher ausschließlich Antikörper verwendet, welche spezifisch für lineare Epitope des N-Terminus des Aβ-Peptids sind. Dadurch wurde die Immobilisierung aller Aβ-Spezies einschließlich monomerer, aggregierter oder fibrillärer Strukturen gewährleistet. In Tabelle 3 sind die verwendeten Antikörper sowie das für FLOSS verwendete Protein G mit detaillierten Angaben zu den biochemischen Eigenschaften, Herstellerangaben sowie der jeweiligen Verwendung im sFIDA verzeichnet. Die für die Fluoreszenzmarkierung verwendeten Farbstoffmoleküle sind Anhang 4 zu entnehmen.

Tabelle 3 – Verwendete Antikörper und verwendetes Sondenprotein.

Bezeichnung	Verwendung im sFIDA	Analyt	Epitop	Typ	Artikel-Nr.	Hersteller
Nab228	Capture Detektion	Humanes Aβ	aa1-11	monoklonaler Mausanti-körper	A8354	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
IC16	Detektion	Humanes Aβ	aa2-8	monoklonaler Antikörper	-	Prof. Dr. Carsten Korth (Düsseldorf, Deutschland)
6E10 AF488	Detektion	Humanes Aβ	aa1-16	monoklonaler Mausanti-körper	803013	BioLegend, Inc. (San Diego, CA, USA)
Protein G	FLOSS	Humaner IgG	Fc	Exprimiert in *Escherichia coli*	NBP2-34962	Novus Biologicals, Bio-Techne GmbH (Wiesbaden, Deutschland)

3.2.1.3 Verwendete Peptide

Für die Kalibrierung der pixelbasierten Messdaten werden innerhalb der sFIDA-Technologie SiNaPs verwendet, die je nach Biomarker mit unterschiedlichen Peptiden oder Proteinen beschichtet werden (siehe Kapitel 1.3.2.2). Für diesen Teil der Arbeit wurden SiNaPs mit Aβ1-15 Peptid (Peptides & elephants GmbH, Artikelnummer EP12452, Funktionalisierung C-terminal mit Cysteamine-SH, Henningsdorf, Deutschland) konjugiert. Als weiteres

Modellsystem und als interne Qualitätskontrollprobe wurden zudem synthetische Aggregate aus Aβ1-42 (Bachem Holding GmbH, Artikelnummer 4014447, Bubendorf, Schweiz) hergestellt.

3.2.1.4 Software

Die für diesen Teil der Arbeit relevanten Softwareprogramme sind in Tabelle 4 zusammen mit Angaben zum Hersteller bzw. Entwickler verzeichnet.

Tabelle 4 – Verwendete Softwareprogramme.

Software	Hersteller/Entwickler
BioRender	BioRender (Toronto, Kanada)
ImageJ	National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA)
LAS AF	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Liquid Handling Control 2.13	BioTek Instruments GmbH (Bad Friedrichshall, Deutschland)
MS Office2016	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
matlab2019b	The MathWorks, Inc (Natick, MA, USA)
Origin Pro2017G 64 Bit	OriginLab Corporation (Northampton, MA, USA)
sFIDAta	Forschungszentrum Jülich, Institut für Strukturbiochemie (Jülich, Deutschland)

3.2.2 Methoden

3.2.2.1 Synthese und Konjugation von Aβ1-15 SiNaPs als Kalibrationsstandard

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurden SiNaPs mit Aβ1-15 Peptid konjugiert und als Kalibrationsstandard verwendet, wobei eingangs Siliziumoxid-Grundkörper mittels Stöber-Synthese analog dem Protokoll von Hülsemann et al. hergestellt wurden [143].

Hierzu wurde der Reaktionsansatz bestehend aus 200 mL Ethanol, 322 mmol Wasser und 59 mmol Ammoniumhydroxid in einem 500 mL Rundkolben angesetzt und 5 min stark gerührt. Anschließend wurden 20 mmol Tetraethylorthosilicat (TEOS) zügig hinzugegeben und die Reaktionslösung für zwei Tage bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung auf 50 mL Zentrifugenröhrchen verteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C in Ethanol gelagert. Für die Größenbestimmung mittels Transmissionselektronenmikroskop (TEM) wurde ein TEM-Netz für 2 min in eine 1:100 mit Ethanol verdünnte SiNaPs-Lösung eingetaucht und anschließend an der Luft getrocknet. Die immobilisierten SiNaPs wurden mit 20.000× Vergrößerung mittels TEM vermessen und die Durchmesser von 102 Siliziumoxid-

Grundkörpern mittels ImageJ erfasst. Zur gravimetrischen Konzentrationsbestimmung wurde die Reaktionslösung mittels Zentrifugenkonzentrator bei 60 °C für etwa 1,5 h ohne Zentrifugation evaporiert. Hierfür wurde vorab das Leergewicht von vier 1,5 mL Reaktionsgefäßen aus Polypropylen mittels Feinwaage ermittelt und je 1 mL des Reaktionsansatzes in drei der Reaktionsgefäße gegeben. Das vierte Reaktionsgefäß diente als Referenz und wurde lediglich mit 1 mL Ethanol befüllt. Nach der Evaporation wurden die Reaktionsgefäße auf RT abgekühlt und deren Gewichte erfasst.

Anschließend wurden Massenkonzentration sowie weitere Kernparameter wie Volumen, Oberfläche, Masse, Stoffmengenkonzentration und Molekulargewicht der SiNaPs berechnet, bevor die synthetisierten Siliziumoxid-Grundkörper unter Verwendung von 3-Aminopropylsilan (APTES, 5× Überschuss) funktionalisiert wurden. Hierfür wurden 45 mL der hergestellten Siliziumoxid-Lösung in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 10 µL Essigsäure für etwa 1 min stark gemischt, bis die ansonsten klare Lösung eine starke Trübung aufwies. Im Anschluss wurden 165 µL APTES hinzugegeben und der Reaktionsansatz für 1 min stark gemischt. Nach Zugabe eines Magnetrührfischs wurde das Zentrifugenröhrchen kopfüber in ein Stativ über einen Magnetrührer gespannt und der Aminierungsansatz durch Erzeugen eines Strudels für 2,5 h inkubiert. Anschließend wurde der Rührfisch entfernt und der Reaktionsansatz 4 min bei 5000 × *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandenen Pellet in 50 mL Ethanol unter Schütteln und Sonifizieren resuspendiert. Nach zwei weiteren Waschzyklen erfolgte die gravimetrische Konzentrationsbestimmung der aminierten SiNaPs mit einem Testvolumen von 500 µL pro Reaktionsgefäß. Bis zur weiteren Verwendung wurden die aminierten SiNaPs in Ethanol bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Konjugation der aminierten SiNaPs mit Aβ1-15 Peptid wurden die Amingruppen mittels Maleimidohexansäure funktionalisiert. Hierzu wurde Maleimidohexansäure vorab in PBS mit 10% N,N-Dimethylformamid (DMF) gelöst und mit 200 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 50 mM NHS für 10 min bei RT aktiviert. Während der anschließenden Inkubation mit aminierten SiNaPs wurde die Carboxylgruppe der Maleimidohexansäure unter Abspaltung der NHS-Gruppe kovalent an die Amine der SiNaPs konjugiert. Nach 1 h bei RT wurden die Maleimidohexansäure-konjugierten SiNaPs zentrifugiert (7000 × *g*, 2 min) und in PBS mit 10% DMF redispergiert. Dieser Waschschritt wurde dreimal wiederholt, wobei das Pellet im letzten Schritt in PBS mit 10% DMF und 50 mM Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (Na_2EDTA) redispergiert wurde. Wie in Kapitel 3.2.1.3 beschrieben, war das verwendete Aβ1-15 Peptid am C-Terminus mit Cysteamin funktionalisiert, wodurch die kovalente Kopplung mit der Maleimidgruppe der SiNaPs ermöglicht wurde. Für die in diesem Teil der vorliegenden Arbeit durchgeführten Synthese wurden 10% der möglichen Bindestellen durch Zugabe von Protein konjugiert. Die Dispersion wurde anschließend für 1 h bei RT und 650 rpm geschüttelt, bevor 50 µL 1 M TCEP

zugegeben wurden, um die Oxidation des Proteins zu verhindern. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µL einer 1 M 2-Mercaptoethanol-Lösung gestoppt und die biokonjugierten SiNaPs zweimal durch Zentrifugation (10.000 × *g*, 4 min) und Redispersion mit ddH_2O gewaschen.
Abschließend wurde die Siliziumkonzentration mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma bestimmt und die resultierende molare SiNaPs-Konzentration anhand der mittels TEM determinierten Größe sowie Dichte berechnet. Die hergestellten SiNaPs wurden vor Verwendung im sFIDA im Ultraschallbad für 10 min bei Stufe 9 sonifiziert.

3.2.2.2 Synthetische Aβ1-42 Aggregate als interne Kontrollprobe

Um beispielsweise den Einfluss des Probenpuffers auf die Antigenpräsentation detaillierter analysieren zu können, wurden neben den SiNaPs zusätzlich Aggregate aus synthetischem Aβ1-42 Peptid hergestellt. Zu Beginn der Arbeit wurde die Aggregation in einer Multiwellplatte durchgeführt (Aggregationsprotokoll a, EXP1-EXP5); jedoch wurde das Protokoll zwischenzeitlich für die Aggregation im Reaktionsgefäß adaptiert (Aggregationsprotokoll b, EXP6).

Aggregationsprotokoll a

Für die Aggregation wurde Aβ1-42 in 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) gelöst und anschließend mittels Zentrifugenkonzentrator evaporiert. Anschließend wurde das Pellet in 1× PBS + 0,04% Natriumazid zu einer Stockkonzentration von 10 µM gelöst und die Monomerlösung mit je 100 µL pro Well in eine 96-Well Mikrotiterplatte (Corning Inc., Artikelnummer 3881, Corning, NY, USA) transferiert und diese mittels SealPlate versiegelt. Nach einer Inkubation von 16 h bei 37 °C im Heizschrank wurden die entstandenen Aggregate aus dem Well in ein Low-Binding Reaktionsgefäß überführt und vor Benutzung im sFIDA mittels Ultraschallsonde (15 Sekunden insgesamt mit je 3 Sekunden Puls, 3 Sekunden Pause, Amplitude 10%) sonifiziert. Die Verdünnung wurde zu Beginn der Festphasenentwicklung in Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) hergestellt.

Aggregationsprotokoll b

Um den zusätzlichen Transferschritt der hergestellten Aβ-Aggregate von der 96-Well Mikrotiterplatte in ein Low-Binding Reaktionsgefäß zu umgehen, wurde im Laufe der vorliegenden Arbeit Aggregationsprotokoll b etabliert, bei dem die Aggregation von Aβ1-42 direkt in einem Low-Binding Reaktionsgefäß durchgeführt wurde. Hierzu wurden 5 µg Aβ1-42 Peptid (HFIP-behandelt, getrocknet) mit 5 µL Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, kurz vermischt sowie zentrifugiert und für 10 min bei 650 rpm bei RT agitiert. Anschließend wurde der Ansatz durch Zugabe von 1× PBS + 0,04% Natriumazid auf 10 µM verdünnt, erneut gemischt und

zentrifugiert. Für eine hohe Reproduzierbarkeit wurde das Reaktionsgefäß anschließend bei 650 rpm bei RT für 16 h geschüttelt. Vor Verwendung der Aggregate im sFIDA wurde der Reaktionsansatz für 20 min bei Stufe 9 im Ultraschallbad sonifiziert und mit dem entsprechenden Probenpuffer verdünnt.

3.2.2.3 Fluoreszenzmarkierung der Detektionssonden

Für die Konjugation der Assay-Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen wurden CF-Farbstoffe der Firma Biotium (Vertrieb durch Sigma-Aldrich) verwendet, die über eine Succinimidyl-Estergruppe verfügen und somit eine aminspezifische Kopplung über Lysine ermöglichten. Unter basischen Bedingungen wurden die Esterbindungen der Farbstoffe von den primären Amingruppen der Antikörper nucleophil angegriffen und unter Abspaltung der NHS-Gruppe eine Peptidbindung zwischen Antikörper und Fluorophor erzeugt. Außer dem anti-Aβ Mausantikörper 6E10 AF488, welcher kommerziell von Biolegend erworben wurde, wurden alle in diesem Teil der vorliegenden Arbeit verwendeten Detektionssonden (siehe Tabelle 3) selbst mit Fluoreszenzfarbstoff konjugiert. Hierzu wurde der jeweilige Markierungsansatz bestehend aus Antikörper, Fluoreszenzfarbstoff sowie $NaHCO_3$ analog den Herstellerangaben angesetzt und lichtgeschützt für 1 h bei RT und 600 rpm inkubiert. Die anschließende Auftrennung des Markierungsansatzes erfolgte mittels Größenausschluss unter Verwendung einer Zentrifugensäule, welche vorab mit 2,2 mL Polyacrylamid-Bead-Suspension befüllt und vor Zugabe des Markierungsansatzes bei 1000 × *g* für 2 min zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das Gemisch aus markiertem Antikörper und freiem Farbstoff auf das Säulenbett aufgetragen und mittels Zentrifugation (3 min bei 1000 × *g*) der Größe nach getrennt. Dabei verblieb ungebundener Farbstoff im Säulenbett, während sich das Antikörperkonjugat im Durchfluss befand.

Um die Konzentration des Antikörperkonjugats zu ermitteln, wurden die Absorption des markierten Antikörpers bei 280 nm und die Absorption des Farbstoffs bei dessen spezifischen Anregungswellenlänge mittels Spektralphotometer gemessen. Anschließend wurden diese mit einem Korrekturfaktor und dem Extinktionskoeffizienten des Antikörpers bzw. des Fluorophors verrechnet (siehe Formel 8).

$$c_{\text{Protein}} = \frac{(A_{280\,\text{nm}} - (A_{\lambda\text{ex}} \times \text{KF}))}{\varepsilon_{\text{AK}} \times d} \tag{8}$$

c: Stoffmengenkonzentration des fluoreszenzmarkierten Proteins [mol·L^{-1}]
$A_{280\,\text{nm}}$: Absorbanz des fluoreszenzmarkierten Proteins
$A_{\lambda\text{ex}}$: Absorbanz des Fluorophors
KF: Korrekturfaktor
ε_{AK}: Extinktionskoeffizient des Proteins [mol^{-1}·L·cm^{-1}]
d: Schichtdicke der Küvette [cm]

Der Markierungsgrad (englisch: *Degree of Labelling*, DOL) der jeweiligen Detektionssonde wurde anhand der zuvor ermittelten Proteinkonzentration und der Anregungswellenlänge sowie des Extinktionskoeffizienten des Fluorophors berechnet werden (siehe Formel 9).

$$\mathrm{DOL} = \frac{A_{\lambda ex} \times \mathrm{VF}}{\varepsilon_F \times c_{\mathrm{Protein}} \times d} \quad (9)$$

$A_{\lambda ex}$: Absorbanz des Fluorophors
VF: Verdünnungsfaktor
ε_F: Extinktionskoeffizient des Fluorophors [$mol^{-1} \cdot L \cdot cm^{-1}$]
$c_{Protein}$: Stoffmengenkonzentration des fluoreszenzmarkierten Proteins [$mol \cdot L^{-1}$]
d: Schichtdicke der Küvette [cm]

Die Detektionssonden wurden bis zur weiteren Verwendung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert und zu Beginn der Festphasenentwicklung in TBS verdünnt.

3.2.2.4 Studien zur Festphasenentwicklung

Wie zuvor beschrieben wurden sowohl Aβ1-15 SiNaPs als auch synthetische Aβ1-42 Aggregate als Analyten für die Festphasenentwicklung verwendet, wobei diese jeweils in Vierfachbestimmung mittels elektrischer Einkanalpipette auf die Assay-Oberfläche appliziert wurden. Der jeweilige Verdünnungspuffer diente in den einzelnen Experimenten als Nullkontrolle und wird daher im Folgenden als Pufferkontrolle bezeichnet. Um Staub sowie mikrobielle Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Experimente unter der Sterilbank durchgeführt. Zudem wurden fusselfreie Reinigungstücher für die Desinfektion des Mikrotiterplattendeckels verwendet sowie der Waschpuffer vor der TIRFM-Messung durch TBS-ProClin ersetzt. Auf RT-temperierte Puffer und Lösungen, reverses Pipettieren sowie die Verwendung eines Waschroboters zur Entfernung ungebundener Reaktanden dienten zur Reduzierung der Intra-Assay-Varianz.

Initialbedingungen des sFIDA-Assays zur Quantifizierung von Aβ-Aggregaten

Nach Auswahl der Physisorption als Immobilisierungstechnik wurde der sFIDA-Assay zu Beginn der Festphasenentwicklung analog der folgenden Standardprozessierung mit den verzeichneten initialen Bedingungen präpariert. Die verwendeten Konzentrationen an Nab228 CF633 und 6E10 AF488 als Detektionssonden wurden in einem Vorversuch mittels Feintitration ermittelt (Daten nicht gezeigt). In den folgenden Abschnitten wurden die einzelnen Experimente zur Festphasenentwicklung detailliert beschrieben, wobei lediglich die veränderten Parameter genannt wurden. Ansonsten wurde nach dem im Folgenden beschriebenen Protokoll verfahren.

Schritt 1: Coating

- **Immobilisierung des Capture-Antikörpers**

  Capture-Antikörper: 5 µg/mL in 0,1 M $NaHCO_3$-Puffer pH 8,4

  Volumen pro Well: 40 µL

  Inkubation: über Nacht (15 h) bei 4 °C

  Waschen: 5× mit 80 µL 1× TBS-T, 5× 80 µL 1× TBS

- **Blockierung freier Glasoberfläche**

  Blocking: 1% BSA, gelöst in TBS-ProClin

  Volumen pro Well: 80 µL

  Inkubation: 1 h bei RT

  Waschen: 5× mit 80 µL 1× TBS-T, 5× 80 µL 1× TBS

Schritt 2: Probeninkubation

- **Vorbehandlung der Aβ1-15 SiNaPs und Aβ1-42 Aggregate**

  Aβ1-15 SiNaPs: Sonifizieren im Ultraschallbad, 10 min bei Stufe 9

  Aβ1-42 Aggregate: hergestellt analog Aggregationsprotokoll a, Sonifizieren mit Ultraschallsonde

- **Verdünnung und Applikation der Analyten**

  Probenpuffer: 1× TBS

  Volumen pro Well: 20 µL

  Inkubation: 1 h bei RT

  Waschen: 5× 80 µL 1× TBS

Schritt 3: Inkubation mit Detektionssonden

- **Herstellung und Zentrifugation der Detektionsantikörperlösung**

  Detektionsantikörperpuffer: 1× TBS

  Detektionssonden: 0,156 µg/mL Nab228 CF633, 0,625 µg/mL 6E10 AF488

  Ultrazentrifugation: 1 h bei 4 °C bei 100.000 × *g*, Überstand überführen

- **Applikation der Detektionssonden**

  Volumen pro Well: 20 µL Überstand

  Inkubation: 1 h bei RT

  Waschen: 5× 80 µL 1× TBS

  Pufferwechsel: TBS durch TBS-ProClin ersetzen

EXP1: Überprüfung der Physisorption als Immobilisierungstechnik

Bisher wurden im sFIDA lediglich kovalente Immobilisierungstechniken verwendet [143, 157-160]. Hierfür wurde die Glasoberfläche zuerst aminiert und anschließend mit präaktivierten Polyethylenglycol (PEG) als Spacer funktionalisiert. Die NHS-Gruppe des Spacers bildete dabei mit den Amingruppen der Oberfläche eine Peptidbindung aus wohingegen die Carboxylgruppe des Spacers nach Aktivierung mit den Amingruppen des Antikörpers eine Esterbindung einging. Da dieser Coating-Prozess aufwendig und kostenintensiv ist, wurde innerhalb dieser Arbeit die Physisorption (im Folgenden unteranderem auch als nicht-kovalentes Coating bezeichnet) als mögliche Alternative getestet. Um zu überprüfen, ob Antikörper über intermolekulare Kräfte an die Glasoberfläche adsorbieren und diese Bindung nach mehreren Assay-Prozeduren ausreichend stabil sein kann, wurden eingangs zwei verschiedene FLOSS-Experimente durchgeführt. Im Anschluss wurde die Reaktivität der immobilisierten Capture-Antikörper überprüft und mit der kovalenten Spacer-vermittelten Immobilisierungstechnik verglichen.

EXP1a: Adsorption des Capture-Antikörpers an die Glasoberfläche

Im ersten Versuch wurde fluoreszenzmarkierter Nab228 CF633 Antikörper (Markierung mit CF633 Fluoreszenzfarbstoff) in 0,1 M $NaHCO_3$ mit pH 8,4 zu einer Konzentration von 7,5 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1,25 µg/mL und 0,625 µg/mL verdünnt, wobei als Kontrolle $NaHCO_3$ ohne Antikörper verwendet wurde. Pro Well wurden 40 µL der jeweiligen Antikörper-Lösung appliziert und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde ungebundener Antikörper durch 5× Waschen mit je 80 µL ddH_2O entfernt und die Fluoreszenzsignale der immobilisierten Antikörper mittels TIRFM erfasst.

EXP1b: Stabilität der Physisorption

In einem zweiten Experiment sollte überprüft werden, ob die Antikörperimmobilisierung mittels Physisorption ausreichend stabil ist, sodass sie auch mehrere Assay-Schritte inklusive mehrerer Waschschritte standhält. Hierfür wurde Nab228 Antikörper ebenfalls in 0,1 M $NaHCO_3$ Puffer pH 8,4 zu einer Konzentration von 7,5 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1,25 µg/mL und 0,625 µg/mL verdünnt und für 15 h auf der Glasoberfläche inkubiert. Als Kontrolle diente hier ebenfalls $NaHCO_3$ ohne Antikörper. Anschließend wurden die Wells mit 5× TBS-T und 5× TBS gewaschen und mit TBS-ProClin + 1% BSA für 1,5 h blockiert. Nach einem erneuten Waschzyklus mit 5× TBS-T und 5× TBS wurde fluoreszenzmarkiertes Protein G CF633 in einer Konzentration von 0,625 µg/mL in 1× TBS verdünnt und mit je 20 µL pro Well für 1 h Stunde auf der Oberfläche inkubiert. Nach einem finalen Waschschritt mit 5× TBS wurden die Fluoreszenzsignale mit TIRFM erfasst.

EXP1c: Reaktivität der Capture-Antikörper und Vergleich der Immobilisierungstechniken

Innerhalb eines dritten Experiments wurde das nicht-kovalente Coating mit dem bisher etablierten kovalenten Coating mit PEG als Spacer bezüglich Signalstärken und unspezifischen Bindungen verglichen. Für die Ermittlung der Capture-Kontrolle wurden die Wells während der Capture-Inkubation lediglich mit Puffer inkubiert.

Für die Modifizierung der Glasoberfläche mit PEG wurde eine Mikrotiterplatte zuerst unter Argon-Atmosphäre aminiert und anschließend unter Verwendung von präaktiviertem PEG funktionalisiert. Hierfür wurden 250 µL APTES mit 5 mL Toluol in einer Kristallisierschale verdünnt und diese mittig in einen Exsikkator platziert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte kopfüber über die Schale gesetzt, für 10 min Vakuum gezogen und der Exsikkator über einen Ballon mit Argon geflutet. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde die Kristallisierschale entfernt und die aminierte Platte für 2 h unter Vakuum getrocknet. Als Spacer wurde ein präaktiviertes PEG verwendet, welches direkt vor Verwendung in ddH_2O auf eine Konzentration von 4 mM gelöst wurde. Vor Zugabe der PEG-Lösung (20 µL pro Well) wurden 20 µL PBS in die Wells vorgelegt, um ein leicht basisches Milieu zu produzieren, damit die Amine der Glasoberfläche nicht protoniert vorliegen und den Carbonyl-Kohlenstoff des PEG-Moleküls unter Abspaltung der NHS-Gruppe nukleophil angreifen konnten. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT wurden die Wells 5× mit 80 µL ddH_2O gewaschen. Anschließend wurden die Carboxylgrupppe der kovalent gekoppelten PEG-Moleküle mit einer Lösung aus 200 mM EDC und 50 mM NHS in 0,1 M 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) für 30 min aktiviert, wodurch später die Amingruppen des Capture-Antikörpers nukleophil reagieren konnten. Hierzu wurde Nab228 Antikörper zu einer Konzentration von 5 µg/mL in 0,1 M $NaHCO_3$ pH 8,4 angesetzt und mit je 20 µL pro Well auf die funktionalisierte Glasoberfläche appliziert. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT wurden die Wells mit 5× TBS-T und 5× TBS gewaschen und mit 1% BSA in TBS-ProClin über Nacht bei RT blockiert (50 µL pro Well). Vor Zugabe der Aβ1-15 SiNaPs und der synthetischen Aβ1-42 Aggregate wurden die Wells erneut mit 5× TBS-T und 5× TBS gewaschen. Anschließend wurden pro Well 20 µL Probe appliziert, für 1 h bei RT inkubiert und ungebundene Probe durch 5× Waschen mit TBS entfernt. Die Fluoreszenzmarkierung der immobilisierten Proben erfolgte unter Zugabe von 0,156 µg/mL Nab228 CF633 und 0,625 µg/mL 6E10 AF488 in TBS (20 µL pro Well) für 1 h bei RT. Ungebundene Sonden wurden durch fünfmaliges Waschen mit je 80 µL TBS entfernt. Um das Risiko einer mikrobiellen Kontamination während der Messung zu minimieren, wurde ein Pufferwechsel mit TBS-ProClin durchgeführt.

Da es für das nicht-kovalente Coating keine Funktionalisierung der Oberfläche bedarf, wurde für dieses Teil des Experiments eine separate Mikrotiterplatte verwendet. Auf die unbehandelte Oberfläche wurde Nab228 ebenfalls zu einer Konzentration von 5 µg/mL und in 0,1 M $NaHCO_3$ verdünnt und die Coating-Lösung mit je 40 µL pro Well appliziert. Nach einer

15-stündigen Inkubation bei 4 °C wurden die Wells 5× TBS-T und 5× TBS gewaschen und mit 80 µL Blockadelösung (1% BSA in TBS-ProClin) für 1 h bei RT blockiert. Nach einem erneuten Waschzyklus mit 5× TBS-T und 5× TBS wurden pro Well 20 µL der vorbereiteten Proben (Aβ1-15 SiNaPs und synthetische Aβ1-42 Aggregate) zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Wie auch beim PEG-Coating wurden die immobilisierten Proben mit 0,156 µg/mL Nab228 CF633 und 0,625 µg/mL 6E10 AF488 in TBS für 1 h bei RT markiert. Vor der Messung wurden die ungebundenen Sonden durch 5× Waschen mit TBS entfernt und der Waschpuffer final durch TBS-ProClin ersetzt.
Beide Mikrotiterplatten wurden mittels TIRFM vermessen und im Anschluss wurden sFIDA Readouts, Pixel Counts, Signalsteigerung sowie die Signalreduzierung in Abwesenheit des Capture-Antikörpers auf Basis eines 0,1% Cut-off bezogen auf die Pufferkontrolle TBS berechnet.

EXP2: Eruierung eines geeigneten Coating-Puffers

Wie in Kapitel 3.1.1.2 beschrieben, wird die native Konformation sowie die Löslichkeit des zu immobilisierenden Proteins maßgeblich durch die verwendeten Puffersysteme sowie den Salzgehalt und den pH-Wert beeinflusst. Daher wurden im Anschluss an die Eruierung der Immobilisierungstechnik die in Tabelle 5 aufgeführten Coating-Puffer getestet.

Tabelle 5 – Übersicht über getestete Coating-Puffer. Referenz wurde mit * gekennzeichnet.

Variante	Puffersystem	Puffer	pH-Wert
V1	sauer	0,1 M MES	3,5
V2	neutral	1× PBS	7,5
V3*	basisch	0,1 M $NaHCO_3$	8,4

Nab228 Antikörper wurde hierfür mit den verschiedenen Puffern auf eine Konzentration von 5 µg/mL verdünnt und die Coating-Lösung anschließend mit je 40 µL in die Wells appliziert. Für die Capture-Kontrolle wurde lediglich der jeweilige Coating-Puffer ohne Nab228 Antikörper in die Wells pipettiert. Nach 15 h Inkubation bei 4 °C wurden die Wells analog zu den in Kapitel 3.2.2.4 beschriebenen Initialbedingungen weiter prozessiert. Für die Eruierung des geeigneten Puffers wurden sowohl das Signal-Rausch-Verhältnis, die Signalreduzierung bei Abwesenheit des Capture-Antikörpers sowie der hintergrundbasierte Cut-off in Betracht gezogen.

EXP3: Titration der Capture-Antikörper mittels Stufencoating

Um die analytische Sensitivität des Assays zu erhöhen, wurde im Anschluss die Konzentration an Capture-Antikörper titriert, wobei in diesem Teil der vorliegenden Arbeit das Signalentwicklungspotenzial des Assays mittels Stufencoating analysiert wurde. Unter Verwendung des zuvor definierten Coating-Puffers wurden Coating-Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen an Nab228 Antikörper (siehe Tabelle 6) hergestellt und die Wells mit je 40 µL der jeweiligen Lösung für 15 h bei 4 °C inkubiert. Unspezifische Bindungen der Aβ1-15 SiNaPs bzw. der synthetischen Aβ1-42 Aggregate an die Oberfläche wurden mittels Capture-Kontrolle (V1) erfasst.

Tabelle 6 – Verwendete Konzentrationen an Capture-Antikörper in Anlehnung an die verwendeten Konzentrationen im EXP1b. Referenz wurde mit * gekennzeichnet.

Variante	Konzentration [µg/mL]
V1	0
V2	0,625
V3	1,25
V4	2,5
V5*	5,0
V6	7,5

Blockadelösung sowie die Zusammensetzung der Detektionssonden wurden analog den Initialbedingungen übernommen. In diesem Versuch wurden die Proben ebenfalls 1:10 verdünnt, jedoch wurde anstatt TBS als Probenverdünnungspuffer TBS-ProClin mit 1% BSA verwendet. Für die Eruierung der geeigneten Capture-Konzentration wurden sowohl die sFIDA Readouts als auch die Signalsteigerungen der Aβ1-15 SiNaPs bzw. der synthetischen Aβ1-42 Aggregate miteinander verglichen.

EXP4: Untersuchung verschiedener Blocking-Agenzien

In einem Vorversuch wurden verschiedene Blockadelösungen untersucht und anhand des Hintergrundrauschens, der Capture-Kontrolle und der Signalsteigerung von Aβ1-15 SiNaPs und synthetischen Aβ1-42 Aggregaten bewertet. In einem Vorversuch wurden verschiedene Blockadelösungen auf Basis von BSA, Milchpulver und Casein sowie die beiden kommerziellen Blockadelösungen der Firma Candor Bioscience GmbH *Smart Block* und *The Blocking Solution* miteinander verglichen (Daten nicht gezeigt). Da lediglich die Blockadelösung auf BSA-Basis eine Reduzierung des Hintergrundrauschens gewährleisten konnte, wurden in diesem Experiment unterschiedlich stark konzentrierte BSA-Lösungen getestet (siehe Tabelle 7). Die Wells der Mikrotiterplatte wurden hierzu mit je 40 µL der zuvor

definierten Coating-Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach einem Waschzyklus mit 5× TBS-T und 5× TBS wurde noch freie Glasoberfläche mit je 80 µL der jeweiligen Blockadelösung für 1,5 h bei RT beschichtet. Zusätzlich wurde der Einfluss auf die Assay-Leistung bei Abwesenheit eines Blocking-Agenz analysiert.

Tabelle 7 – Übersicht über die getesteten Blockadelösungen. Referenz wurde mit * gekennzeichnet.

Variante	Blockadelösung
V1	TBS-ProClin
V2	TBS-ProClin + 0,5% BSA
V3*	TBS-ProClin + 1% BSA
V4	TBS-ProClin + 3% BSA
V5	TBS-ProClin + 5% BSA

Auch in diesem Experiment wurde für die Verdünnung der Aβ1-15 SiNaPs und der synthetischen Aβ1-42 Aggregate TBS-ProClin mit 1% BSA als Probenpuffer verwendet. Zusätzlich wurden für jede Coating-Variante vier Replikate von 1026 fM Aβ1-15 SiNaPs als auch 10 nM synthetischer Aβ1-42 Aggregate auf die Assay-Oberfläche appliziert, wo zuvor kein Capture-Antikörper immobilisiert wurde und anschließend die prozentuale Signalreduzierung kalkuliert. Für die Eruierung der geeigneten Konzentration an Blocking-Agenz wurde die analytische Spezifität anhand der Capture-Kontrolle und der applizierten Pufferkontrolle sowie die analytische Sensitivität anhand des Signal-Rausch-Verhältnis bewertet.

EXP5: Optimierung des Probenpuffers

Um die analytische Sensitivität weiter zu erhöhen, wurde als nächstes die Komposition des Probenverdünnungspuffers durch Einsatz von Blocking-Agenz und Detergenz variiert. Hierzu wurden die Wells der Mikrotiterplatte mit der zuvor definierten Coating-Lösung beschichtet und freie Glasoberfläche mit der eruierten Blockadelösung gesättigt. In diesem Experiment wurde die Inkubationsdauer der Blockierung erstmals um weitere 30 min erhöht. Da in zwei Vorversuchen das Signal-Rausch-Verhältnis der Aβ1-15 SiNaPs und der synthetischen Aβ1-42 Aggregate durch Wechsel des Basispuffers von TBS auf PBS sowie durch die Reduzierung der BSA-Konzentration auf 0,5% gesteigert werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurden in diesem Versuch beide Analyten mit den in Tabelle 8 hergestellten Probenpuffern verdünnt und mit je 20 µL in Vierfachbestimmung auf die Assay-Oberfläche appliziert.

Tabelle 8 – Übersicht über die getesteten Probenpuffer. Referenz wurde mit * gekennzeichnet.

Variante	Probenverdünnungspuffer
V1*	1× PBS
V2	1× PBS + 0,5% BSA
V3	1× PBS + 0,5% BSA + 0,05% Tween20

Für die Eruierung des geeigneten Probenverdünnungspuffers wurde der Einfluss des Blocking-Agenz sowie des Detergenz auf das Hintergrundrauschens, die Intra-Assay-Varianz sowie das Signal-Rausch-Verhältnis analysiert.

EXP6: Einfluss der Detektionssonden

Innerhalb des letzten Experiments der Assay-Verifizierung wurde der Einfluss unterschiedlicher Detektionssonden bzw. deren Kombinationen auf die analytische Sensitivität des Assays analysiert. Hierzu wurden Aβ1-15 SiNaPs und synthetische Aβ1-42 Aggregate (Aggregationsprotokoll b) im zuvor definierten Probenpuffer verdünnt und auf die Assay-Oberfläche appliziert. Coating und Blocking wurden dabei analog zu Kapitel 3.2.2.4, EXP5 durchgeführt. Für die Markierung der immobilisierten Proben wurden die in Tabelle 9 gelisteten Kombinationen an Detektionssonden verwendet, wobei die aufgeführten Konzentrationen innerhalb mehrere Vorexperimente mittels Feintitration eruiert wurden (Daten nicht gezeigt). Der Verdünnungspuffer der Detektionssonden wurde auf Grundlage der Ergebnisse aus Kapitel 3.2.2.4, EXP5 zusätzlich mit Additiven versetzt.

Tabelle 9 – Übersicht über getestete Detektionsantikörperkombinationen. Referenz wurde mit * gekennzeichnet.

Variante	Kombination	Kanal 00 Konzentration [µg/mL]	Kanal 01 Konzentration [µg/mL]
V1*	Kanal 00: Nab228 CF633 Kanal 01: 6E10 AF488	0,156	0,625
V2	Kanal 00: IC16 CF633 Kanal 01: 6E10 AF488	0,625	0,625
V3	Kanal 00: IC16 CF633 Kanal 01: Nab228 CF488A	0,625	0,625

Für die Eruierung der geeigneten Capture-Konzentration wurden sowohl die ermittelten Intensitätsschwellenwerte der jeweils applizierten Pufferkontrolle als auch das Signal-Rausch-Verhältnis der Aβ1-15 SiNaPs bzw. der synthetischen Aβ1-42 Aggregate miteinander verglichen.

3.2.2.5 Datenakquise

Die Bilder wurden mittels TIRFM mit einer 100× Vergrößerung (Ölimmersionsobjektiv, Apertur 1,47) akquiriert. Pro Well wurden 25 Bilder im Abstand von 300 µm mit einer Größe von 113,76 × 113,76 µm erfasst, was insgesamt 3% der Gesamtwellfläche entsprach [200]. Durch Verwendung einer 14-bit Kamera konnten insgesamt 16.384 Graustufenwerte abgebildet werden. Sowohl die Eindringtiefe der evaneszenten Welle von 200 nm, einem TIRF-Winkel von 90° und einer Laserintensität beider Fluoreszenzkanäle von 100% wurden bei allen Experimenten eingehalten. Lediglich die Belichtungszeit und die elektronische Verstärkung (im Folgenden als *Gain* bezeichnet) variierten je nach Fragestellung. Die verwendeten Messeinstellungen wurden in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10 – Übersicht über die verwendeten Messparameter. Angegeben sind sowohl Belichtungszeit als auch *Gain* für beide Fluoreszenzkanäle Kanal 00 und Kanal 01.

Experiment	Kanal 00		Kanal 01	
	Belichtungszeit [ms]	*Gain*	Belichtungszeit [ms]	*Gain*
EXP1a	100	100	-	-
EXP1b	100	100	-	-
EXP1c	500	1000	500	800
EXP2	500	1000	500	800
EXP3	2000	2000	2000	2000
EXP4	1300	1300	1300	1300
EXP5	1000	1300	1000	1300
EXP6	1000	1000	1000	1000

3.2.2.6 Analyse der Bilddaten

Für die Analyse der akquirierten Bilddaten wurde die intern entwickelte Analysesoftware sFIDAta verwendet. Eingangs wurden artifizielle Bilder wie Bilder mit Ölringen, bakteriellen Kontaminationen, großen und hellen Clustern sowie unscharfe oder inhomogene Bilder mittels automatischer Detektion erkannt und für die spätere Analyse ausgeschlossen. Abschließend wurde der Datensatz verblindet und restliche artifizielle Bilder, die nicht von der automatisierten Artefaktdetektion erfasst wurden, manuell aussortiert. Im Anschluss wurde die Intensität des Hintergrundrauschens der mitgeführten Pufferkontrolle bestimmt und basierend darauf ein Cut-off für die Auswertung eruiert. Sofern nicht explizit genannt, wurde stets ein Cut-off von 0,1% angewandt. Für die Berechnung des sFIDA Readouts wurden alle Pixel pro Bild gezählt, die in beiden Fluoreszenzkanälen an der gleichen Position eine Intensität über dem zuvor definierten Cut-off aufwiesen. In dieser Arbeit wurden für die Analysen stets die Mittelwerte der vier Replikate mit der dazugehörigen Standardabweichung verwendet.

3.2.3 Ergebnisse

Unter Berücksichtigung des etablierten Verifizierungsplans aus Kapitel 3.1 wurde Festphase für einen sFIDA zum Nachweis von Aβ-Aggregaten entwickelt. Im Folgenden sind sowohl die Kenngrößen der Assay-Komponenten aufgeführt als auch die Ergebnisse der einzelnen Verifizierungsexperimente dargestellt.

3.2.3.1 Herstellung der Assay-Komponenten

Synthese, Funktionalisierung und Konjugation von Aβ1-15 SiNaPs

Als Kalibrationsstandard und als Basis für die sFIDA Assay-Verifizierung wurden SiNaPs synthetisiert, aminiert und anschließend mit Aβ1-15 Peptid konjugiert. Mittels Stöber-Verfahren wurden Siliziumoxid-Grundkörper synthetisiert, die eine durchschnittliche Partikelgröße von 21,4 nm ± 5 nm aufwiesen. Für einen einzelnen Siliziumoxid-Grundkörper wurde zudem ein theoretisches Volumen von 4849 nm^3, eine Oberfläche von 1385 nm^2 sowie eine Masse von $8{,}97\times10^{-18}$ g unter Annahme einer Dichte von 1,85 g/cm^3 kalkuliert. Anschließend wurden die Siliziumoxid-Grundkörper durch Reaktion mit APTES aminiert und über präaktivierte Maleimidohexansäure mit Aβ1-15 Peptid konjugiert. Für die biokonjugierten SiNaPs wurde eine Konzentration von 10,26 nM ermittelt.

Synthetische Aβ1-42 Aggregate

Da das in Kapitel 3.2.2.2 beschriebene Aggregationsprotokoll a hohe Verluste durch unspezifische Bindungen an die Plastikoberfläche der verwendeten Mikrotiterplatten sowie des zusätzlichen Reaktionsgefäß aufwies, wurde im Laufe der vorliegenden Arbeit das Aggregationsprotokoll für synthetische Aβ1-42 weiterentwickelt. Hierzu wurden verschiedene in der Literatur beschriebenen Aggregationsprotokolle berücksichtigt [201-205] und ein Protokoll (Aggregationsprotokoll b) etabliert, welches sowohl Transferverluste reduzierte als auch homogene und monodisperse Aβ-Oligomere erzeugte. Eine detaillierte Beschreibung dieser Aβ-Oligomere wurde zusätzlich in Kapitel 4.1 verzeichnet.

Konjugation der Detektionssonden mit CF-Farbstoff

Die in diesem Teil der vorliegenden Arbeit verwendeten Detektionssonden wurden mit CF-Farbstoffen der Firma Biotium analog den Herstellerangaben konjugiert und mittels Größenausschluss unter Verwendung einer Polyacrylamid-Bead-Suspension aufgereinigt (siehe in Kapitel 3.2.2.3). Anschließend wurden sowohl die Konzentration als auch der Markierungsgrad der jeweiligen Detektionssonde durch photometrische Analysen determiniert und die Ergebnisse in Tabelle 11 zusammengefasst. Zusätzlich wurden hier die Kenngrößen des kommerziell erworbenen 6E10 AF488 von Biolegend verzeichnet.

Tabelle 11 – Übersicht des hergestellten Sondenproteins, der hergestellten Detektionssonden sowie des kommerziell erworbenen 6E10 AF488 Antikörpers.

Detektionssonde	Konzentration [g/L]	DOL	Vorgaben DOL
Protein G CF633	0,57	4,91	Optimal: DOL 4-7 [206] Akzeptabel: DOL 3-8
Nab228 CF633	1,17	3,17	Optimal: DOL 4-7 [206] Akzeptabel: DOL 3-8
IC16 CF633	0,21	3,59	Optimal: DOL 4-7 [206] Akzeptabel: DOL 3-8
Nab228 CF488A	0,78	6,27	Optimal: DOL 7-9 [206] Akzeptabel: DOL 6-10
6E10 AF488	1	6,98	Optimal: DOL 4-9 [207] Akzeptabel: DOL 3-10

3.2.3.2 Festphasenentwicklung

Das Ziel der Festphasenentwicklung ist es, eine Assay-Oberfläche zu entwickeln, die aufgrund einer maximalen Signalsteigerung und einem minimalen Hintergrundrauschen die Diskriminierung zwischen positiven und negativen Proben gewährleistet. Zur Verifizierung des sFIDA-Assays für den quantitativen Nachweis von Aβ-Aggregaten wurden in sechs Experimenten anhand von Aβ1-15 SiNaPs und synthetischen Aβ1-42 Aggregaten die Immobilisierungstechnik definiert, Antikörperkonzentrationen titriert, die Komposition des Coating-Puffers, der Blockadelösung und des Probenpuffers optimiert sowie eine geeignete Kombination an Detektionssonden eruiert. Die jeweiligen Ergebnisse der einzelnen Experimente wurden im Folgenden anhand von Diagrammen, Tabellen sowie Abbildungen dargestellt, wobei die Variante mit der höchsten Assay-Leistung anhand der in Kapitel 3.1.2 definierten Kennzahlen eruiert und diese für das nachfolgende Experiment als neue Referenz gesetzt wurde. Weitere, für den Kontext relevanten Ergebnisse wurden zusätzlich in Anhang 5 bis Anhang 12 verzeichnet.

Zu Beginn der Verifizierung wurde die Glasoberfläche der Mikrotiterplatten mit 5 µg/mL Nab228 Antikörper, welcher vorab in 0,1 M $NaHCO_3$ mit pH 8,4 verdünnt wurde, beschichtet, wobei noch freie Oberfläche anschließend mit 1% BSA in TBS-ProClin blockiert wurde. Anschließend wurden beide Analyten in 1× TBS verdünnt und mit je vier Replikaten auf die Assay-Oberfläche appliziert. Die Konzentration an Aβ1-15 SiNaPs bezog sich stets auf die molare Partikelkonzentration, wohingegen die Konzentration der synthetischen Aβ1-42 Aggregate auf der für die Aggregation eingesetzte Konzentration an Aβ-Monomer basierte. Zur Markierung der immobilisierten Analyten wurde sowohl Nab228 CF633 als auch 6E10 AF488 als Detektionssonden verwendet. Nach Abschluss der Verifizierung wurden die finalen Bedingungen in Tabelle 21 zusammengefasst.

Physisorption als Alternative zum kovalenten Coating (EXP1)

Eingangs wurde die Eignung der Physisorption, bei der die Immobilisierung der Capture-Antikörper an die Oberfläche durch intermolekulare Kräfte erfolgt, als mögliche Immobilisierungstechnik eruiert. Hierzu wurde sowohl die Adsorption des Capture-Antikörpers an die Assay-Oberfläche als auch dessen Stabilität mittels FLOSS-Modellsystemen überprüft. Anschließend erfolgte der direkte Vergleich zwischen der bisherigen kovalenten Immobilisierung und der Physisorption, indem die Reaktivität der Capture-Antikörper gegenüber Aβ1-15 SiNaPs als auch synthetischen Aβ1-42 Aggregaten bewertet wurde.

Nicht-kovalente Adsorption des Capture-Antikörpers ist grundsätzlich möglich (EXP1a)

Ob die Adsorption des Capture-Antikörpers über intermolekulare Wechselwirkungen an die Glasoberfläche grundsätzlich möglich ist, wurde unter Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Nab228 CF633 Antikörpers überprüft. Dieser wurde in Coating-Puffer (0,1 M $NaHCO_3$, pH 8,4) unterschiedlich stark verdünnt und die jeweilige Coating-Lösung für eine Stunde auf der unbehandelten Glasoberfläche inkubiert. Als Kontrolle wurde lediglich der Coating-Puffer ohne Zugabe von Antikörper auf die Glasoberfläche appliziert. Nach der Inkubation wurde ungebundener Antikörper durch fünfmaliges Waschen mit ddH_2O entfernt und die Fluoreszenzsignale mittels TIRFM erfasst. Die verwendeten Messeinstellungen wurden in Kapitel 3.2.2.5 verzeichnet. Für die Analyse der Bilddaten wurden die Fluoreszenzsignale der eingesetzten Antikörperkonzentrationen miteinander verglichen und die Ergebnisse in Tabelle 12 und Abbildung 18 zusammengefasst.

Tabelle 12 – Einfluss der eingesetzten Konzentration an fluoreszenzmarkiertem Nab228 CF633 Antikörper auf die mittleren Pixelintensitäten. Anhand der ermittelten Pixelintensitäten wurde anschließend die Signalsteigerung im Vergleich zur Pufferkontrolle (0 µg/mL Nab228 CF633) berechnet. Pixelintensitäten, die sich signifikant voneinander unterschieden, wurden mit * gekennzeichnet (beidseitiger Mann-Whitney U Test mit einem Konfidenzintervall von 0,05).

Nab228 CF633 [µg/mL]	Mittlere Pixelintensität [Graustufen]	CV%	Signal-Rausch-Verhältnis
0	475,51 *	0,34	1
0,625	1891,99 *	8,64	3,98
1,25	4278,66 *	3,49	8,99
2,5	9122,87 *	12,63	19,18
5,0	13.694,39 *	4,7	28,79
7,5	13.808,97	4,88	29,03

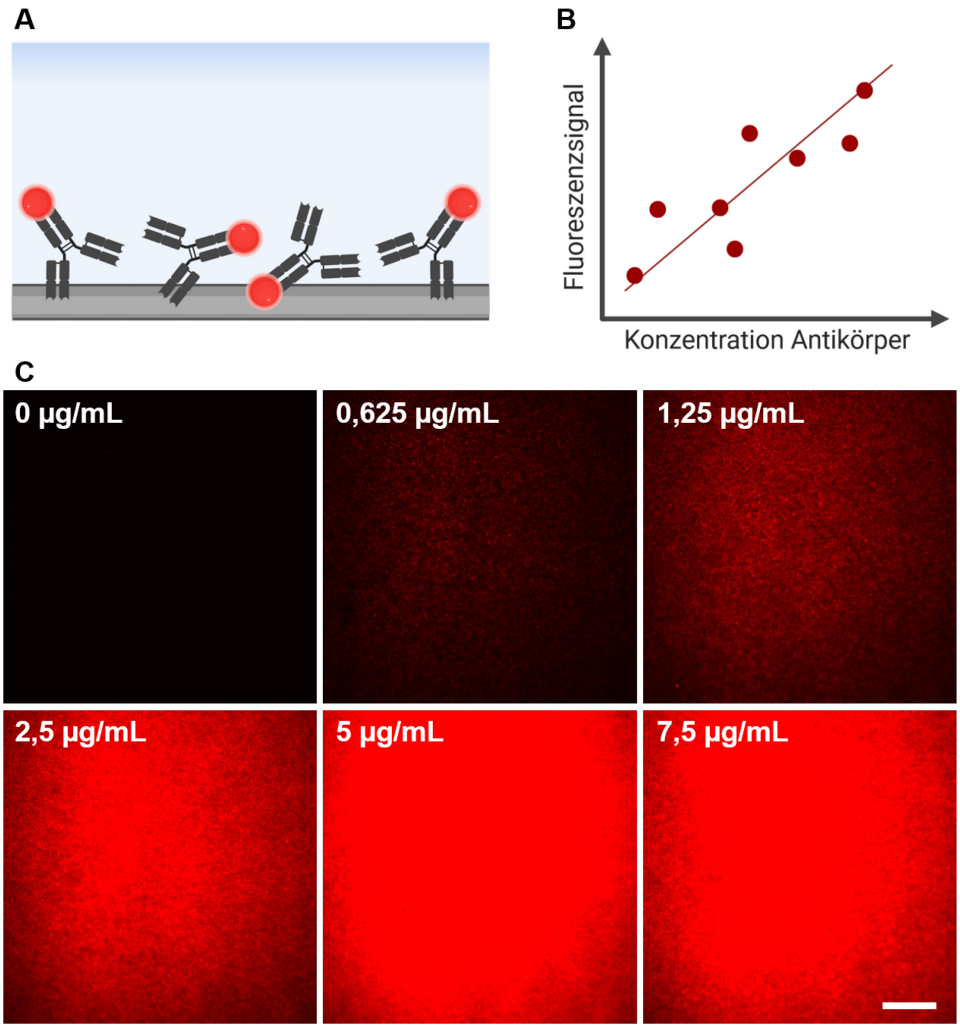


Abbildung 18 – Überprüfung der Adsorption von Antikörpern an die Glasoberfläche mittels FLOSS-Experiment. (A) Um die Adsorption der Antikörper auf die Glasoberfläche quantifizieren zu können, wurde Nab228 CF633 als fluoreszenzmarkierte Oberflächenspezies verwendet. **(B)** Hierbei wurde die Oberfläche entweder ohne (0 µg/mL) oder mit 0,625 µg/mL, 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL bzw. 7,5 µg/mL Nab228 CF633 inkubiert. Theoretisch sollte bei erfolgreicher Adsorption eine konzentrationsabhängige Zunahme an Fluoreszenz zu beobachten sein, wobei sich diese über einen gewissen Messbereich linear verhalten sollte. **(C)** Innerhalb repräsentativer TIRFM-Bilder der Assay-Oberfläche (Kontrast 1) wurde dieser Zusammenhang bestätigt. Für die Akquise der Bilder wurde eine Anregungswellenlänge von 635 nm, eine Emissionswellenlänge von 705 nm, eine Belichtungszeit von 100 ms sowie eine elektronische Verstärkung von 100 angewandt. Maßstabsbalken: 20 µm. Abbildung A und B: eigene Darstellung, erstellt mit BioRender.com.

Wie bereits anhand der repräsentativen TIRFM-Bilder aus Abbildung 18C ersichtlich, wurde eine Zunahme des Fluoreszenzsignal mit steigender Konzentration an Nab228 CF633 als Oberflächenspezies determiniert, was eine erfolgreiche Adsorption an die Oberfläche indizierte. Im Falle der Pufferkontrolle, bei der ausschließlich der verwendete Coating-Puffer auf die Oberfläche appliziert wurde, wurde lediglich Kamerarauschen detektiert. Für eine quantitative Betrachtung der Ergebnisse wurde anschließend das Signal-Rausch-Verhältnis anhand der ermittelten Pixelintensitäten im Vergleich zur Pufferkontrolle kalkuliert (siehe Tabelle 12).

Bis zu einer eingesetzten Konzentration von 5,0 µg/mL Nab228 CF633 wurde stets eine signifikante Steigerung der mittleren Pixelintensität determiniert, wobei bei 5,0 µg/mL Nab228 CF633 eine Signalsteigerung um Faktor 29 im Vergleich zur Pufferkontrolle erzielt wurde. Innerhalb dieses Bereichs wurde zudem ein linearer Zusammenhang (Geradengleichung y = 2724,2x + 309,14, Bestimmtheitsmaß R^2=0,972) zwischen eingesetzter Konzentration an fluoreszenzmarkierter Oberflächenspezies und Zunahme des Fluoreszenzsignals determiniert. Eine weitere Steigerung des Signals konnte durch eine weitere Erhöhung der Nab228 CF633 Konzentration auf 7,5 µg/mL nicht erzielt werden. Ursache für die ausgebliebene Signalzunahme konnte durch limitierende Eigenschaften wie Pixelanzahl und Pixeltiefe der verwendeten Kamera begründet werden. Wie bereits aus den repräsentativen TIRFM-Bildern ersichtlich, befanden sich die meisten Signale bereits ab einer verwendeten Konzentration von 5,0 µg/mL im Bereich der Sättigung. Jedoch konnten aufgrund von Vignettierungseffekten am Bildrand die volle Pixeltiefe von 16.384 Graustufen weder bei einer getesteten Antikörperkonzentrationen von 5 µg/mL noch bei 7,5 µg/mL erreicht werden.

Oberflächenbeschichtung ist ausreichend stabil (EXP1b)

Nachdem in EXP1a gezeigt werden konnte, dass Antikörper über intermolekulare Kräfte an die Glasoberfläche adsorbieren, wurde als nächstes die Stabilität dieser Immobilisierung durch Erweiterung des FLOSS-Modells überprüft. Hierzu wurde Nab228 Antikörper zu den in EXP1a genannten Bedingungen über Nacht bei 4 °C auf der Glasoberfläche inkubiert. Auch in diesem Versuchsaufbau wurde als Pufferkontrolle lediglich Coating-Puffer ohne Zugabe von Antikörper verwendet. Am nächsten Tag wurde die Glasoberfläche mehrmals gewaschen und blockiert, bevor anschließend fluoreszenzmarkiertes Protein G CF633 in einer Konzentration von 0,625 µg/mL in TBS für eine Stunde hinzugegeben wurde. Als weitere Kontrolle wurden vier Replikate der mit 7,5 µg/mL Nab228 Antikörper beschichteten Wells lediglich mit TBS aber ohne Protein G CF633 inkubiert. Nach einem finalen Waschschritt wurden die Fluoreszenzsignale der Oberflächenspezies mittels TIRFM erfasst, wobei die verwendeten Messeinstellungen in Kapitel 3.2.2.5 verzeichnet wurden. Für die Analyse der Bilddaten wurde die mittlere Pixelintensität der jeweiligen Antikörperkonzentrationen miteinander verglichen und die Ergebnisse in Abbildung 19 und Tabelle 13 zusammengefasst.

Ähnlich wie bei EXP1a wurde in den repräsentativen TIRFM-Bildern (Abbildung 19C) eine konzentrationsabhängige Zunahme des Fluoreszenzsignals beobachtet, obwohl die Assay-Oberfläche nach der Immobilisierung mehrmals gewaschen und blockiert wurde. Im Gegensatz zum vorherigen Experiment musste die Belichtungszeit um Faktor 10 erhöht werden, was jedoch aufgrund des verwendete FLOSS-Modells absehbar war. Die Markierung der immobilisierten Antikörper basierte auf bioaffinen Wechselwirkungen zwischen Protein G und den Fc-Bereichen der Antikörper. Durch die vorherige Immobilisierung war zu erwarten,

dass ein Großteil der Fc-Bereiche bereits mit der Glasoberfläche interagieren und somit für eine Markierung durch Protein G CF633 sterisch unzugänglich waren.

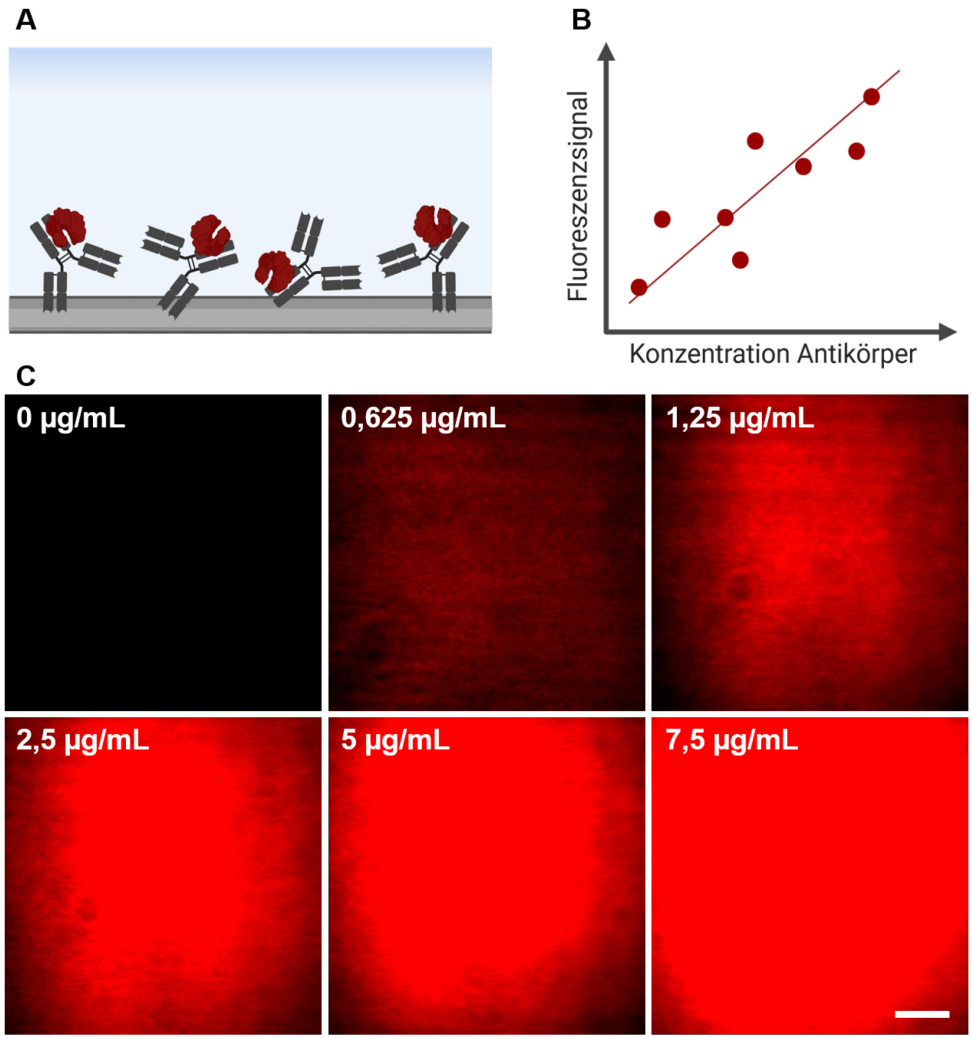


Abbildung 19 – Überprüfung der Immobilisierung und der Stabilität von Antikörpermolekülen auf der Glasoberfläche mittels FLOSS-Experiment. (A) In diesem Experiment wurde Nab228 Antikörper (grau dargestellt) in $NaHCO_3$ Puffer mit pH 8,4 verdünnt (0, 0,625, 1,25, 2,5, 5,0 oder 7,5 µg/mL) und mittels Physisorption auf der Glasoberfläche immobilisiert. Nach einigen Waschzyklen sowie Blockierung der freien Glasoberfläche mit einer BSA-Lösung wurden die immobilisierten Antikörper mit fluoreszenzmarkiertem Protein G (0,625 µg/mL in 1× TBS, rot dargestellt) als Oberflächenspezies markiert. **(B)** Im Falle einer stabilen Immobilisierung sollte weiterhin eine lineare konzentrationsabhängige Zunahme an Fluoreszenzsignal zu beobachten sein, wobei aufgrund der indirekten Markierung der Antikörper eine geringere Signalzunahme zu erwarten war. **(C)** Innerhalb der repräsentativen TIRFM-Bilder (Kontrast 1) wurde dieser Zusammenhang bestätigt. Für die Akquise der Bilder wurde eine Anregungswellenlänge von 635 nm, eine Emissionswellenlänge von 705 nm, eine Belichtungszeit von 100 ms sowie eine elektronische Verstärkung von 100 verwendet. Maßstabsbalken: 20 µm. Abbildung A und B: eigene Darstellung, erstellt mit BioRender.com.

Analog zu EXP1a wurde für die quantitative Betrachtung der Ergebnisse die Signalsteigerung im Vergleich zur Pufferkontrolle anhand der ermittelten Pixelintensitäten kalkuliert und in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13 – Mittlere Pixelintensitäten von Protein G CF633 in Abhängigkeit zur eingesetzten Konzentration an Nab228 Antikörper. Die verschiedenen Oberflächenvarianten wurden nach mehreren Waschzyklen und Blockierung mit fluoreszenzmarkiertem Protein G CF633 inkubiert (0,625 µg/mL in 1× TBS, 20 µL pro Well). Anhand der ermittelten Pixelintensitäten wurde anschließend die Signalsteigerung im Vergleich zur Pufferkontrolle (0 µg/mL Nab228 CF633) berechnet. Pixelintensitäten, die sich signifikant voneinander unterschieden, wurden mit * markiert (beidseitiger Mann-Whitney U Test mit einem Konfidenzintervall von 0,05). Als weitere Kontrolle wurden vier Replikate der zuvor mit 7,5 µg/mL Nab228 CF633 beschichteten Wells mit 1× TBS ohne Protein G CF633 inkubiert.

Nab228 [µg/mL]	Protein G CF633 [µg/mL]	Mittlere Pixelintensität [Graustufen]	CV%	Signal-Rausch-Verhältnis
0	0,625	451,07 *	0,25	1
0,625	0,625	1868,51 *	4,34	4,14
1,25	0,625	2926,16 *	3,90	6,49
2,5	0,625	4326,35 *	6,35	9,59
5,0	0,625	5952,8 *	6,12	13,20
7,5	0,625	8306,11 *	3,36	18,41
7,5	-	472,82	0,27	1,05

Die applizierte Capture-Kontrolle, bei der die Oberfläche lediglich mit Coating-Puffer inkubiert wurde, bestätigte die hohe Spezifität der bioaffinen Wechselwirkung zwischen Protein G CF633 und Antikörpern, da hierbei lediglich Hintergrundrauschen der Kamera detektiert wurde. Auch der Verzicht der fluoreszenzmarkierten Oberflächenspezies für die Markierung resultierte in vernachlässigbar geringen Pixelintensitäten. Im Gegensatz zum vorherigen Experiment wurde bis zur eingesetzten Antikörperkonzentration von 7,5 µg/mL stets eine signifikante Steigerung der mittleren Pixelintensität erfasst, wobei im gesamten Konzentrationsbereich ebenfalls ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter Konzentration an Nab228 Antikörper und Zunahme des Fluoreszenzsignals determiniert wurde (Geradengleichung $y = 968{,}67x + 1247{,}45$, Bestimmtheitsmaß $R^2=0{,}967$). Aufgrund des stetig wachsenden Signal-Rausch-Verhältnisses kann von einer anhaltenden Immobilisierung ausgegangen werden, wobei bei einer eingesetzten Konzentration von 7,5 µg/mL mit Faktor 18 der höchste Signalzuwachs im Vergleich zur applizierten Capture-Kontrolle verzeichnet wurde.

Physisorption ermöglicht hohe Reaktivität der Capture-Antikörper (EXP1c)

Wie die Experimente EXP1a und EXP1b bestätigten, ist die Immobilisierung der Capture-Antikörper über intermolekulare Kräfte grundsätzlich möglich und gegenüber mehreren Assay-Prozeduren ausreichend stabil. Dennoch kann es aufgrund der unspezifischen Immobilisierung bei der Physisorption zu einer randomisierten Orientierung der Capture-

Antikörper auf der Glasoberfläche kommen, sodass Paratope für die Bindung des Zielantigens teilweise oder vollständige sterisch blockiert werden (siehe Kapitel 3.1.1.1).
Um die Reaktivität der möglicherweise unzugänglichen Antikörper zu überprüfen, wurden verschiedene Verdünnungen an Aβ1-15 SiNaPs als auch synthetischen Aβ1-42 Aggregaten auf eine vorbereitete Assays-Oberfläche appliziert und anschließend mittels Nab228 CF633 und 6E10 AF488 markiert. Für den direkten Vergleich der Physisorption mit der kovalenten Spacer-vermittelten Immobilisierungstechnik wurde eine weitere Mikrotiterplatte simultan behandelt (siehe Kapitel 3.2.2.4, EXP1c). Anschließend wurden beide Mikrotiterplatten mittels TIRFM vermessen, wobei die verwendeten Messeinstellungen in Kapitel 3.2.2.5 verzeichnet wurden. Anhand des hintergrundbasierten Cut-off der jeweils applizierten Pufferkontrolle wurden die sFIDA Readouts ermittelt und daraus jeweils die Signalsteigerung sowie die Signalreduzierung in Abwesenheit des Capture-Antikörpers kalkuliert (siehe Anhang 5 und Anhang 6). Wie aus Tabelle 14 ersichtlich, resultierte die Art der Immobilisierung leidglich in geringfügigen Unterschieden zwischen den Graustufenwerten der ermittelten Intensitätsschwellenwerte. Dennoch wurden bei beiden Immobilisierungstechniken stets geringere Graustufenwerte bei Abwesenheit des Capture-Antikörpers determiniert; sowohl für Kanal 00 als auch Kanal 01, was auf schwache Interferenzen zwischen den Assay-Antikörpern hindeuten könnte.

Tabelle 14 – Einfluss der Immobilisierungstechnik sowie der Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) des Capture-Antikörpers auf das Hintergrundrauschen. Dargestellt sind die determinierten Graustufenwerte bei einem Cut-off von 0,1% bezogen auf die jeweils applizierte Pufferkontrolle. Kanal 00: Anregungswellenlänge 635 nm, Emissionswellenlänge 705 nm; Kanal 01: Anregungswellenlänge 488 nm, Emissionswellenlänge 525 nm.

Variante	Immobilisierung	Capture	Kanal 00	Kanal 01
V1	Kovalentes Coating (PEG)	**+**	1024	858
V2		**-**	1010	778
V3	Physisorption	**+**	1009	794
V4		**-**	999	682

Des Weiteren wurden für beide Immobilisierungstechniken in Anwesenheit der Capture-Antikörper (V1 und V3) vergleichbare sFIDA Readouts für die einzelnen Konzentrationen an Aβ1-15 SiNaPs als auch an synthetischen Aβ1-42 Aggregaten verzeichnet (siehe Abbildung 20), wodurch ebenfalls vergleichbare Werte zur Signalsteigerung im Vergleich zur jeweiligen Pufferkontrolle determiniert wurden. Aufgrund der hohen Vergleichbarkeit beider Immobilisierungstechniken konnte bei die Physisorption trotz randomisierter Antikörper-Immobilisierung von einer ausreichenden Reaktivität der Capture-Antikörper gegenüber den getesteten Analyten ausgegangen werden.

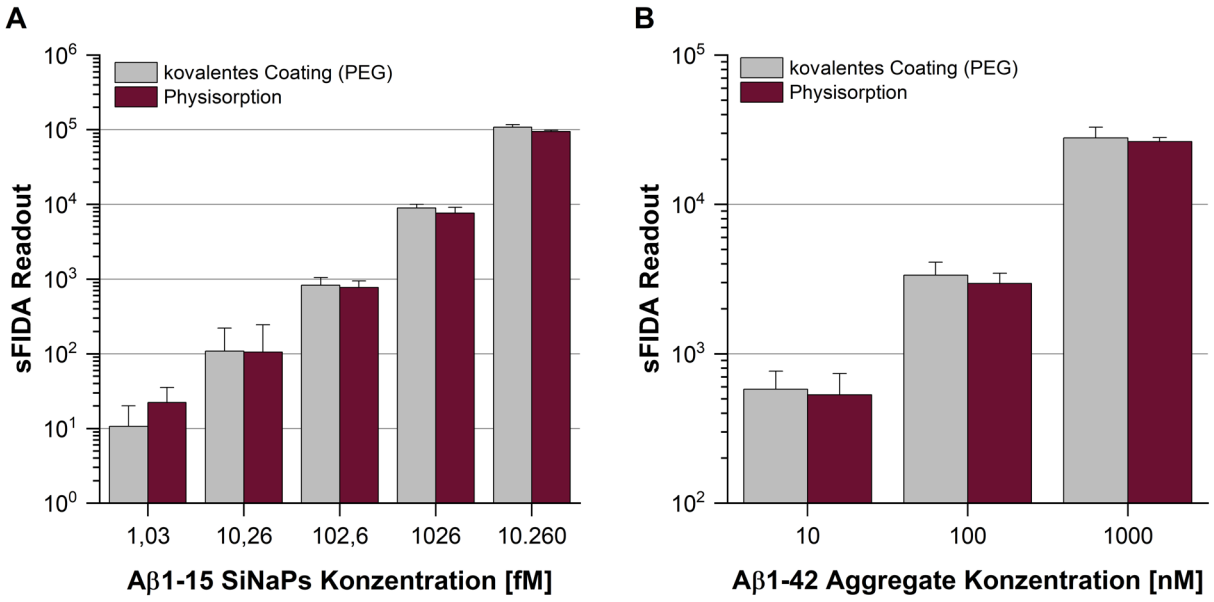


Abbildung 20 – Einfluss der Immobilisierungstechnik auf die sFIDA Readouts von (A) Aβ1-15 SiNaPs und (B) synthetischen Aβ1-42 Aggregaten. Dargestellt wurden die sFIDA Readouts der applizierten Analyt-Konzentrationen auf den jeweiligen Festphasenvarianten (basierend auf 0,1% Cut-off). Für das Coating wurde Nab228 mit je 5 µg/mL als Capture-Antikörper entweder kovalent über PEG (Referenzvariante, grau) oder nicht kovalent über Physisorption (rot) auf die Glasoberfläche immobilisiert.

Um festzustellen, ob es sich bei den determinierten sFIDA Readouts um spezifisches Signal handelte, wurde für beide Immobilisierungstechniken jeweils eine Variante mitgeführt, bei der die Oberfläche lediglich mit Coating-Puffer in Abwesenheit von Capture-Antikörpern inkubiert wurde (V2 bzw. V4). Anschließend wurden die Ergebnisse mit den Varianten mit Capture-Antikörper (V1 bzw. V3) verglichen und die analytische Spezifität des Assays anhand der prozentualen Signalreduzierung quantifiziert. Im Falle der kovalenten Immobilisierung über PEG wurde eine Signalreduzierung von 87,7% für Aβ1-15 SiNaPs und eine Signalreduzierung von 89,9% für synthetische Aβ1-42 Aggregate bei Abwesenheit des Capture-Antikörpers verzeichnet. Im Vergleich dazu resultierte die Immobilisierung mittels Physisorption in einer um 6% geringeren Signalreduzierung für Aβ1-15 SiNaPs (81,8%) und in einer um 7% höheren Signalreduzierung für synthetische Aβ1-42 Aggregate (97,3%). Folglich wurde für beide Varianten vergleichbare analytische Sensitivitäten und Spezifitäten determiniert.

Im Vergleich zur kovalenten Immobilisierungstechnik, die in mehreren Vorarbeiten hinsichtlich analytischer Sensitivität und Spezifität bereits optimiert wurde (Daten nicht gezeigt), standen zu diesem Zeitpunkt weitere Optimierungen der Physisorption noch aus. Daher wurde das vorläufige Assay-Protokoll hinsichtlich verschiedener Assay-Parameter wie Coating-Puffer, Konzentration an Capture-Antikörpern, Blockadelösung und Probenpuffer sowie eine geeignete Kombination an Detektionsantikörpern analog des in Kapitel 3.1 etablierten Verifizierungsplans optimiert, um auch hier die analytische Sensitivität sowie Spezifität weiter zu erhöhen.

Natriumhydrogencarbonat als Coating-Puffer (EXP2)

Für die Eruierung eines geeigneten Coating-Puffers wurde der Capture-Antikörper Nab228 zusätzlich zur Referenz ($NaHCO_3$, pH 8,4) in den Puffersystemen MES und PBS eingesetzt und die Signalsteigerungen der Aβ1-15 SiNaPs als auch der synthetischen Aβ1-42 Aggregate auf den jeweiligen Varianten miteinander verglichen. Für die Ermittlung der sFIDA Readouts wurde der hintergrundbasierte Cut-off für jede Variante anhand der applizierten Pufferkontrolle angewandt (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15 – Einfluss des Coating-Puffers auf das Hintergrundrauschen der jeweiligen Assay-Variante in Anbetracht des Cut-offs (0,1% basierend auf der applizierten Pufferkontrolle). Kanal 00: Anregungswellenlänge 635 nm, Emissionswellenlänge 705 nm; Kanal 01: Anregungswellenlänge 488 nm, Emissionswellenlänge 525 nm. Werte außerhalb der Toleranz von ± 20% wurden rot markiert. Referenz wurde mit * gekennzeichnet.

Variante	Coating-Puffer	Kanal 00	Kanal 01
V1	0,1 M MES, pH 3,5	786	**776**
V2	1× PBS, pH 7,5	792	633
V3*	0,1 M $NaHCO_3$, pH 8,4	785	627

Dabei wurde eine Unempfindlichkeit des Hintergrundrauschens in Kanal 00 gegenüber der pH-Änderung determiniert. Im Gegensatz dazu resultierte die Verwendung eines sauren Coating-Puffers in einer Erhöhung des Hintergrundrauschens in Kanal 01 um durchschnittlich 24% im Vergleich zur Referenz.

Anhand der sFIDA Readouts von Aβ1-15 SiNaPs als auch synthetischen Aβ1-42 Aggregaten wurde anschließend das Signal-Rausch-Verhältnis für jede Variante berechnet (siehe Anhang 7) und die Ergebnisse in Abbildung 21 graphisch dargestellt. Hierbei wurde eine vom Puffersystem und pH-Wert beeinflussbare Erhöhung intermolekularer Kräfte zwischen Capture-Antikörper und Glasoberfläche durch die höchste Signalsteigerung indiziert, welche wiederum mit einer effizienteren Immobilisierung des Analyten an die Assay-Oberfläche korreliert. Sowohl für Aβ1-15 SiNaPs als auch für synthetische Aβ1-42 Aggregate wurde eine starke Korrelation zwischen der Anzahl an kolokalisierten Pixel und der eingesetzten Analyt-Konzentration auf allen drei Festphasenvarianten beobachtet. Die dazugehörigen Korrelationskoeffizienten nach Pearson wurden in Anhang 7 verzeichnet. Aufgrund dieser Korrelation wurde eine Differenzierung zwischen den einzelnen Konzentrationen als auch zur Pufferkontrolle ermöglicht, was sich ebenfalls in den Signal-Rausch-Verhältnissen der jeweiligen Variante widerspiegelte.

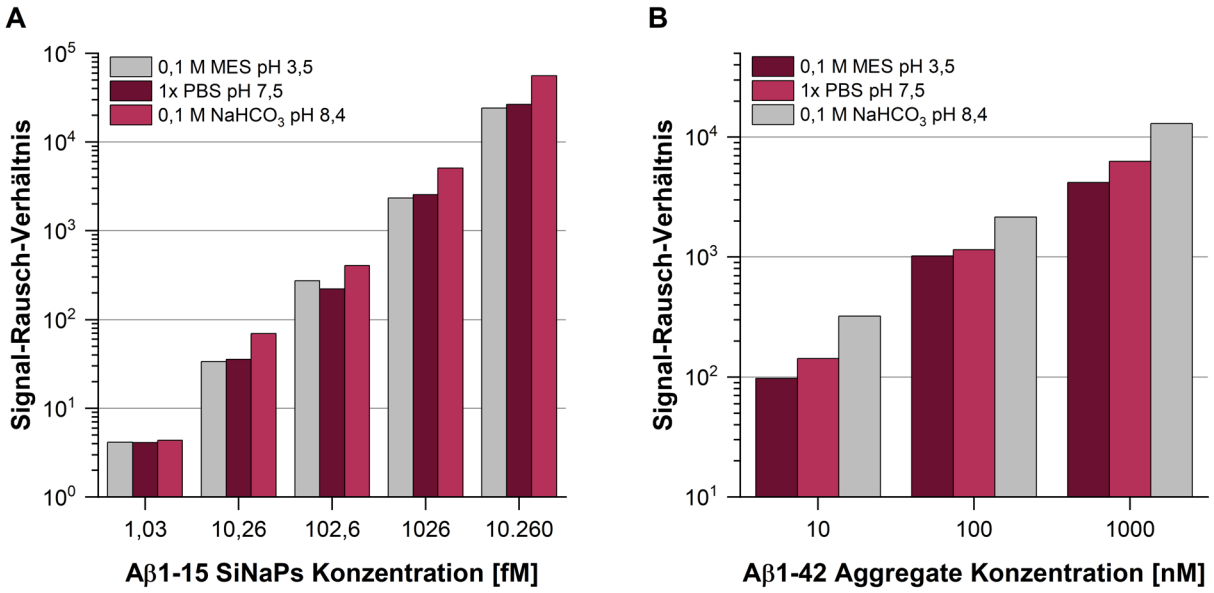


Abbildung 21 – Einfluss verschiedener Puffersysteme auf das Signal-Rausch-Verhältnis der (A) Aβ1-15 SiNaPs und der (B) synthetischen Aβ1-42 Aggregate. Dargestellt wurden die Quotienten der sFIDA Readouts der applizierten Analyt-Konzentrationen zu den applizierten Pufferkontrollen auf den jeweiligen Festphasenvarianten (basierend auf 0,1% Cut-off). Für das Coating wurde Nab228 mit je 5 µg/mL als Capture-Antikörper in den folgenden Puffersysteme eingesetzt: 0,1 M MES, pH 3,5 (dunkelrot), 1× PBS, pH 7,5 (rot) und 0,1 M $NaHCO_3$, pH 8,4 (Referenzvariante, grau).

Im direkten Vergleich zur Referenz resultierte sowohl der saure als auch der neutrale Coating-Puffer in einer Reduzierung der Messsignale, wobei die Festphase, welche mit 0,1 M MES pH 3,5 beschichtet wurde, von allen getesteten Varianten die geringste Signalsteigerung aufwies (siehe Anhang 8). Hierbei wurden für Aβ1-15 SiNaPs durchschnittlich 40% weniger Kolokalisationen innerhalb der applizierten Konzentrationen im Vergleich zur Referenz detektiert. In Anbetracht der synthetischen Aβ1-42 Aggregate wurde zudem eine Reduzierung um durchschnittlich 63% der messbaren Kolokalisationen ermittelt. Auch die Festphasen-variante mit dem neutralen Coating-Puffer (1× PBS, pH 7,5) zeigte im Vergleich zur Referenz einen Signalverlust der Aβ1-15 SiNaPs von durchschnittlich 41%. Auch bei dieser Variante wurde ein Signalverlust der synthetischen Aβ1-42 Aggregate von durchschnittlich 51% im Vergleich zur Referenz verzeichnet.

Neben der Signalsteigerung und dem Cut-off wurde zusätzlich die analytische Spezifität anhand der Capture-Kontrolle ermittelt, indem die prozentuale Reduzierung an spezifischem Signal der Aβ1-15 SiNaPs (10,26 pM) in Abwesenheit des Capture-Antikörpers berechnet wurde. Eine hohe Signalreduzierung indizierte dabei eine hohe Spezifität des Assays gegenüber Aβ-Spezies, was sowohl für die Referenzvariante (Signalreduzierung um 97,6%) als auch für die anderen Coating-Puffer (MES: Signalreduzierung um 98,2%, PBS: Signalreduzierung um 97,8%) determiniert werden konnte.

Sowohl die analytische Spezifität als auch das Hintergrundrauschen aller drei Coating-Varianten lieferten vergleichbare Ergebnisse, jedoch resultierte die Verwendung von MES und PBS in einer Signalreduzierung und somit in einer geringeren analytischen Sensitivität

gegenüber Aβ1-15 SiNaPs und synthetischen Aβ1-42 Aggregaten. Daher diente der Coating-Puffer 0,1 M $NaHCO_3$ mit pH 8,4 für die nachfolgenden Experimente weiterhin als Referenz.

Steigerung der analytischen Sensitivität durch eine reduzierte Capture-Konzentration (EXP3)

Im Anschluss an die Eruierung des Coating-Puffers wurde die Konzentration des Capture-Antikörpers mittels Titration determiniert. Hierzu wurde die Konzentration an Nab228 Antikörper von 0 (Capture-Kontrolle) bis 7,5 µg/mL stufenweise erhöht. Als Referenz diente die Coating-Variante mit 5 µg/mL Nab228 Antikörper. Um den Zusammenhang zwischen Messsignal und eingesetzter Capture-Konzentration zu analysieren, wurden die sFIDA Readouts der applizierten Aβ1-15 SiNaPs und synthetischen Aβ1-42 Aggregate der jeweiligen Coating-Varianten anhand der Cut-offs der jeweiligen Pufferkontrollen (bezogen auf 0,1%, siehe Anhang 9) ermittelt und in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16 – Einfluss der Capture-Konzentration auf die Signalstärken der Aβ1-15 SiNaPs (A) und der synthetischen Aβ1-42 Aggregate (B). Dargestellt wurden die sFIDA Readouts der applizierten Analyt-Konzentrationen auf den jeweiligen Festphasenvarianten (basierend auf 0,1% Cut-off). Für das Coating wurde Nab228 als Capture-Antikörper in 0,1 M $NaHCO_3$ pH 8,4 zu folgenden Konzentrationen verdünnt: 0,625 / 1,25 / 2,5 / 5,0 / 7,5 µg/mL. Um unspezifische Bindungen der Analyten an die Assay-Oberfläche zu überprüfen, wurde zusätzlich die Abwesenheit des Capture-Antikörpers analysiert (0 µg/mL, Capture-Kontrolle). Die höchsten sFIDA Readouts der jeweiligen applizierten Analyt-Konzentration wurden grün markiert; die Pufferkontrolle wurde hierbei nicht beachtet.

A

	Capture-Konzentration [µg/mL]					
Aβ1-15 SiNaPs [fM]	**0**	**0,625**	**1,25**	**2,5**	**5,0**	**7,5**
0	13,5	8,9	16,1	22,8	25,9	54,8
0,1	28,0	3,2	18,5	24,1	**32,9**	16,3
1,03	20,6	13,5	17,73	45,9	**52,3**	31,1
10,26	13,2	127,3	164,2	**194,2**	160,8	177,7
102,6	29,5	827,4	1458,4	**2154,4**	1582,6	934,0
1026	311,2	6006,9	15.905,9	**19.114,6**	16.965,0	9432,3

B

	Capture-Konzentration [µg/mL]					
Aβ1-42 Aggregate [nM]	**0**	**0,625**	**1,25**	**2,5**	**5,0**	**7,5**
0,01	13,5	9,4	19,5	**37,0**	30,2	23,1
0,1	15	12,1	58,2	**83,1**	58,9	37,9
1	19,6	107,6	205,6	269,4	**290,9**	277,3
10	24,6	499,5	1201,9	1482,9	**1555,3**	1211,5

In Anwesenheit von Capture-Antikörpern konnte stets eine Zunahme an Kolokalisationen mit steigender Analyt-Konzentration beobachtet werden. Jedoch wurden deutliche Unterschiede in den Signalstärken der einzelnen Analyt-Konzentrationen je nach eingesetzter Capture-Konzentration determiniert. Dabei wurde zudem eine wie Kapitel 3.1.1.3 beschriebene Signalentwicklung über die verschiedenen Capture-Konzentrationen beobachtet, bei der sowohl zu niedrige (0,625 µg/mL) als auch zu hohe (7,5 µg/mL) Konzentrationen an Capture-Antikörpern in einer Abnahme des Kolokalisationen resultierten. Um dies zu veranschaulichen, wurden die Signalstärken von 10,26 pM Aβ1-15 SiNaPs und 10 nM Aβ1-42 Aggregate in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration an Nab228 Antikörper graphisch dargestellt (siehe Abbildung 22), wobei der höchste sFIDA Readout dunkelrot markiert wurde.

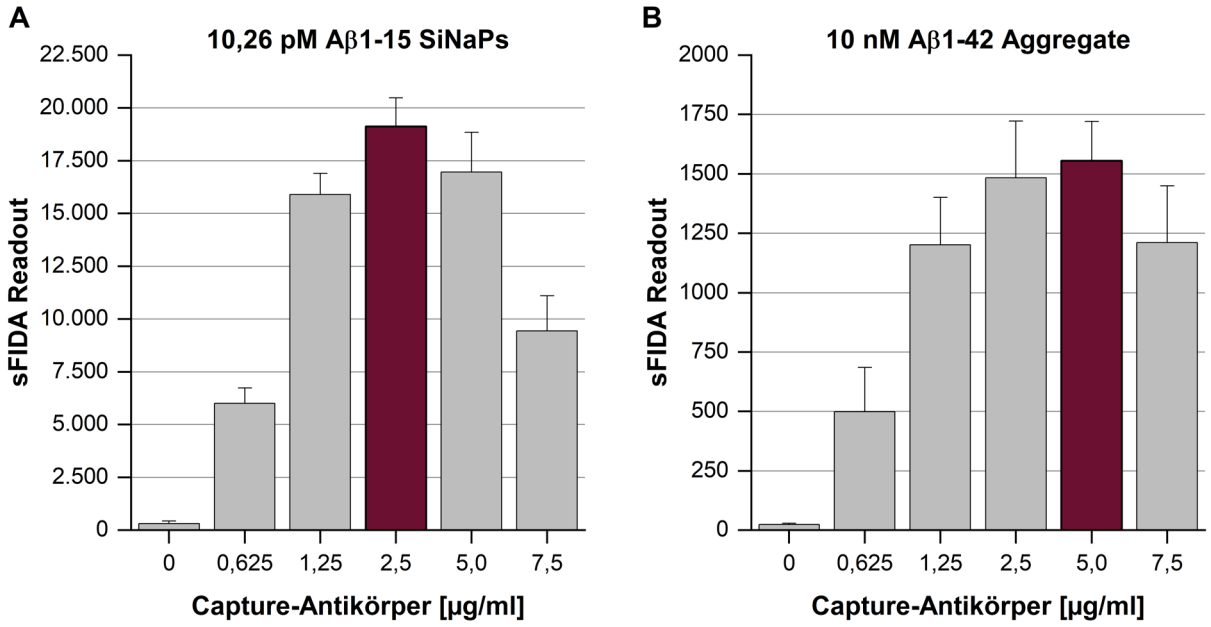


Abbildung 22 – Zusammenhang zwischen sFIDA Readouts von (A) 10,26 pM Aβ1-15 SiNaPs und (B) 10 nM synthetischen Aβ1-42 Aggregaten in Abhängigkeit von der eingesetzten Capture-Konzentration.

Wie zuvor beschrieben, resultierte der Einsatz von lediglich 0,625 µg/mL Nab228 Antikörper als Capture sowohl bei den 10,26 pM Aβ1-15 SiNaPs als auch bei 10 nM synthetischen Aβ1-42 Aggregaten in einem hohen Signalverlust von durchschnittlich 65% bzw. 68% im Vergleich zur Referenz. Bei der Verwendung einer Capture-Konzentration von 7,5 µg/mL wurde wie auch bei der Coating-Variante mit 0,625 µg/mL ein Signalverlust im Vergleich zur Referenzvariante determiniert, wobei dieser mit 44% für 10,26 pM Aβ1-15 SiNaPs und 22% für 10 nM synthetische Aβ1-42 Aggregate weniger stark ausgeprägt war. Im Vergleich zur Referenzvariante konnten bei einer Beschichtung mit 1,25 µg/mL Nab228 Capture-Antikörper vergleichbare Messsignale für 10,26 pM Aβ1-15 SiNaPs erzielt werden (Abweichung 6%). Jedoch wurde eine derartige Steigerung des Signals nicht für 10 nM synthetische Aβ1-42 Aggregate erzielt, da hier nur 77% des Messsignals im Vergleich zur Referenzvariante

determiniert werden konnte. Lediglich die Coating-Variante mit einer Konzentration an Nab228 Antikörper von 2,5 µg/mL ermöglichte vergleichbare Messsignale, wobei für 10 nM Aβ1-42 Aggregate eine vernachlässigbare Abweichung von 5% determiniert wurde. Im Gegensatz dazu konnte durch die Reduzierung an Capture-Antikörpern das Messsignale der 10,26 pM Aβ1-15 SiNaPs um 12% gesteigert werden.
Daher wurde im nächsten Schritt die Coating-Variante mit 2,5 µg/mL Nab228 Antikörper mit der Referenzvariante bezüglich des Signal-Rausch-Verhältnisses verglichen (siehe Abbildung 23).

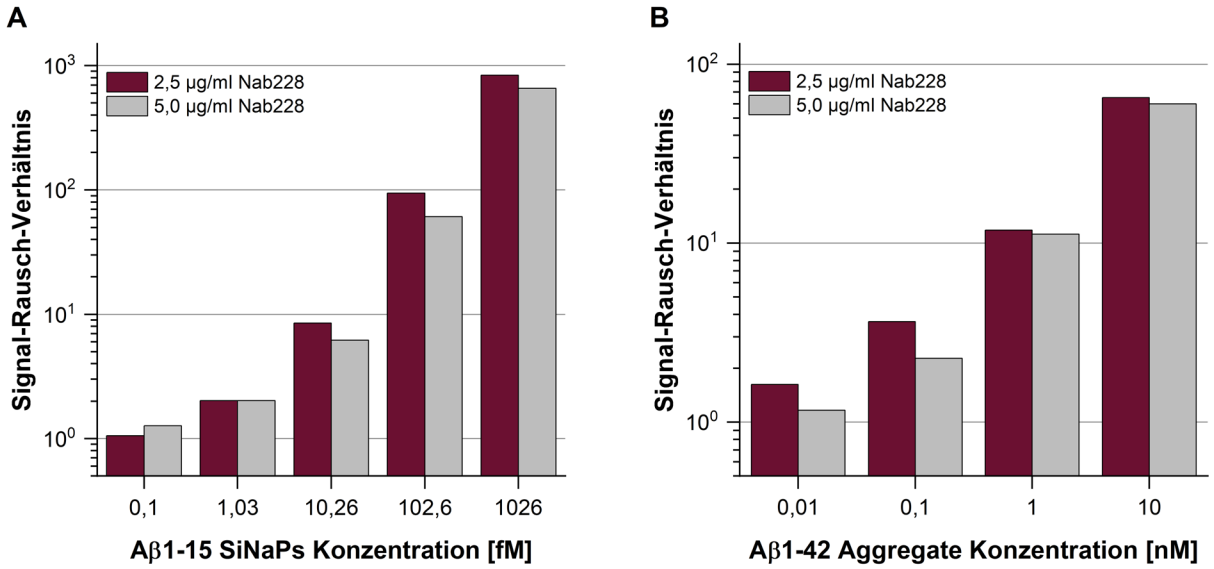


Abbildung 23 – Gegenüberstellung der Coating-Varianten mit 2,5 µg/mL (dunkelrot) und 5,0 µg/mL (grau, Referenz) Nab228 als Capture-Antikörper basierend auf dem Signal-Rausch-Verhältnis von (A) Aβ1-15 SiNaPs und (B) synthetischen Aβ1-42 Aggregaten. Dargestellt wurden die Quotienten der sFIDA Readouts der applizierten Analyt-Konzentrationen zu den applizierten Pufferkontrollen auf den jeweiligen Festphasenvarianten (basierend auf 0,1% Cut-off).

Wie aus Abbildung 23 ersichtlich, konnte durch die Reduzierung der Capture-Konzentration das Signal-Rausch-Verhältnis der Aβ1-15 SiNaPs und der synthetischen Aβ1-42 Aggregate erhöht werden. Durchschnittlich wurde eine Steigerung um 21% für Aβ1-15 SiNaPs und 28% für synthetische Aβ1-42 Aggregate erzielt, wobei bei Letzteren vor allem die gesteigerte Differenzierbarkeit der 0,01 nM um 40% als auch die der 0,1 nM um 60% hervorzuheben war. Daher wurde die Konzentration des Capture-Antikörpers für alle weiteren Experimente von 5,0 µg/mL auf 2,5 µg/mL reduziert.

Steigerung der analytischen Sensitivität durch eine reduzierte BSA-Konzentration in der Blockadelösung (EXP4)

Nach Titration der Capture-Konzentration wurde der Einfluss verschiedener Blockade-lösungen auf die analytische Sensitivität und Spezifizität überprüft. Hierzu wurde die noch freie Oberfläche nach der Immobilisierung der Capture-Antikörper mit unterschiedlich stark

konzentrierten BSA-Lösungen gesättigt und die Messwerte der Aβ1-15 SiNaPs und der synthetischen Aβ1-42 Aggregate mittels TIRFM erfasst. In diesem Experiment wurden für die Ermittlung der sFIDA Readouts sowohl für Kanal 00 als auch für Kanal 01 ein einheitlicher Cut-off von je 1638 Graustufen angewandt. Anschließend wurde der Einfluss der BSA-Konzentration auf die analytische Spezifität anhand der mitgeführten Capture- und Pufferkontrolle bewertet. Des Weiteren wurden anhand der Signalsteigerungen der Aβ1-15 SiNaPs als auch der synthetischen Aβ1-42 Aggregate auf den jeweiligen Varianten Rückschlüsse auf die analytische Sensitivität gezogen.

Um eine mögliche Missinterpretation der weiteren Ergebnisse auszuschließen, wurde als erstes anhand der mitgeführten Capture-Kontrolle überprüft, ob es sich bei den Messsignalen um spezifisches Signal handelte. Sowohl für die Aβ1-15 SiNaPs als auch für die synthetischen Aβ1-42 Aggregate wurde mit einer durchschnittlichen prozentualen Signalreduzierung der Capture-Kontrolle von 99,8% bzw. 98,6% eine hohe Spezifität des Assays bestätigt. Die einzelnen Werte zur Signalreduzierung der jeweiligen Coating-Varianten wurden in Anhang 10 verzeichnet.

Für eine detaillierte Betrachtung der spezifischen bzw. unspezifischen Signale im Zusammenhang mit der verwendeten BSA-Konzentration der Blockadelösung wurden anschließend die ermittelten Pixel Counts und sFIDA Readouts der jeweiligen Pufferkontrolle miteinander verglichen (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17 – Einfluss der BSA-Konzentration auf die Signalstärken der applizierten Pufferkontrolle in beiden Einzelkanäle sowie der Kolokalisation unter Verwendung eines einheitlichen Cut-offs bei einem Intensitätswert von 1638 Graustufen. Die Variante mit den niedrigsten Signalstärken wurde grün markiert. Sowohl für die Einzelkanäle als auch für die Kolokalisation wurde eine Zunahme an Hintergrundrauschen durch den Einsatz einer höheren BSA-Konzentration beobachtet, wobei lediglich die Korrelation in Kanal 00 signifikant war (gekennzeichnet durch *). Die Coating-Variante mit 1% BSA als Blocking-Agenz stellte die Referenzvariante dar. Die Coating-Variante, bei der kein Blocking-Agenz verwendet wurde, wurde grau hinterlegt und nicht in die Berechnung der Korrelationsanalyse einbezogen.

BSA-Konzentration [%]	Pixel Count Kanal 00 Nab228 CF633	Pixel Count Kanal 01 6E10 AF488	sFIDA Readout
0	4830,8	2294,2	29,5
0,5	**4508,1**	**1923,4**	**12,3**
1	5217,7	2026,1	23,6
3	6295,3	2004,3	23,0
5	8870,8	2508,3	35,1
Pearson's r (p-Wert)	0,956* (0,044)	0,842 (0,158)	0,940 (0,061)

Durch Erhöhung der BSA-Konzentration wurde sowohl für die Einzelkanäle als auch für die Kolokalisation eine Zunahme an Hintergrundrauschen determiniert, wobei lediglich für Kanal 00 ein signifikanter linearer Zusammenhang vorhanden war. In diesem Falle betrug die

Zunahme an Hintergrundrauschen im Vergleich zur Referenz 21% für die Coating-Variante mit 3% BSA und etwa 70% bei der Coating-Variante mit 5%. Im Gegensatz dazu konnte durch eine Reduzierung der BSA-Konzentration auf 0,5% das unspezifische Signal in Kanal 00 um etwa 14% reduziert werden und somit die analytische Spezifität gesteigert werden. Die Notwendigkeit einer Blockierung konnte durch die Coating-Variante ohne Blocking-Agenz bestätigt werden, da hier das Hintergrundrauschen im Vergleich zur Variante mit 0,5% BSA um etwa 7% anstieg.

Obwohl dieser lineare Zusammenhang zwischen steigender BSA-Konzentration und Erhöhung des Hintergrundrauschens beobachtet werden konnte, muss sich dieser Effekt nicht negativ auf die Assay-Leistung auswirken. Bei gleichzeitiger Steigerung des spezifischen Signals der Aβ1-15 SiNaPs und synthetischen Aβ1-42 Aggregate kann es weiterhin zu einer Steigerung des Signal-Rausch-Verhältnisses kommen. Um dies zu überprüfen, wurde im nächsten Schritt der Analyse das Signal-Rausch-Verhältnis der applizierten Aβ1-15 SiNaPs und der synthetischen Aβ1-42 Aggregate kalkuliert und die Ergebnisse in Abbildung 24 dargestellt.

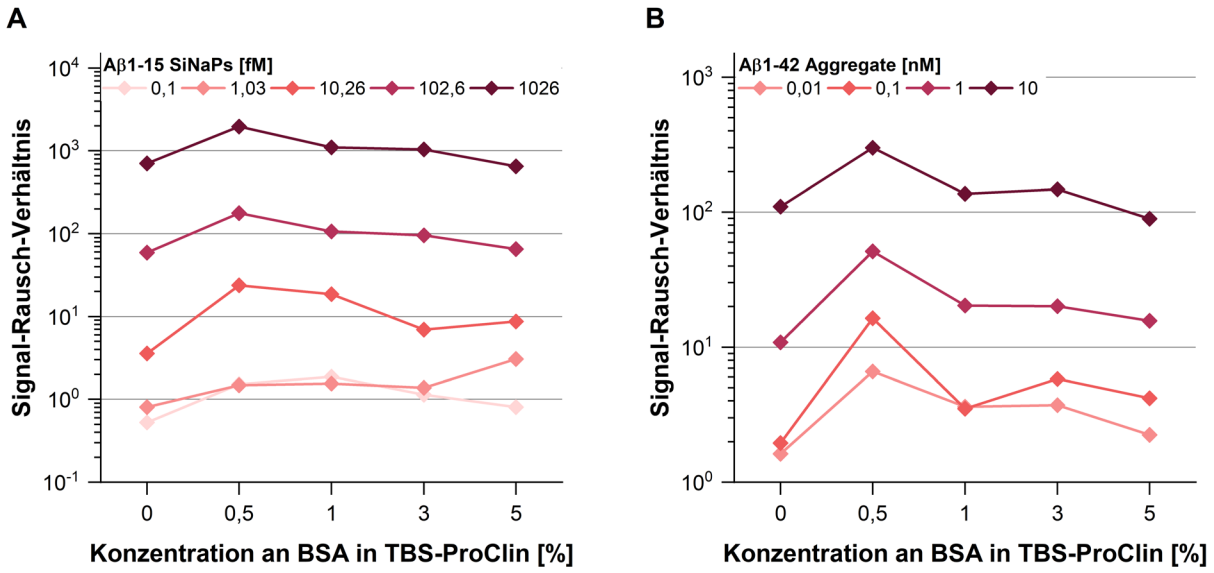


Abbildung 24 – Einfluss der verwendeten BSA-Konzentration auf das Signal-Rausch-Verhältnis von (A) Aβ1-15 SiNaPs und (B) synthetischen Aβ1-42 Aggregaten. Dargestellt wurden die Quotienten der sFIDA Readouts der applizierten Analyt-Konzentrationen zu den applizierten Pufferkontrollen auf den jeweiligen Festphasenvarianten (basierend auf einem einheitlichen Cut-off von 1638 Graustufen). Für die Blockadelösungen wurde BSA als Blocking-Agenz mit je 0,5, 1, 3 und 5% in TBS-ProClin verdünnt.

Wie aus Abbildung 24 ersichtlich, konnte das Signal-Rausch-Verhältnis durch eine Erhöhung der BSA-Konzentration auf 3% oder 5% nicht gesteigert werden. Vor allem die Coating-Variante ohne Blocking-Agenz zeigte eine Reduzierung der analytischen Sensitivität, da im Vergleich zur Referenzvariante durchschnittlich nur 50% der Signale an Aβ1-15 SiNaPs und 60% an synthetischen Aβ1-42 Aggregaten detektiert wurden. Zwar resultierte die Verwendung

von 5% BSA ebenfalls in einer Reduzierung der analytischen Sensitivität, jedoch lag diese mit einer Abweichung von 3% für Aβ1-15 SiNaPs und 19% für synthetische Aβ1-42 Aggregate innerhalb der Toleranz von ± 20%. Ähnliches wurde auch für die Coating-Variante mit 3% BSA determiniert. Hier wurde die analytische Sensitivität im Vergleich zur Referenzvariante sowohl für Aβ1-15 SiNaPs als auch für synthetische Aβ1-42 Aggregate im Schnitt um 20% gesteigert. Lediglich die Reduzierung von BSA in der Blockadelösung ermöglichte für beide Analyten eine Steigerung der analytischen Sensitivität um ein Vielfaches, wobei vor allem die Signalsteigerungen für synthetische Aβ1-42 Aggregate hervorzuheben waren (Aβ1-15 SiNaPs: 73%, synthetische Aβ1-42 Aggregate: 280%). Aus diesen Gründen wurde diese Coating-Variante als Referenz für alle weiteren Experimente verwendet.

Weitere Optimierung der analytischen Sensitivität durch Additive im Probenpuffer (EXP5)

Nach Eruierung einer geeigneten Konzentration an BSA in der Blockadelösung wurde überprüft, ob durch Zusätze im Probenpuffer wie Detergenz oder Blocking-Agenz die analytische Sensitivität als auch die analytische Spezifität des Assays weiter optimiert werden könne. Hierzu wurden Aβ1-15 SiNaPs und synthetische Aβ1-42 Aggregate sowohl in 1× PBS ohne Additive, in 1× PBS mit 0,5% BSA als auch in 1× PBS mit 0,5% BSA und 0,05% Tween20 verdünnt und auf die vorbereitete Assay-Oberfläche appliziert. Für die Ermittlung der sFIDA Readouts wurde der hintergrundbasierte Cut-off für jede Variante anhand der applizierten Pufferkontrollen angewandt (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18 – Einfluss von Detergenz und Blocking-Agenz als Additive im Probenpuffer auf das Hintergrundrauschen der jeweiligen Assay-Variante in Anbetracht des Cut-offs (0,1% basierend auf der applizierten Pufferkontrolle). Kanal 00: Anregungswellenlänge 635 nm, Emissionswellenlänge 705 nm; Kanal 01: Anregungswellenlänge 488 nm, Emissionswellenlänge 525 nm. Referenz wurde mit * gekennzeichnet.

Variante	Probenpuffer	Kanal 00	Kanal 01
V1*	1× PBS	2076	3221
V2	1× PBS + 0,5% BSA	2026	2395
V3	1× PBS + 0,5% BSA + 0,05% Tween20	1816	1989

Dabei wurde durch Einsatz von BSA eine Reduzierung des Hintergrundrauschens determiniert, wobei vor allem die unspezifischen Signale für Kanal 01 um 26% reduziert werden konnten. Darüber hinaus resultierte der kombinierte Einsatz von Detergenz und Blocking-Agenz sowohl in Kanal 00 als auch in Kanal 01 in einer Hintergrundreduzierung von 13% bzw. 29% im Vergleich zur Referenz.

Der Einsatz von Additiven gewährleistete nicht nur eine Reduzierung des Hintergrundrauschens, sondern auch eine Reduzierung der Varianz der kolokalisierten Pixel innerhalb der vier Replikate (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19 – Übersicht der durchschnittlichen Varianzkoeffizienten der Aβ1-15 SiNaPs und der synthetischen Aβ1-42 Aggregate unter Verwendung der aufgeführten Probenpuffer. Referenz wurde mit * gekennzeichnet.

Variante	Probenpuffer	CV% Aβ1-15 SiNaPs	CV% Aβ1-42 Aggregate
V1*	1× PBS	20,7	47,6
V2	1× PBS + 0,5% BSA	21,3	19,6
V3	1× PBS + 0,5% BSA + 0,05% Tween20	16,3	10,8

Durch die Zugabe von 0,5% BSA im Probenpuffer wurde lediglich die durchschnittliche Varianz der synthetischen Aβ1-42 Aggregate um 59% reduziert. Erst durch den Einsatz des milden Detergenz wurde eine Reduzierung der Intra-Assay-Varianz der Aβ1-15 SiNaPs um durchschnittlich 21% im Vergleich zur Referenz erzielt. Des Weiteren wurde durch den kombinierten Einsatz beider Additive die durchschnittliche Varianz der synthetischen Aβ1-42 Aggregate um 77% reduziert.

Um zu überprüfen, ob der Einsatz von Additiven zudem eine Erhöhung der analytischen Sensitivität ermöglichte, wurde im Anschluss das Signal-Rausch-Verhältnis der einzelnen Varianten miteinander verglichen (siehe Abbildung 25 und Anhang 11).

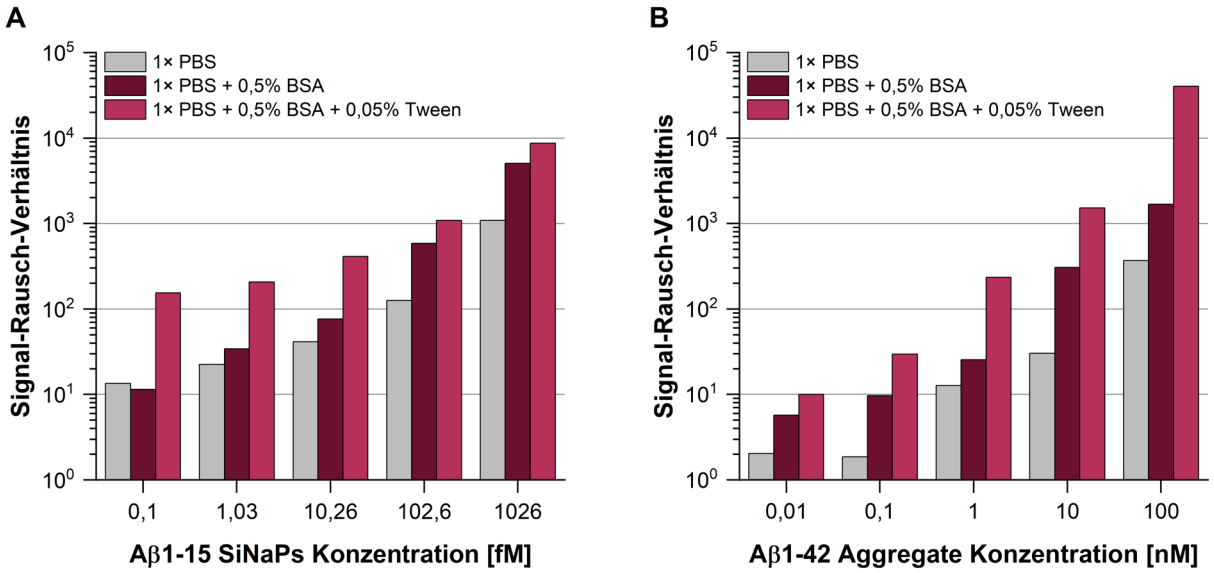


Abbildung 25 – Einfluss von Additiven im Probenpuffer auf das Signal-Rausch-Verhältnis von (A) Aβ1-15 SiNaPs und (B) synthetischen Aβ1-42 Aggregaten. Dargestellt wurden die Quotienten der sFIDA Readouts der applizierten Analyt-Konzentrationen zu den applizierten Pufferkontrollen auf den jeweiligen Festphasenvarianten (basierend auf 0,1% Cut-off). Für die Probenverdünnung wurden folgende Puffer verwendet: 1× PBS (Referenzvariante, grau), 1× PBS mit 0,5% BSA (dunkelrot) sowie 1× PBS mit 0,5% BSA und 0,05%Tween20 (rot).

Bereits durch die Verwendung von 0,5% BSA im Probenpuffer wurde die Empfindlichkeit des Assays gegenüber Aβ1-15 SiNaPs verdoppelt bzw. gegenüber synthetischen Aβ1-42 Aggregaten verfünffacht. Im Gegensatz zu den synthetischen Aβ1-42 Aggregaten sollten Aβ1-15 SiNaPs aufgrund ihres artifiziellen Charakters und den linearen Epitopen (siehe Kapitel 3.1.1.5) weniger anfällig für unspezifischen Bindungen sein, was in diesem Experiment durch die geringere Signalsteigerung bestätigt werden konnte. Letzten Endes wurde die Empfindlichkeit des Assays für Aβ1-15 SiNaPs im Schnitt um Faktor 10 und für synthetische Aβ1-42 Aggregate um Faktor 40 gesteigert. Dieser Effekt spiegelte sich ebenfalls in den repräsentativen TIRFM-Bildern aus Abbildung 26 wider.

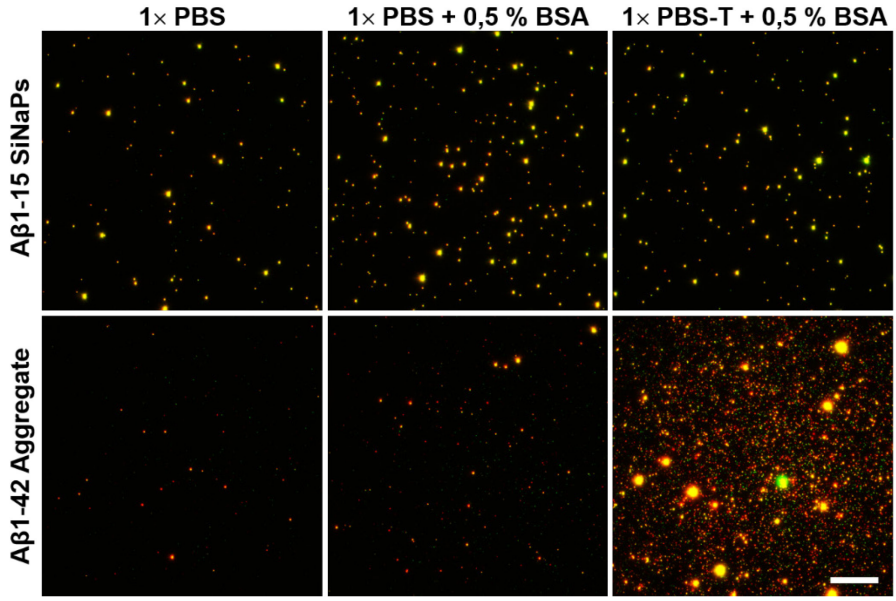


Abbildung 26 – Einfluss von Additiven im Probenpuffer auf das Messsignal von Aβ1-15 SiNaPs und synthetischen Aβ1-42 Aggregaten. Dargestellt wurden repräsentative TIRFM-Bilder von 10,26 pM Aβ1-15 SiNaPs und 1 nM Aβ1-42 Aggregaten (Kontrast 1), wobei entweder 1× PBS, 1× PBS mit 0,5% BSA oder 1× PBS mit 0,5% BSA und 0,05% Tween20 für die Verdünnung beider Analyten verwendet wurde. Für die Akquise der Bilder wurde eine Anregungswellenlänge von 635 nm bzw. 488 nm, eine Emissionswellenlänge von 705 nm bzw. 525 nm, eine Belichtungszeit von 1000 ms sowie eine elektronische Verstärkung von 1300 verwendet. Maßstabsbalken: 20 µm.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Probenpuffer für alle weiteren Experimente mit 0,5% BSA und 0,05% Tween20 versetzt.

Analytische Sensitivität ist von der Kombination der Detektionsantikörper abhängig (EXP6)

Innerhalb des letzten Experiments der Assay-Verifizierung wurde der Einfluss drei verschiedener Kombinationen an Detektionsantikörpern auf das Messsignal der Aβ1-15 SiNaPs und synthetischen Aβ1-42 Aggregate analysiert. Hierzu wurden beide Analyten auf der etablierten Festphase immobilisiert und mit Nab228 CF633 und 6E10 AF488 (Referenzvariante, V1), IC16 CF633 und 6E10 AF488 (V2) sowie IC16 CF633 und Nab228 CF488A (V3) markiert. Aufgrund der vorteilhaften Eigenschaften von BSA und

Tween20 im Probenpuffer wurden in diesem Experiment beide Additive dem Detektionssondenpuffer 1× TBS zugesetzt, wobei die Konzentration von BSA auf 0,1% reduziert wurde. Repräsentative TIRFM-Bilder der Aβ1-15 SiNaPs und der synthetischen Aβ1 42 Aggregate der jeweiligen Variante wurden in Abbildung 27 zusammengestellt.

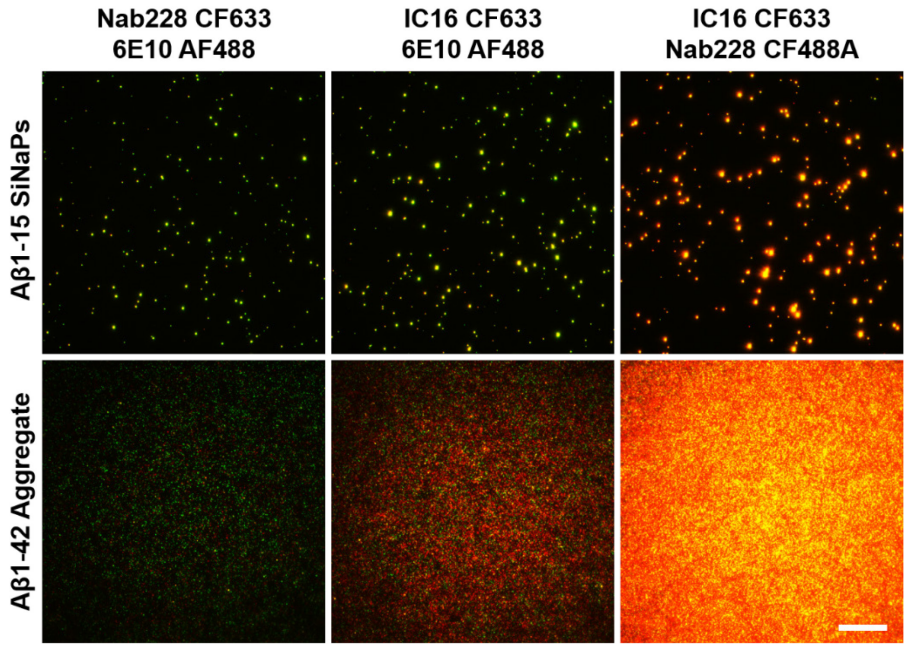


Abbildung 27 – Einfluss der verwendeten Kombination an Detektionssonden auf das Messsignal der Aβ1-15 SiNaPs und der synthetischen Aβ1-42 Aggregate. Dargestellt wurden repräsentative TIRFM-Bilder von 10,26 pM Aβ1-15 SiNaPs und 100 nM Aβ1-42 Aggregate (Kontrast 2), die mit einer Kombination aus Nab228 CF633 und 6E10 AF488, IC16 CF633 und 6E10 AF488 sowie mit IC16 CF633 und Nab228 CF488A markiert wurden. Für die Akquise der Bilder wurde eine Anregungswellenlänge von 635 nm bzw. 488 nm, eine Emissionswellenlänge von 705 nm bzw. 525 nm, eine Belichtungszeit von 1000 ms sowie eine elektronische Verstärkung von 1000 verwendet. Maßstabsbalken: 20 µm.

Für die Ermittlung der sFIDA Readouts wurde der hintergrundbasierte Cut-off für jede Variante anhand der ebenfalls applizierten Pufferkontrolle verwendet (siehe Tabelle 20). Hierbei zeigte sich eine Unempfindlichkeit beider Fluoreszenzkanäle gegenüber dem Wechsel der Detektionssonden. Weder die Graustufenwerte der Testvarianten V2 noch die der Testvariante V3 unterschieden sich um mehr als 5% von der Referenz V1.

Tabelle 20 – Einfluss der verwendeten Detektionssonden auf das Hintergrundrauschen der jeweiligen Assay-Variante in Anbetracht des Cut-offs (0,1% basierend auf der applizierten Pufferkontrolle). Kanal 00: Anregungswellenlänge 635 nm, Emissionswellenlänge 705 nm; Kanal 01: Anregungswellenlänge 488 nm, Emissionswellenlänge 525 nm. Referenz wurde mit * gekennzeichnet.

Variante	Detektionsantikörper	Kanal 00	Kanal 01
V1*	Nab228 CF633 + 6E10 AF488	914	989
V2	IC16 CF633 + 6E10 AF488	924	997
V3	IC16 CF633 + Nab228 CF488A	941	994

Da sich das Hintergrundrauschen bei allen drei Varianten gleich verhielt, wurde im Anschluss das Signal-Rausch-Verhältnis auf Basis der sFIDA Readouts von Aβ1-15 SiNaPs und synthetischen Aβ1-42 Aggregaten kalkuliert, wodurch der Zuwachs an spezifischem Signal quantifiziert wurde. Hierzu wurden die jeweiligen sFIDA Readouts durch den Messwert der applizierten Pufferkontrolle dividiert und die Ergebnisse sowohl in Anhang 12 verzeichnet als auch in Abbildung 28 graphisch dargestellt.

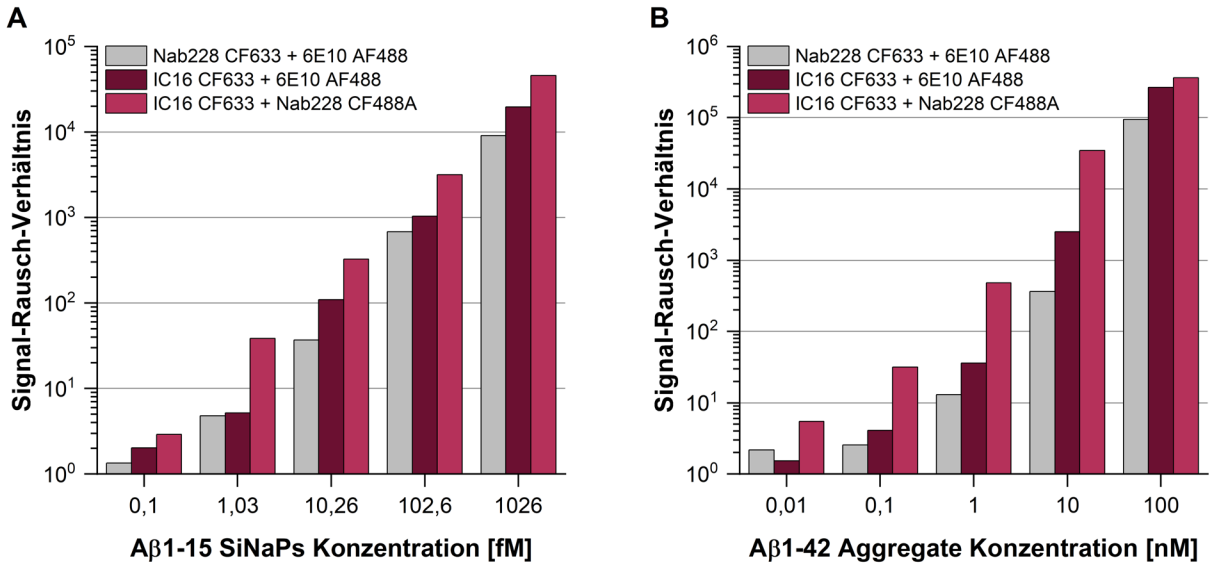


Abbildung 28 – Einfluss der Detektionssonden auf das Signal-Rausch-Verhältnis von (A) Aβ1-15 SiNaPs und (B) synthetischen Aβ1-42 Aggregaten. Dargestellt wurden die Quotienten der sFIDA Readouts der applizierten Analyt-Konzentrationen zu den applizierten Pufferkontrollen auf den jeweiligen Festphasenvarianten (basierend auf 0,1% Cut-off). Die immobilisierten Analyten wurden mit folgenden Kombinationen an Detektionssonden markiert: Nab228 CF633 und 6E10 AF488 (Referenzvariante, grau), IC16 CF633 und 6E10 AF488 (dunkelrot) sowie IC16 CF633 und Nab228 CF488A (rot).

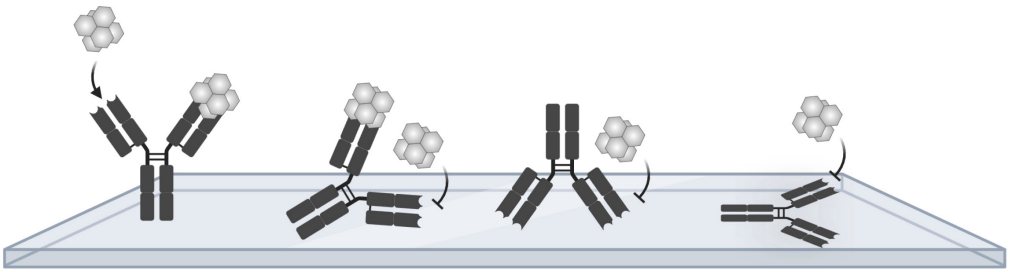
Im direkten Vergleich zur Referenz wurde bei der Testvariante V2 lediglich einer der beiden Detektionsantikörper substituiert. Hierbei konnte durch den alleinigen Wechsel von Nab228 CF633 auf IC16 CF633 das Signal-Rausch-Verhältnis der Aβ1-15 SiNaPs im Durchschnitt bereits verdoppelt bzw. das der synthetischen Aβ1-42 Aggregate verdreifacht werden. Im Vergleich zur Referenz V1 und zur Testvariante V2 wurde bei Testvariante V3 der Detektionsantikörper 6E10 AF488 durch Nab228 CF488A ersetzt. Durch diese zusätzliche Substituierung der Detektionssonde in Kanal 01 wurde eine weitere Zunahme des Signal-Rausch-Verhältnisses für beide Analyten determiniert. Im direkten Vergleich zur Referenz wurde ein durchschnittlicher Anstieg des spezifischen Signals von Aβ1-15 SiNaPs um Faktor 6 bzw. des von synthetischen Aβ1-42 Aggregaten um Faktor 30 determiniert. In Anbetracht der Tatsache, dass Aβ-Aggregate in biologischen Proben nur zu minutiösen Konzentrationen vorliegen, ist die hohe Signalsteigerung der synthetischen Aβ1-42 Aggregate durch Verwendung der Testvariante V3 besonders hervorzuheben. Dieser Unterschied in den

Signalstärken der synthetischen Aβ1-42 Aggregate zwischen Testvariante V3 und der Referenz ist ebenfalls deutlich auf den TIRFM-Bildern in Abbildung 27 zu erkennen.
Auf Basis dieser Ergebnisse wurde die Kombination an Detektionssonden bestehend aus IC16 CF633 und Nab228 CF488A als neue Referenz gesetzt.

3.2.4 Diskussion

3.2.4.1 Physisorption ist als Immobilisierungstechnik geeignet

Das in diesem Teil der vorliegenden Arbeit verwendete Protokoll zur Spacer-vermittelten Immobilisierung der Capture-Antikörper auf der Oberfläche wurde innerhalb der Arbeitsgruppe Bannach eingeführt [157] und im Rahmen interner Entwicklungsarbeiten auf maximal mögliche Coating-Effizienz optimiert. Wie in Kapitel 3.2.3.2, EXP1c dargestellt, konnten mittels Physisorption vergleichbare sFIDA Readouts sowohl für Aβ1-15 SiNaPs als auch für synthetische Aβ1-42 Aggregate determiniert werden, was eine vergleichbare Coating-Effizienz ohne nötige Funktionalisierung und Aktivierung der Oberfläche indizierte.
Wie in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben, kann insbesondere die Orientierung der Capture-Antikörper auf der Assay-Oberfläche die Antigenbindung und somit auch die Signalentwicklung maßgeblich beeinflussen (siehe Abbildung 29) [186, 188, 190, 208].



Kontakt zur Oberfläche	C-terminal	C-terminal 1× N-terminal	N-terminal	C-terminal 2× N-terminal
Antigenbindung	bivalent	monovalent	nicht möglich	nicht möglich

Abbildung 29 – Schematische Darstellung der möglichen Immobilisierung und Randomisierung von Capture-Antikörpern auf der Assay-Oberfläche. Gerade im Falle der Physisorption oder der Spacer-vermittelten Immobilisierung über primäre Amine können Antikörper auf der Assay-Oberfläche unterschiedlich orientiert sein. Idealerweise werden Antikörper C-Terminal auf die Oberfläche immobilisiert und dadurch so ausgerichtet, dass deren Paratope frei zugänglich sind und bivalente Bindungen gewährleistet werden. Ist an der Immobilisierung zusätzlich ein N-terminales Ende involviert, resultiert dies in einer monovalenten Bindung, da ein entsprechendes Paratop unzugänglich ist. Sowohl die Immobilisierung über beide N-terminale Enden als auch die Immobilisierung über beide N-terminale Enden und des C-Terminus verursachen eine Unzugänglichkeit beider Paratope, wodurch keine Antigenbindung möglich ist und der Antikörper gänzlich an Reaktivität verliert. Modifizierte Darstellung nach Welch et al., Wiseman & Frank und Shen et al. [188, 190, 208], erstellt mit BioRender.com.

Das verwendete präaktivierte Spacer-Molekül ermöglichte zwar eine kovalente Bindung des Antikörpers an die Assay-Oberfläche, jedoch wurde aufgrund der Amin-basierten kovalenten Immobilisierung ebenfalls eine randomisierte Ausrichtung der Antikörper erzeugt. Darüber

hinaus ist bei dieser Art der Immobilisierung das Risiko für Paratopmaskierungen erhöht, da innerhalb der N-terminalen Region primäre Amine reichlich exponiert werden und somit verstärkt kovalente Bindungen zwischen dem verwendeten Spacer-Molekül und diesem Bereich gebildet werden können [186, 189, 190]. Folglich kann dies in einer Reduzierung der analytischen Sensitivität resultieren, was in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht determiniert werden wurde.

Eine randomisierte Ausrichtung der Capture-Antikörper kann folglich bei keiner der getesteten Immobilisierungstechniken ausgeschlossen werden. Jedoch kann bei der Physisorption durch Anpassen des Coating-Puffers oder der Capture-Konzentration das spezifische Signal gesteigert werden. Wie in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben, ist der Einsatz verschiedener Puffersysteme sowie Justierung der Puffereigenschaften wie pH-Wert oder Salzgehalt aufgrund Hydrolyse-empfindlicher Reaktanden beim verwendeten Spacer-vermittelten Coating nur bedingt anwendbar. Beispielsweise kann hierbei der Capture-Antikörper nicht in aminhaltigen Puffern wie beispielsweise TRIS verdünnt werden, da diese die zuvor aktivierten Carboxylgruppen absättigen würden [177, 187]. Während bei der Physisorption die Anzahl an Paratopen auf der Assay-Oberfläche durch erneute Antikörperzugabe gesteigert werden kann, ist dies bei der Spacer-vermittelten Immobilisierung nicht möglich [177, 181]. Durch erneute Inkubation mit EDC/NHS würden nicht nur die Carboxylgruppen der Spacer-Moleküle, sondern auch die der bereits kovalent-gekoppelten Antikörper aktiviert, wodurch Antikörpermoleküle quervernetzen und Paratope dadurch sterisch maskiert werden.

Da sowohl die Amingruppen der Oberfläche sowie die NHS-Gruppe als auch die aktivierten Carboxylgruppen des Spacer-Moleküls empfindlich gegenüber Hydrolyse sind, sollten Pufferkonditionen, Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen sowohl für den Prozessschritt der Aminierung sowie der Aktivierung so gewählt werden, dass eine ausreichende Stabilität gewährleistet werden kann. Insbesondere die Phase zwischen Aktivierung der Carboxylgruppe des Spacers und der Ausbildung der kovalenten Bindung zum Antikörper werden aufgrund der Instabilität als kritisch angesehen. Darüber hinaus fördert die Aktivierung der Assay-Oberfläche die Ausbildung unspezifischer Bindungen [181]. Da die Physisorption auf intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Antikörpern und Glas-oberfläche basiert, ist hierbei keine Einführung funktioneller Gruppen von Nöten, wodurch das Vorkommen unspezifischer Bindungen reduziert wird [177, 181]. Lediglich die Desorption der immobilisierten Antikörper durch anschließende Waschzyklen kann deren Anzahl auf der Oberfläche reduzieren [209]. Solch ein Effekt wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht determiniert.

Obwohl synthetische Aβ1-42 Aggregate vergleichbare sFIDA Readouts aufwiesen, wurden unter Verwendung der PEG-vermittelten Immobilisierungstechnik vermehrt unspezifische Bindungen des Analyten an die Assay-Oberfläche in Abwesenheit des Capture-Antikörpers

determiniert. Dies kann durch Einführung hydrophober Gruppen durch die Spacer-Moleküle begründen werden, da Aβ aufgrund des hydrophoben Charakters (siehe Kapitel 1.2.2.1) verstärkt mit den hydrophoben Ketten des PEG-Moleküls wechselwirken kann. Um solche unspezifischen Wechselwirkungen zu reduzieren, wird der Einsatz von Detergenzien in verschiedenen Assay-Puffern wie beispielsweise im Probenpuffer bzw. im Waschpuffer nach der Probeninkubation empfohlen [174, 176]. Dies sollte im Falle einer Weiterentwicklung der kovalenten Immobilisierungstechnik beachtet werden. Zudem sollten andere chemische Mechanismen zur Einführung funktioneller Gruppen, welche eine orientierte Immobilisierung der Antikörper auf der Oberfläche gewährleisten könnten, eruiert werden. Insbesondere die Konjugation des Antikörpers über dessen Zuckermoleküle am Fc-Teil könnte später eine bivalente Antigenbindung gewährleisten, wodurch die Coating-Effizienz weiter gesteigert werden könnte [186, 188, 209]. Alternativ zur kovalenten Bindung könnten auch biospezifische Immobilisierungstechniken wie beispielsweise über Protein G, Biotin-Avidin oder Polyhistidin-Tag zum Einsatz kommen, welche zwar vergleichbare Bindungsstärken aufweisen, jedoch technisch einfacher umzusetzen sind [188, 209].

3.2.4.2 Systematische Verifizierung ermöglichte signifikante Steigerung der analytischen Sensitivität

Da die Physisorption als Immobilisierungstechnik bisher für die verwendeten Mikrotiterplatten noch keine Anwendung fand, war eine systematische Verifizierung des Assay-Protokolls von Nöten. Das Ziel, die analytische Sensitivität des Assays gegenüber Aβ1-15 SiNaPs bzw. synthetischen Aβ1-42 Aggregaten durch empirische Herangehensweise zu steigern, wurde in der vorliegenden Arbeit erfolgreich umgesetzt. Im Folgenden werden der Einfluss der Coating-Parameter, die Komposition des Probenpuffers sowie der Einfluss des Detektionssystems diskutiert.

Eruierung der Coating-Parameter

Zu Beginn wurden drei verschiedene Puffersysteme für die Immobilisierung des Capture-Antikörpers getestet (siehe Kapitel 3.2.3.2, EXP2). In einer korrekt gefalteten Proteinstruktur sind hydrophobe Aminosäuren internalisiert, sodass an der Proteinoberfläche hydrophile Reste, wie Amin-, Carboxyl- oder Hydroxylgruppen exponiert werden [4, 5, 8, 188]. Insbesondere bei der Physisorption, wo die Immobilisierung der Capture-Antikörper über intermolekulare Wechselwirkungen an eine hydrophile Glasoberfläche stattfindet, ist die Exposition solcher Gruppen für die Stärke und Effektivität der Immobilisierung von Vorteil [187, 188]. Beide Faktoren können direkt über Salzgehalt sowie pH-Wert der verwendeten Puffer gesteuert werden, da diese sowohl die native Konformation als auch die Löslichkeit der Antikörper beeinflussen [177, 187, 210]. In der vorliegenden Arbeit wurden durch Variation dieser Parameter Unterschiede in der Effektivität der Immobilisierung sowie Orientierung der

Capture-Antikörper anhand des Signal-Rausch-Verhältnis determiniert. Im Falle des Referenzpuffers (Carbonatpuffer mit pH 8,4) wurde sowohl für Aβ1-15 SiNaPs als auch für synthetische Aβ1-42 Aggregate die höchste Signalsteigerung verzeichnet, was durch vermehrte intermolekulare Wechselwirkungen zur hydrophilen Glasoberfläche als auch durch Konservierung der Paratopregion für die spätere Antigenbindung begründet werden konnte [174, 176, 188]. Dieses Ergebnis stimmt mit bereits standardisierten Protokollen zur IgG-Immobilisierung überein, welche einen leicht basischen Coating-Puffer empfehlen, wobei der pH-Wert so justiert werden sollte, dass er ein bis zwei Einheiten oberhalb des isoelektrischen Punktes des zu immobilisierten Antikörpers liegt [187, 210]. Normalerweise wird hierbei ein pH-Wert von 9,6 verwendet [176, 181]. Da jedoch für sFIDA eine hydrophile Festphase verwendet wurde und somit keine partielle Denaturierung bzw. Exposition hydrophober Regionen erzeugt werden musste, genügte ein pH-Wert von 8,4 aus. Weder unter Einsatz des PBS-Puffers mit pH 7,4 noch durch den MES-Puffer mit pH 3,5 konnten vergleichbare Resultate erzielt werden. Insbesondere bei letzterem wurden im Vergleich zum Referenzpuffer im Schnitt etwa 40% weniger Aβ1-15 SiNaPs bzw. 63% weniger synthetische Aβ1-42 Aggregate detektiert. In diesem sauren Milieu liegt ein Großteil der Aminogruppen des Capture-Antikörpers protoniert vor, was zwar die Anzahl an intermolekularen Wechsel-wirkungen erhöht, jedoch gleichzeitig eine partielle Denaturierung der Proteinstruktur begünstigt [176]. Indirekte Assays, bei denen Antikörper aus der Patientenprobe das zuvor auf der Assay-Oberfläche immobilisierte Antigen binden, nutzen häufig diese protonierenden/ deprotonierenden Effekte, um eine höhere Exposition des Epitops durch Linearisierung der Proteinstruktur zu ermöglichen [174, 176]. Jedoch kann es im Falle eines Sandwich-ELISAs zur Denaturierung der Paratopregion und somit zur Reduzierung der Affinität sowie der analytischen Sensitivität kommen, was in der vorliegenden Arbeit durch Verwendung von MES pH 3,5 als Coating-Puffer für den Nab228 Antikörper bestätigt werden konnte.

Im Anschluss an die Eruierung des Coating-Puffers wurde der Einfluss der eingesetzten Capture-Konzentration auf die Signalentwicklung der Aβ1-15 SiNaPs bzw. der synthetischen Aβ1-42 Aggregate untersucht, wobei die Konzentration schrittweise von 0 bis 7,5 µg/mL erhöht wurde (siehe Kapitel 3.2.3.2, EXP3). Für beide Analyten wurden der in Kapitel 3.1.1.3 beschriebenen Zusammenhang zwischen Capture-Konzentration und Signalsteigerung beobachtet. Die Verwendung geringer Capture-Konzentrationen resultierte wie erwartet in einer unzureichenden Beschichtung der Assay-Oberfläche und somit in einer geringen analytischen Sensitivität. Dies konnte bei Variante V2 (0,625 µg/mL) für beide Analyten gezeigt werden. Hierbei wurden im Vergleich zur Referenz Signalverluste von durchschnittlich 65% determiniert. Durch Verdopplung der Capture-Konzentration konnte das Verhältnis zwar angepasst, jedoch im Vergleich zur Referenz nicht gesteigert werden. Im Falle eines Überschusses an Capture-Antikörpern bildet sich anstatt eines Monolayers, eine

dreidimensionale Schicht an Antikörpern ausbildet, wodurch ein Großteil der Paratope durch sterische Blockierung nicht mehr zugänglich sind und eine Reduzierung an spezifischem Signal verursacht wird [175, 176]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bei Variante V6 (7,5 µg/mL) ebenfalls beobachtet werden, wobei Signalverluste von 44% bei Aβ1-15 SiNaPs und 22% bei synthetischen Aβ1-42 Aggregaten im Vergleich zur Referenz verzeichnet wurden. Lediglich die Variante V4 bei der 2,5 µg/mL Antikörper verwendet wurden zeigte mit 21% bei Aβ1-15 SiNaPs und 28% bei synthetischen Aβ1-42 Aggregaten eine optimierte Antigen-Antikörper-Bindung. Zudem wurden mittels Capture-Kontrolle, bei der dem Coating-Puffer kein Antikörper zugesetzt wurde sowohl für Aβ1-15 SiNaPs als auch für synthetische Aβ1-42 Aggregate vernachlässigbare sFIDA Readouts detektiert, was eine hohe analytische Selektivität gegenüber beiden Analyten indizierte. Für die weitere Assay-Entwicklung wurde daher die Capture-Konzentration von 5 auf 2,5 µg/mL halbiert, was nicht nur die Steigerung des spezifischen Signals ermöglichte, sondern zusätzlich das Risiko falsch-negativer Messsignale reduzierte.

Nach der Immobilisierung der Capture-Antikörper müssen die unbeschichteten Bereiche der Glasoberfläche durch Blocking-Agenz wie Fremdprotein oder Detergenz gesättigt werden. Dadurch werden unspezifische Bindungen nachfolgender Reaktanten vermieden, was gleichzeitig eine Hintergrundreduzierung sowie Steigerung der analytischen Sensitivität ermöglicht. [175, 176, 187, 194]. In einem Vorversuch wurden verschiedene Fremdproteine darunter BSA, Casein und Milchpulver sowie kommerzielle Blockadelösungen getestet, wobei lediglich unter Verwendung von 1% BSA als Blocking-Agenz eine Reduzierung des Hintergrundrauschens gewährleistet werden konnte. Da jedoch zu hohe Konzentrationen an Blocking-Agenz zu falsch-negativen Ergebnissen führen können [174, 175], wurde in einem weiteren Experiment (siehe Kapitel 3.2.3.2, EXP4) der Einfluss verschiedener BSA-Konzentrationen (0,5, 1, 3 und 5%) auf das Hintergrundrauschen, die Capture-Kontrolle sowie die Signalsteigerung von Aβ1-15 SiNaPs als auch von synthetischen Aβ1-42 Aggregaten analysiert. Für Kanal 00 wurde eine signifikante positive Korrelation zwischen eingesetzter BSA-Konzentration und Hintergrundrauschen der Pufferkontrolle determiniert, was unspezifische Wechselwirkungen zwischen Nab228 CF633 und der Assay-Oberfläche indizierte. Da sich dieser Effekt, wenn auch nicht signifikant, in der Anzahl kolokalisierten Pixel widerspiegelte, wurde bei den hohen Konzentrationen an Blocking-Agenz keine Steigerung des Signals der Aβ1-15 SiNaPs als auch der synthetischen Aβ1-42 Aggregate erzielt. Lediglich durch die Halbierung der BSA-Konzentration konnten die spezifischen Signale beider Analyten effektiv gesteigert werden, was sowohl auf die blockierenden Eigenschaften von BSA als auch auf dessen Fähigkeit bei einer geeigneten Konzentration immobilisierte Antikörper auf der Festphase nicht zu überlagern sondern zu stabilisieren, begründet werden konnte [181].

Die Effektivität der Blockierung korreliert zudem mit der Qualität des verwendeten Blocking-Agenz. In der Literatur wird im Fallen von BSA als Blocking-Agenz vor allem die Wichtigkeit der Abwesenheit von Fettsäuren beschrieben, da diese sonst die Konformation destabilisieren und eine Ladungsabstoßung einzelner BSA-Moleküle verursachen. Durch Verwendung von fettfreiem BSA wird die adsorptionsbedingte Denaturierung hingegen verstärkt, Protein-Protein-Abstoßungen verringert und somit eine dichtere Proteinschicht erzeugt [211]. Dies könnte auch eine mögliche Ursache dafür sein, dass in diesem Teil der vorliegenden Arbeit unspezifische Wechselwirkungen zwischen BSA und synthetischen Aβ1-42 Aggregaten mittels Capture-Kontrolle ausgeschlossen werden konnte, obwohl BSA im Verdacht steht, solche Interaktionen auszuüben. Für humanes Serumalbumin, das strukturell BSA sehr ähnlich ist, wurde bereits gezeigt, dass es sowohl Aβ-Monomere als auch kleine Aβ-Oligomere über seine hydrophobe Furche binden kann (Stöchiometrie 1:1) [212, 213]. Diese Wechselwirkung könnte jedoch durch die adsorptionsbedingte Denaturierung von BSA verhindert worden sein.

Einfluss Blocking-Agenz sowie Detergenz im Probenpuffer

Die Wahl und Optimierung eines geeigneten Verdünnungspuffers für Kalibrationsstandards, interne Qualitätskontrollproben sowie biologische Proben ist Kern der Assay-Verifizierung. Hierbei sollten Parameter wie das Puffersystem (Tris, Phosphat, HEPES oder MES), die Ionenstärke, der pH-Wert und der Salzgehalt so justiert werden, dass der Verdünnungspuffer eine hohe Vergleichbarkeit zur späteren Probematrix aufweist [174-176]. PBS, der meistverwendeten Probenpuffer in Immunoassays, bietet eine hohe Vergleichbarkeit zur biologischen Matrix [175] und wurde daher in der vorliegenden Arbeit als Pufferbasis verwendet. Um den Einfluss von Additiven im Probenpuffer auf das Hintergrundrauschen, die Intra-Assay-Varianz sowie das Signal-Rausch-Verhältnis von Aβ1-15 SiNaPs bzw. synthetischen Aβ1-42 Aggregaten zu analysieren, wurde der Einsatz von entweder 0,5% BSA oder 0,5% BSA und 0,05% Tween20 getestet (siehe Kapitel 3.2.3.2, EXP5). BSA diente hierbei nicht nur der weiteren Anpassung des Puffers an die Probenmatrix, sondern auch als Blocking-Agenz, um die Adsorption von Aβ-Aggregaten an die Kunststoffoberfläche der Reaktionsröhrchen oder die der Pipettenspitzen zu reduzieren [176, 181]. Um mögliche Epitopmaskierungen oder unspezifische Bindungen der Analyten an die Assay-Oberfläche zu reduzieren, wurde als weiteres Additiv das nicht-ionische Detergenz Tween20 in einer Konzentration von 0,05% eingesetzt. Insbesondere bei Proteinaggregaten bietet sich der Einsatz von geringkonzentrierten, nicht-ionischen Detergenzien an, um intermolekulare Wechselwirkungen unspezifischer sowie hydrophober Art zwischen Proteinen zu lösen [175, 176]. In diesem Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Kombination beider Additive sowohl auf das Hintergrundrauschen als auch auf die Intra-Assay-Varianz positiv auswirkte und zudem die analytische Sensitivität gegenüber beiden Analyten um ein

Vielfaches verbesserte. Bereits durch die alleinige Verwendung von BSA als Additiv konnte die analytische Sensitivität gegenüber Aβ1-15 SiNaPs verdoppelt bzw. gegenüber synthetischen Aβ1-42 Aggregaten verfünffacht werden. Dies wurde durch die reduzierte Adsorption der Analyten an die stark hydrophobe Kunststoffoberfläche der Reaktionsgefäße bzw. der verwendeten Pipettenspitzen sowie durch die Reduzierung des Hintergrundrauschens ermöglicht. Beides folgte zudem vor allem für synthetische Aβ1-42 Aggregate in einer Reduzierung der Intra-Assay-Varianz. Durch den zusätzlichen Einsatz von Tween20 konnten zudem intermolekulare Wechselwirkungen agglomerierter Aβ1-15 SiNaPs und synthetischer Aβ1-42 Aggregate gelöst werden, wodurch die Anzahl an zugänglichen Epitopen erhöht wurde. Dies wurde durch einen weiteren Anstieg des spezifischen Signals indiziert, der insbesondere für synthetische Aβ1-42 Aggregate mit einem Faktor von 40 besonders hervorzuheben war. Zudem wurde das Hintergrundrauschen sowie die Intra-Assay-Varianz durch den Einsatz des nicht-ionischen Detergenz weiter reduziert. In diesem Experiment wurde außerdem gezeigt, dass Aβ1-15 SiNaPs aufgrund ihres artifiziellen Charakters und den linearen Epitopen sehr robust gegenüber Änderungen der Matrix sind, was ihr Potenzial als Kalibrationsstandard erneut unterstrich.

Einfluss verschiedener Detektionssonden auf das Messsignal

Innerhalb der Festphasenentwicklung ist die Eruierung der Detektionsantikörper, deren eingesetzte Konzentration sowie die Komposition des Sondenpuffers vorgesehen. Im Rahmen der letzten Verifizierungsstudie wurde daher der Einfluss verschiedener Detektionsantikörperkombination auf die Messwerte von Aβ1-15 SiNaPs und synthetischen Aβ1-42 Aggregaten analysiert, wobei sowohl die Kombination Nab228 CF633 und 6E10 AF488 als auch IC16 CF633 und 6E10 AF488 sowie IC16 CF633 und Nab228 CF488A getestet wurden (siehe Kapitel 3.2.3.2, EXP6). Durch Verwendung von 0,1% BSA sowie 0,05% Tween20 als Additive im Sondenpuffer konnten bei allen Varianten das Hintergrundrauschen weitestgehend reduziert werden, wobei die Kombination IC16 CF633 und Nab228 CF488A durch die höchste Signalsteigerung überzeugte. Insbesondere im Hinblick auf die minutiösen Konzentrationen an Aβ-Aggregaten in Körperflüssigkeiten wie Liquor (fM - pM) oder Plasma (aM - pM) [20], war die Steigerung des spezifischen Signals der synthetischen Aβ1-42 Aggregate um Faktor 30 für die Qualifizierung des entwickelten sFIDA-Assays zum Nachweis endogener Aβ-Aggregate essenziell.

Im Allgemeinen kann das Messsignal der verwendeten Detektionsantikörper von verschiedenen Faktoren wie die Spezifität, Affinität sowie Avidität als auch die Wahl des Fluoreszenzfarbstoffs, der Markierungstechnologie sowie Grad der Fluoreszenzmarkierung abhängig sein [175, 181]. Da erst die Substitution des kommerziellen 6E10 AF488 eine vielfache Steigerung des spezifischen Signals ermöglichte, werden im Folgenden die

genannten Faktoren unter Berücksichtigung der bekannten Spezifikationen der verwendeten Detektionsantikörper diskutiert.

Wie auch von der Literatur empfohlen, wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich monoklonale Antikörper zur Immobilisierung und zur Detektion verwendet, da diese im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern lediglich ein einziges Epitop des Analyten binden und somit Kreuzreaktivitäten reduziert werden [175, 176, 192]. Da die verwendeten Antikörper alle gegen lineare Epitope der N-terminalen Region von Aβ gerichtet waren (Nab228 aa1-11, 6E10 aa3-8 sowie IC16 aa2-8), schien der Einfluss der Spezifität nicht ursächlich für die geringe Signalentwicklung des 6E10 AF488 zu sein. Im Gegenteil, da die jeweiligen Detektionsantikörper sowohl untereinander als auch mit dem Capture-Antikörper konkurrierten, konnte wie bereits von anderen Immunoassays zur Quantifizierung von Aβ-Aggregaten gezeigt [144, 214, 215] für alle getesteten Detektionsantikörperkombinationen eine hohe analytische Spezifität gegenüber aggregierten Aβ-Spezies erzielt werden.

Für gewöhnlich werden in der Literatur Antikörperaffinitäten im nanomolaren Konzentrationsbereich empfohlen [174-176, 181], jedoch konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass im Falle von Proteinaggregaten als Analyten Antikörperaffinitäten im nanomolaren Konzentrationsbereich ausreichen (Nab228: K_D-Wert 99 nM [216], 6E10: K_D-Wert 22 nM [217], IC61: K_D-Wert 3,2 nM IC16 [218]). Da die Proteinaggregate aufgrund der vorhandenen multiplen Epitope polyvalente Eigenschaften aufweisen, ist die Wechselwirkungen der Assay-Antikörper im Vergleich zur Bindung mit monovalenten Analyten stabiler und somit eine geringere Affinität ausreichend.

Dennoch wird die Konjugation mit Fluorophoren in der Literatur teilweise kritisch angesehen, da sie je nach angewandter Chemie, die Affinität der Antikörper reduzieren kann [181, 190]. Insbesondere die Kopplung des Fluorophors über Lysine kann eine Maskierung der Paratopregion verursachen und dadurch die Affinität des Antikörpers reduzieren [181, 190]. Da keine Informationen über die verwendete Konjugationstechnik des kommerziellen 6E10 AF488 Antikörpers vorlagen, kann solch eine Affinitätsreduzierung an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden. Dies traf jedoch auch auf die nicht kommerziellen Detektionsantikörper Nab228 CF633, Nab228 CF488A sowie IC16 CF633 zu, da die verwendete Konjugationstechnik auf Lysinresten basierte (siehe Kapitel 3.2.2.3). Zukünftig sollte daher der Einfluss der Konjugation auf die Affinität sowie Avidität beispielsweise mittels Dot Blot, Bio-Layer-Interferometrie oder Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie analysiert wurde. Sollte sich eine durch die Fluoreszenzmarkierung verursachte Paratopmaskierung herausstellen, ist ein Wechsel der Konjugationschemie obligatorisch. Eine Alternative zur Kopplung über Lysine wäre beispielsweise die sogenannte *Klick-Chemie*, welche die kovalente Bindung über die Kohlenhydratreste ermöglicht und somit eine Paratopmaskierung gänzlich ausschließen würde [181, 189, 219].

Eine weitere Ursache für die geringe Signalamplifikation unter Verwendung des kommerziellen 6E10 AF488 Antikörpers könnte eine reduzierte Quantenausbeute aufgrund eines möglichen Quench-Effekts sein. Befinden sich einzelne Fluorophore in unmittelbarer Nähe kann dies in einer Löschung der Fluoreszenz resultieren, indem die Energie beim Übergang in den Grundzustand in Wärme und nicht in Fluoreszenz umgewandelt wird. Insbesondere bei Antikörpern, die bereits vor der Konjugation mit Fluorophor aufgrund von mechanischem, chemischem oder physikalischem Stress aggregiert vorliegen, kann dies der Fall sein [9, 181]. Die Wahrscheinlichkeit für solcher Aggregationsprozesse und somit auch für die Fluoreszenzlöschung wird zudem durch die Modifizierung des Antikörpers mit Fluorophoren erhöht, da durch die Konjugation die Löslichkeit reduziert wird und intermolekulare Wechselwirkungen verstärkt werden. Da keine Informationen über den Konjugationsprozess des kommerziellen 6E10 AF488 Antikörpers und somit auch keine Angaben über eine mögliche Entfernung bereits aggregierter Antikörperspezies vor der Konjugation vorliegen, kann solch eine Fluoreszenzlöschung an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden. Darüber hinaus kann solch eine Fluoreszenzlöschung durch einen zu hohen Markierungsgrad verursacht werden, da sich in diesem Falle auf einzelnen Antikörper-Molekülen zu viele Fluorophore in unmittelbarer Nähe befinden [181]. Dies kann jedoch für die vorliegende Arbeit aufgeschlossen werden, da die DOLs aller Detektionssonden innerhalb der vom Hersteller vorgeschriebenen Toleranz lagen (siehe Tabelle 11).
Eine weitere Ursache für die geringe Signalamplifikation unter Verwendung des kommerziellen 6E10 AF488 Antikörpers könnte eine geringere Photostabilität des verwendeten Alexa Fluor Farbstoffs sein. Für den CF633-Farbstoff wurde bereits gezeigt, dass dieser im Vergleich zum AF647-Farbstoff weitaus resistenter gegenüber Photobleichen ist (siehe Abbildung 30) [220].

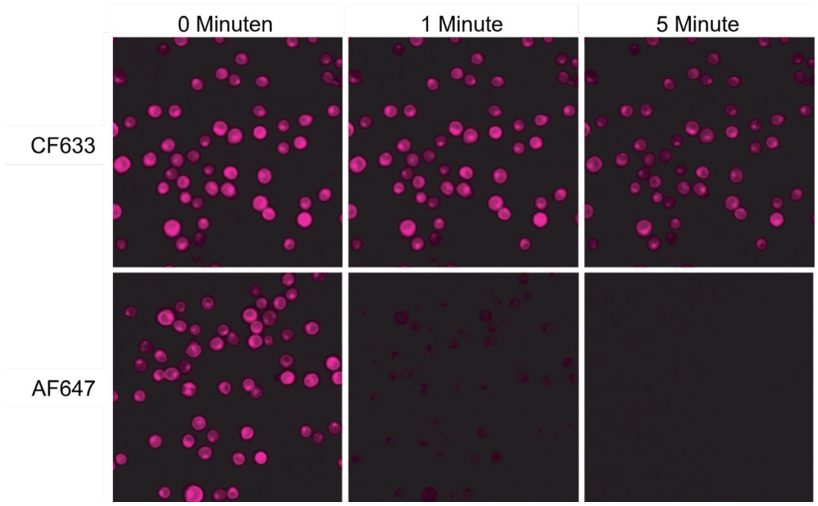


Abbildung 30 – Vergleich des CF633-Farbstoffs und des AF647-Farbstoffs bezüglich der Photostabilität. Dargestellt sind Jurkat-Zellen, welche zuerst mit einem Maus-Anti-CD3-Antikörper markiert und anschließend mittels einem sekundären Ziegen-Anti-Maus-Antikörper detektiert wurden. Die Zellen wurden mit kontinuierlicher Quecksilberbogenlampenanregung durch einen Cy®5-Filterwürfel abgebildet, wobei die einzelnen Bilder nach einer Gesamtbelichtungszeit von null Minuten, einer bzw. fünf Minuten akquiriert wurden. Modifizierte Darstellung nach Sigma-Aldrich [220].

Daher sollte zukünftig die Photostabilität des kommerziellen 6E10 AF488 beispielsweise mit einem selbsthergestellten 6E10 CF488A verglichen werden. Sollte sich herausstellen, dass tatsächlich eine geringere Photostabilität des AF488-Farbstoffs die Ursache für die geringe Signalentwicklung ist, sollte zukünftig auf den kommerziellen 6E10 AF488 verzichtet werden.

Zusammenfassung der Verifizierung

Der von der ISO 13485 geforderte Verifizierungsplan wurde in der vorliegenden Arbeit anhand einzelner Parameter der Festphasenentwicklung sowie dazugehörigen Kennzahlen etabliert. Hierzu wurde der aktuelle Stand der Technik berücksichtig und für sFIDA insbesondere bezüglich des digitalen Messwerts angepasst. Basierend auf den Ergebnissen dieses Kapitels konnte gezeigt werden, dass der etablierte Verifizierungsplan erfolgreich für die Entwicklung eines sFIDA-Assays zur Quantifizierung von Aβ1-15 SiNaPs und synthetischen Aβ1-42 Aggregaten angewandt werden konnte.

Für eine Gegenüberstellung wurden sFIDA Readout, Signal-Rausch-Verhältnis sowie die Intra-Assay-Varianz in Tabelle 21 zusammengefasst, wobei die aufgeführten Daten aus den Experimenten EXP1c und EXP6 stammen. Insgesamt wurde vor allem das spezifische Signal von synthetischen Aβ1-42 Aggregaten durch die systematische Eruierung bzw. Justierung der einzelnen Assay-Parameter um ca. Faktor 200 gesteigert. Mittels des etablierten Verifizierungsplan ist es nun möglich, innerhalb weniger Experimente wichtige Festphasen-parameter systematisch zu eruieren und somit sowohl die analytische Sensitivität als auch die analytische Spezifität verschiedener sFIDA-Assays zu steigern.

Tabelle 21 – Gegenüberstellung der Assay-Protokolle vor (EXP1c) sowie nach (EXP6) Verifizierung. Aufgeführt sind sowohl die einzelnen Assay-Parameter sowie eine Gegenüberstellung verschiedener Kennzahlen für 10,26 pM Aβ1-15 SiNaPs und 10 nM synthetische Aβ1-42 Aggregate.

	EXP1c	**EXP6**
Coating-Lösung	5 µg/mL Nab228 0,1 M $NaHCO_3$ pH 8,4	2,5 µg/mL Nab228 0,1 M $NaHCO_3$ pH 8,4
Blocking	1% BSA in TBS-ProClin	0,5% BSA in TBS-ProClin
Probenpuffer	1× TBS	1× PBS-T + 0,5% BSA
Detektions-antikörper	0,156 µg/mL Nab228 CF633 0,625 µg/mL 6E10 AF488 in 1× TBS	0,625 µg/mL IC16 CF633 0,625 µg/mL Nab228 CF488A in 1× TBS-T + 0,1% BSA
Aβ1-15 SiNaPs		
sFIDA Readout	94.042	126.545
Signalsteigerung	31.771	45.684
CV%	47,28	6,78
Aβ1-42 Aggregate		
sFIDA Readout	530	96.136
Signalsteigerung	183	34.706
CV%	49,04	24,51

4 Publizierte Daten

Im folgenden Abschnitt sind verschiedene Projekte aufgeführt, die basierend auf dem in Kapitel 3 etablierten Entwicklungsplan während der Erstellung der vorliegenden Promotionsarbeit begleitet, koordiniert und abgeschlossen wurden. Zusätzlich zu diversen Verifizierungsstudien wurden innerhalb der Projekte aus Kapitel 4.1 bis Kapitel 4.7 verschiedene Studien zur Prozessentwicklung wie Stabilitätsstudien und präanalytische Studien sowie analytische Validierungen durchgeführt.

In Kapitel 4.1 und Anhang 13 wurde die Einführung einer Aβ-Oligomer-basierten internen Qualitätskontrollprobe beschrieben, die sowohl die Standardisierung des sFIDA-Assays als auch dessen Anwendbarkeit für Routinemessungen erhöhte. Es wurden zudem diverse sFIDA-Assays entwickelt, welche die sensitive sowie spezifische Quantifizierung von Aβ-Aggregaten aus humanen Liquorproben (siehe Kapitel 4.2 und Anhang 14), humanen Plasmaproben (siehe Kapitel 4.3 und Anhang 15) sowie humanen Stuhlproben (siehe Kapitel 4.4 und Anhang 16) ermöglichten und somit zukünftig zur Diagnosestellung von AD beitragen können. Weitere Applikationen beschreiben den Nachweis von α-Synuclein Aggregaten in humanen Stuhlproben (siehe Kapitel 4.5 und Anhang 17) beziehungsweise von Tau- und α-Synuclein Aggregaten in humanen Liquorproben (siehe Kapitel 4.6 und Anhang 18). Des Weiteren wurden innerhalb der in Kapitel 4.7 und Anhang 19 aufgeführten Machbarkeitsanalyse erstmals DISC1-Aggregate, ein potenzieller Biomarker für eine Subgruppe chronisch mentaler Erkrankungen, aus humanen Liquorproben mittels sFIDA quantifiziert.

Neben diagnostischen Anwendungen wurde die sFIDA-Technologie zudem für den Einsatz im Bereich der präklinischen Medikamentenentwicklung weiterentwickelt. Hierbei wurde in Kapitel 4.8 und Anhang 20 die erfolgreiche Anwendung der sFIDA-Technologie im Bereich der Medikamentenentwicklung anhand von *ex-vivo* Target Engagement Analysen in Maus- sowie humanen Hirnhomogenatproben demonstriert. Darüber hinaus wurde das Potenzial einer zukünftigen Anwendung des sFIDA-Assays als therapiebegleitendes Diagnostikum anhand einer weiteren Studie erstmals demonstriert (siehe Kapitel 4.9 und Anhang 21).

4.1 Aβ-Oligomer-basierte interne Qualitätskontrollprobe

Development and Implementation of an Internal Quality Control Sample to Standardize Oligomer-Based Diagnostics of Alzheimer's Disease

Autoren	**Marlene Pils**, Alexandra Dybala, Fabian Rehn, Lara Blömeke, Tuyen Bujnicki, Victoria Kraemer-Schulien, Wolfgang Hoyer, Detlev Riesner, Dieter Willbold, Oliver Bannach
Publiziert in	**Diagnostics. 2023; 13(10):1702 (Mai 2023)** Impact-Faktor: 3,992 (2023) DOI: https://doi.org/10.3390/diagnostics13101702
Beitrag	**Eigener Anteil 65%** ▪ Weiterentwicklung und Validierung der sFIDA-Technologie für den Nachweis von Aβ-Oligomeren ▪ Etablierung des Aggregationsprotokolls ▪ Studiendurchführung zur Charakterisierung sowie Validierung der internen Qualitätskontrollprobe ▪ Auswertung und Analyse der sFIDA-Daten ▪ Anfertigung der Abbildungen ▪ Diskussion der Ergebnisse ▪ Hauptverfasserin des Manuskripts
Druckgenehmigung	siehe Anhang 22

diagnostics

MDPI

Article

Development and Implementation of an Internal Quality Control Sample to Standardize Oligomer-Based Diagnostics of Alzheimer's Disease

Marlene Pils [1,2], Alexandra Dybala [1,3], Fabian Rehn [1,2], Lara Blömeke [1,2], Tuyen Bujnicki [2], Victoria Kraemer-Schulien [2], Wolfgang Hoyer [2,3], Detlev Riesner [1,3], Dieter Willbold [1,2,3] and Oliver Bannach [1,2,*]

[1] attyloid GmbH, Merowingerplatz 1a, 40225 Düsseldorf, Germany; m.pils@attyloid.com (M.P.); alexandra.ziemski@hhu.de (A.D.); f.rehn@attyloid.com (F.R.); l.bloemeke@attyloid.com (L.B.); detlev.riesner@hhu.de (D.R.); d.willbold@fz-juelich.de (D.W.)
[2] Institute of Biological Information Processing (Structural Biochemistry: IBI-7), Forschungszentrum Jülich, 52428 Jülich, Germany; t.bujnicki@fz-juelich.de (T.B.); v.kraemer-schulien@fz-juelich.de (V.K.-S.); wolfgang.hoyer@hhu.de (W.H.)
[3] Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany
* Correspondence: o.bannach@attyloid.com; Tel.: +49-(0)-211-81-10377

Abstract: Protein misfolding and aggregation are pathological hallmarks of various neurodegenerative diseases. In Alzheimer's disease (AD), soluble and toxic amyloid-β (Aβ) oligomers are biomarker candidates for diagnostics and drug development. However, accurate quantification of Aβ oligomers in bodily fluids is challenging because extreme sensitivity and specificity are required. We previously introduced surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) with single-particle sensitivity. In this report, a preparation protocol for a synthetic Aβ oligomer sample was developed. This sample was used for internal quality control (IQC) to improve standardization, quality assurance, and routine application of oligomer-based diagnostic methods. We established an aggregation protocol for Aβ1–42, characterized the oligomers by atomic force microscopy (AFM), and assessed their application in sFIDA. Globular-shaped oligomers with a median size of 2.67 nm were detected by AFM, and sFIDA analysis of the Aβ1–42 oligomers yielded a femtomolar detection limit with high assay selectivity and dilution linearity over 5 log units. Lastly, we implemented a Shewhart chart for monitoring IQC performance over time, which is another important step toward quality assurance of oligomer-based diagnostic methods.

Keywords: Alzheimer's disease; diagnosis; dementia; biomarkers; amyloid-β peptide; oligomer-based diagnostics; immunoassays; internal quality control; atomic force microscopy; Shewhart chart

check for updates

Citation: Pils, M.; Dybala, A.; Rehn, F.; Blömeke, L.; Bujnicki, T.; Kraemer-Schulien, V.; Hoyer, W.; Riesner, D.; Willbold, D.; Bannach, O. Development and Implementation of an Internal Quality Control Sample to Standardize Oligomer-Based Diagnostics of Alzheimer's Disease. *Diagnostics* **2023**, *13*, 1702. https://doi.org/10.3390/diagnostics13101702

Academic Editor: Agnieszka Kulczyńska-Przybik

Received: 30 March 2023
Revised: 5 May 2023
Accepted: 7 May 2023
Published: 11 May 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive brain disease that causes increasing deterioration of mental abilities. AD is mainly characterized by misfolding and aggregation of amyloid-β (Aβ) peptides and Tau proteins into amyloid plaques and neurofibrillary tangles [1,2]. For decades, these deposits were considered the primary cause of disease onset and progression. However, it is increasingly recognized that the soluble oligomeric species formed during the aggregation process are the major neurotoxic species of AD [3–6]. Consequently, these oligomers represent a primary drug target and a promising biomarker candidate for early AD diagnostics. The minute amounts of oligomeric Aβ in body fluids such as cerebrospinal fluid (CSF, aM-fM) [5] and excessive concentrations of Aβ monomers and matrix components require extremely sensitive and specific quantitation technologies [5–7].

We previously developed the surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) technology as an oligomer-specific quantitation method with single-particle

sensitivity [8–12]. Although the biochemical setup of the sFIDA assay is similar to sandwich ELISA (Figure 1), the readout is microscopy-based with sub-femtomolar sensitivity [7]. In sFIDA, Aβ species are captured on a glass surface by an N-terminal anti-Aβ antibody; subsequently, Aβ oligomers are detected by two different fluorescence-labeled antibodies. Monomeric Aβ is not detected because capture and detection antibodies compete for the same or overlapping epitopes [11]. Using linear epitopes, all subtypes of aggregated protein, including low- and high-molecular-weight oligomers, are detected [8]. The glass surface is imaged by dual-color total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) to count the number of oligomers in a sample. Background noise is reduced by applying a cutoff, which is a predefined intensity value, and only signals above the cutoff are evaluated. Moreover, signal colocalization of both fluorescently labeled detection antibodies (called sFIDA readout) increases specificity and directly correlates with the Aβ oligomer concentration in the sample [11].

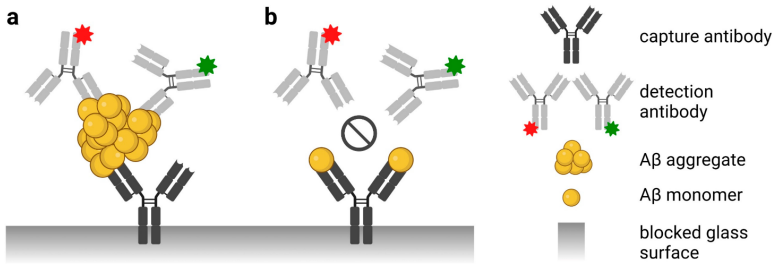


Figure 1. Scheme of the sFIDA principle. The biochemical principle of sFIDA is similar to a sandwich ELISA with capture and detection antibodies directed against the same or overlapping epitopes of the N-terminus of Aβ. Monomeric and oligomeric Aβ species of the sample bind to the capture antibodies. (**a**) However, the red or green fluorescently labeled detection antibodies only detect aggregated Aβ species such as oligomers because the assay antibodies bind to the same or overlapping epitope. (**b**) Therefore, the red or green labeled detection antibody cannot bind monomers because the capture antibody already masks the epitope. Subsequently, the assay surface is imaged using dual-color fluorescence microscopy (excitation at 635 and 488 nm), and only colocalized pixels above a defined cutoff threshold are counted by image data analysis. Abbreviations: Aβ, amyloid-β; sFIDA, surface-based fluorescence intensity distribution analysis. Created with BioRender.com (accessed on 26 April 2023).

Moreover, oligomer quantification is challenging because reliable calibration standards are required [4,5,13]. To address this issue, we recently developed and characterized stable silica nanoparticles (SiNaPs) coated with Aβ peptides, which serve as calibration standards for translating pixel-based readouts into molar particle concentrations [13]. In contrast to natural oligomers that can undergo structural changes and epitope masking in response to changes in buffer conditions or matrix effects [14,15], SiNaPs are very robust because of their artificial, silica-based nature. Nevertheless, it is necessary to have an Aβ oligomer-based internal quality control (IQC) sample that sensitively detects unfavorable or declining assay performance in response to analytical, biological, or clinical changes [16,17]. In addition, monitoring the day-to-day (between-run) precision and accuracy of the IQC sample improves assay comparability and standardizes oligomer-based diagnostic methods for routine applications [18].

Soluble Aβ oligomers are transient and very heterogeneous in size and shape. Thus, investigators have struggled to prepare a reliable Aβ oligomer sample for in vitro and in vivo studies [4,5,13,19]. Firstly, Aβ oligomers must be sufficiently stable during the assay procedure, i.e., must not dissociate to monomers or grow further into insoluble structures such as fibrils. In this context, the ease of the aggregation protocol would also be important, as it should not require complex pretreatments for stabilization, such as crosslinking or protein engineering [20]. Secondly, a suitable characterization method

must be applied to investigate the shape and size of Aβ oligomers. Several methods are described in the literature, whereby atomic force microscopy (AFM) enables size and shape characterization because of its insensitivity to buffer components and matrix effects while providing high-resolution three-dimensional morphological images [21]. Thirdly, Aβ oligomers should be stable for in vitro studies such as oligomer-based diagnostic methods to facilitate reproducibility that is evaluated using quality assurance tools such as control sheets, Shewhart charts, or Cusum charts [16–18].

In the present study, we describe detailed methods to consistently generate an Aβ1–42 oligomer-based IQC sample and characterize its shape and size using atomic force microscopy. We then demonstrate IQC applicability and monitoring using sFIDA for in vitro oligomer-based diagnostic methods. We investigated several validation parameters, such as detection and quantification limits, intra-assay variability, dilution linearity, and assay selectivity. Lastly, we demonstrate the use of Shewhart charts for monitoring the IQC performance over time at three IQC sample concentrations.

2. Materials and Methods

2.1. Monomerization Aβ1–42 Peptide Stock and Aggregation Protocol

The monomerization and aggregation protocol used to generate oligomeric Aβ species was established by considering the findings of Aβ aggregation studies [19–23]. For a graphical illustration of the preparation methods, including the monomerization and aggregation procedure, see Figure S1.

Monomerization of the Aβ1–42 peptide stock is essential for generating homogeneous oligomers [19,21]. Thus, we used a strong fluorinated alcohol, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), to remove any preexisting β-sheet secondary structure or seeds. All preparation steps that use HFIP should be performed under a fume hood or clean bench because of its volatility. We reduced the lyophilized starting material per aliquot because Aβ1–42 aggregates more spontaneously at a stock concentration higher than 90 nM. Thus, we first prepared aliquots containing 50 µg of Aβ1–42 by adding 550 µL of HFIP directly into the original vial containing 1 mg of Aβ1–42 (Bachem AG, Bubendorf, Switzerland). Complete dissolution of the Aβ1–42 peptide was achieved by 30 min incubation at room temperature (RT) and agitated at 650 rpm. The solution was then transferred into a protein low-binding reaction tube (Eppendorf, Hamburg, Germany), and the original vial was rinsed with 550 µL of HFIP. Next, this solution was quickly divided into 20 aliquots of 50 µL each using a repeating pipette or cooled Hamilton syringe (Figure S1, step 1). Subsequently, tubes were transferred into a SpeedVac and dried for ~1 h without heating until all HFIP and H_2O were removed. The monomeric stock tubes containing 50 µg of Aβ1–42 were sealed and stored at RT (Figure S1, step 2). To further reduce the initial amount of Aβ1–42, we repeated this step by adding 550 µL of HFIP to a 50 µg Aβ1–42 tube and creating 10 new aliquots of 5 µg each. These were dried and stored as described above (Figure S1, step 3).

For the preparation of the IQC sample stock solution, 5 µg of monomeric Aβ1–42 was solved in 5 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich), briefly mixed, spun down, and agitated for 10 min at 650 rpm (Thermomixer, Eppendorf) at RT (Figure S1, step 4). This step should be scheduled immediately prior to further use because a prolonged residence time of Aβ in the DMSO stock solution can lead to spontaneous protofibril formation [21]. Because physiological conditions such as salt concentration and pH facilitate the aggregation of oligomeric Aβ species [21], we subsequently diluted the DMSO stock solution with 1× phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS, Sigma-Aldrich) containing 0.04% sodium azide (NaN_3, AppliChem, Darmstadt, Germany) to a concentration of 10 µM (Figure S1, step 5). The IQC sample stock solution was again briefly mixed, spun down, and agitated for 16 h at 650 rpm at RT to promote oligomerization (Figure S1, step 6).

2.2. Atomic Force Microscopy

AFM is insensitive to matrix effects and solution conditions, and it generates detailed surface information at a nanometer scale [21]. Therefore, AFM was used for the size and shape characterization of the synthesized Aβ oligomers.

The 10 µM IQC sample stock solution containing oligomeric species was diluted to 1 µM in PBS. As a control, 10 µM monomeric IQC sample stock solution was prepared analogously, but incubation after adding PBS was not performed (Section 2.1). Ten microliters of each sample was loaded onto a mica slide and incubated for 30 min at RT in a closed petri dish. A wet tissue was added to prevent drying artefacts. The slide was washed 3× with 100 µL of ddH_2O and dried with N_2 gas. The samples were measured using NanoWizard III (JPK BioAFM, Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) with an OMCL-AC160TS cantilever (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) in the intermittent contact mode (AC mode) in air. For size determination, three images (2 × 2 µm with a resolution of 512 × 512 pixels) were recorded with a frequency of 0.5 Hz. Assuming the oligomers are globular, the height profile of 1300 oligomers was further analyzed with ImageJ using the "Find Maxima" tool. The determined height was equated to the size of the oligomers.

2.3. sFIDA

2.3.1. Synthesis of SiNaPs Coated with Aβ1–15

In this study, SiNaPs coated with Aβ1–15 were synthesized, functionalized, and activated, as described previously [7,8,13]. Briefly, SiNaPs were synthesized via the Stöber process and silanized with 3-aminopropyl(triethoxysilane) (APTES, Sigma-Aldrich) to functionalize the surface with primary amino groups. The carboxy groups of maleimidohexanoic acid (MIHA, abcr GmbH, Karlsruhe, Germany) were then activated by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC, Sigma-Aldrich) and N-hydroxysuccinimide (NHS, Sigma-Aldrich) and coupled covalently to the amines. Aβ and maleimide groups were crosslinked using C-terminal functionalized Aβ1–15 peptides with cysteamine (Peptides and Elephants, Henningsdorf, Germany). Lastly, the molar SiNaP concentration was calculated on the basis of the silicon concentration, which was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry, and the size, density, and shape of the particles were determined by transmission electron microscopy.

2.3.2. Labeling of Antibodies

The anti-Aβ antibody IC16 (mouse, monoclonal, amino acids (aa)2–8, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany) labeled with CF633 dye (Biotium, Freemont, CA, USA) and the anti-Aβ antibody Nab228 (mouse, monoclonal, aa1–11, Sigma-Aldrich) labeled with CF488A dye (Biotium) were used as detection probes for TIRFM. Labeling was performed according to the manufacturer's protocol. After purification via size exclusion using a polyacrylamide bead suspension (Bio-Gel P-30 Gel, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), the concentration and degree of labeling of both detection probes were calculated according to the manufacturer's protocols.

2.3.3. Assay Protocol

In the present study, 384-well plates (Sensoplate Plus, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) were functionalized with the Nab228 antibody (2.5 µg/mL in 0.1 M carbonate solution pH 8.4, 40 µL per well). After overnight incubation at 4 °C, plates were washed five times with Tris-buffered saline containing Tween (TBST, 1× TBS (Serva, Duisburg, Germany) and 0.05% Tween-20 (AppliChem)) and five times with 1× TBS and blocked with 0.5% bovine serum albumin (BSA, AppliChem) in 1× TBS containing 0.03% ProClin (Sigma-Aldrich,) for 1.5 h at RT. After washing the wells, as described above, 20 µL per well of SiNaPs (3.16-fold dilution, 10.26 pM–0.3 fM), assay controls, or IQC samples were applied in fourfold determination and incubated for 2 h at RT. For sample dilution, 1× PBS containing 0.05% Tween, 0.5% BSA, and 0.095% NaN_3 was used. Using the oligomeric IQC sample stock solution, a 3.16-fold dilution series ranging from 100 nM (IQC-15) to

0.01 pM (IQC-1) was used for validation studies, whereas, for the QC chart, 20 replicates of 316 pM (IQC-10), 31.6 pM (IQC-8), and 3.16 pM (IQC-6) were used. Wells were then washed five times with 1× TBS before adding 20 µL per well of the centrifuged (100,000× *g*, 4 °C, 1 h) detection antibodies mixture (IC16-CF633 + Nab228-CF488A, each at 0.625 µg/mL, in TBST + 0.1% BSA) for 1 h at RT. Lastly, wells were washed again, and the buffer was changed to 1× TBS with 0.03% ProClin. A microplate washer (405LS Microplate Washer, BioTek, Winnoski, VT, USA) was used for all washing steps.

2.3.4. Image Data Acquisition

The well surface was imaged in two different channels (channel 633: excitation 635 nm, emission filter 705/72 nm, exposure time 1000 ms, gain 1000; channel 488: excitation 488 nm, emission filter 525/36 nm, exposure time 1000 ms, gain 500) using TIRFM (Leica DMI6000B, Wetzlar, Germany). Twenty-five images per well with 1000 × 1000 pixels each were measured, representing 3.14% of the well surface.

2.4. Statistics

General statistical analyses were performed using Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA), and OriginPro (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) and matlab2019b (The MathWorks, Natick, MA, USA) were used for calculations and graphs. Data were further analyzed for normal distributions using the Shapiro–Wilk test; for non-normal distributions, a non-parametric test was used, i.e., the Mann–Whitney U test.

2.4.1. Analysis of Image Data

Images were analyzed using in-house developed software that features artefact filtering and an automated sFIDA readout calculation [7,8]. To reduce background noise, intensity cutoffs were defined as the signal intensity exceeding 0.05% of the total pixels of the individual channels of the used blank control (dilution buffer, BC). Lastly, the number of pixels that had intensities above the defined cutoff and were colocalized in both fluorescence channels was calculated as the sFIDA readout. sFIDAta calculated the sFIDA readout on the basis of the mean value, standard deviation, and coefficient of variation (CV%) for each sample and the respective replicates.

2.4.2. Calibration

For calibrating the received sFIDA readouts, a weighted linear regression analysis with respective weights calculated as one per readout was performed with matlab2019b (The MathWorks). Therefore, all data points of the SiNaP calibration curve that differed significantly from BC and were above the limit of detection (Section 2.4.1) were included. For all further analyses, only the calibrated sFIDA readouts were shown.

2.4.3. Analytical Validation: Detection and Quantification Limits

For the calculation of the limit of blank (LoB) and limit of detection (LoD), 24 BC samples were analyzed, and parameters were calculated according to Armbruster et al. [24] using Equations (1) and (2). Afterward, values were translated into particle concentrations using the calculated calibration curve.

$$\text{LoB} = \text{mean sFIDA reaodut}_{\text{BC}} + 1.645 \times \text{standard deviation}_{\text{BC}}. \quad (1)$$

$$\text{LoD} = \text{mean sFIDA readout}_{\text{BC}} + 2 \times \text{standard deviation}_{\text{BC}}. \quad (2)$$

Using the calibrated particle concentrations of the Aβ oligomer dilution series, the linear working range was defined by calculating the lower and the upper endpoint and the dilution linearity. Therefore, the concentrations that differed significantly from the next lower concentration were determined using the one-sided Mann–Whitney U test with a confidence interval of 5%. Before calculating dilution linearity, background correction was

performed by subtracting the BC value from each IQC sample value. Subsequently, the percentage dilution linearity of each dilution step was calculated using Equation (3).

$$\text{Dilution linearity}[\%] = \frac{\text{observed value}}{(\text{expected value}/\text{dilution factor})} \times 100\% \quad (3)$$

Within the working range, the mean dilution linearity should be 80–120%, and the coefficient of determination should be higher than 0.95 to be accepted. The CV% of the four replicates of the same sample within the same run was calculated to assess intra-assay variability (within-run precision).

2.4.4. Analytical Validation: Analytical Selectivity

The selectivity of sFIDA indicated by the percentage signal reduction (Equation (4)) was carried out by measuring the IQC-13 (10 nM monomer concentration) sample in different assay setups. Nonspecific binding to the blocking agent used was excluded by performing capture control, where the capture antibody was omitted. As an autofluorescence control, the assay was performed using only TBST + 0.1% BSA without detection probes. In addition, the cross-reactivity of anti-Tau antibodies against the produced Aβ oligomers was tested. To this end, the Tau12 antibody (mouse, monoclonal, aa6–18, Biolegend, San Diego, CA, USA) was conjugated with CF633 and CF488A according to the protocol in Section 2.3.2 and diluted in TBST + 0.1% BSA to 0.625 µg/mL. The insensitivity of sFIDA against monomeric Aβ species was evaluated by applying 10 nM of freshly diluted monomeric Aβ1–42. IQC-13 was spiked in bovine CSF to simulate matrix effects, and the sFIDA readouts, generated using 0.05% cutoff-based CSF-blank, were compared to an equal concentration in the dilution buffer.

$$\text{Signal reduction}[\%] = \left(1 - \frac{\text{observed readout assay control}}{\text{readout reference}}\right) \times 100\% \quad (4)$$

Furthermore, sFIDA readouts of the respective assay control were compared to the readouts of the standard assay setup using the one-sided Mann–Whitney U test with a confidence interval of 5%.

2.4.5. Establishment of QC-Tool

A Shewhart chart, the most widely used tool for IQC [18], was used to monitor the readouts of IQC-10, IQC-8, and IQC-6. The oligomeric IQC sample stock solution (Section 2.1) was serially diluted 20 times to corresponding monomer concentrations of 316 pM (IQC-10), 31.6 pM (IQC-8), and 3.16 pM (IQC-6) to simulate 20 observations of each IQC sample. Subsequently, each dilution underwent a fourfold sFIDA analysis, and the observed sFIDA readouts were calibrated into particle concentrations. Lastly, observed particle concentrations were plotted as absolute values against the number of analyses. Using the mean and the standard deviation of the 20 observations, the lower and upper control limits (LCL/UCL) and action limits (LAL/UAL), respectively, were calculated according to Equations (5)–(8) and were integrated into the control chart.

$$\text{LCL} = \text{mean} - 2 \times \text{standard deviation} \quad (5)$$

$$\text{UCL} = \text{mean} + 2 \times \text{standard deviation} \quad (6)$$

$$\text{LAL} = \text{mean} - 3 \times \text{standard deviation} \quad (7)$$

$$\text{UAL} = \text{mean} + 3 \times \text{standard deviation} \quad (8)$$

In general, values within the control limits are considered satisfactory. Even if values are located between control and action limits, they are still accepted if they do not affect more than 10% of the measured values. However, if one result of a sample occurs outside the action limit, or if nine consecutive results create a trend (decreasing or increasing) or lie on

one side of the central line, the operator's intervention becomes necessary [18,25]. Between-run precision was considered satisfactory when all results were unbiased, all results lay within the warning limits, and the mean CV% of the 20 replicates was below 20%.

3. Results

The aim of this study was to develop and characterize an IQC sample for oligomer-based diagnostic assays. The first part of the results describes the characterization of the IQC sample, which was prepared using the protocol established in Section 2.1. In the second part, we used the IQC sample in the sFIDA assay and determined several validation parameters. Lastly, application of the Shewhart chart to monitor IQC performance was demonstrated with three IQC samples.

3.1. Aβ Oligomer-Based IQC Sample Displays High Homogeneity

The size distribution and morphology of the Aβ oligomers were determined by AFM. The analysis showed that the oligomers were monodisperse and globular in shape (Figure 2a). In contrast, we observed no particles in the monomer control containing a 10-fold higher protein concentration. Size distribution analysis revealed that the median height of all 1300 oligomers was 2.67 nm, with a minimum size of 1.07 nm. Only 2% of the detected oligomers were ≥5 nm (Figure 2b).

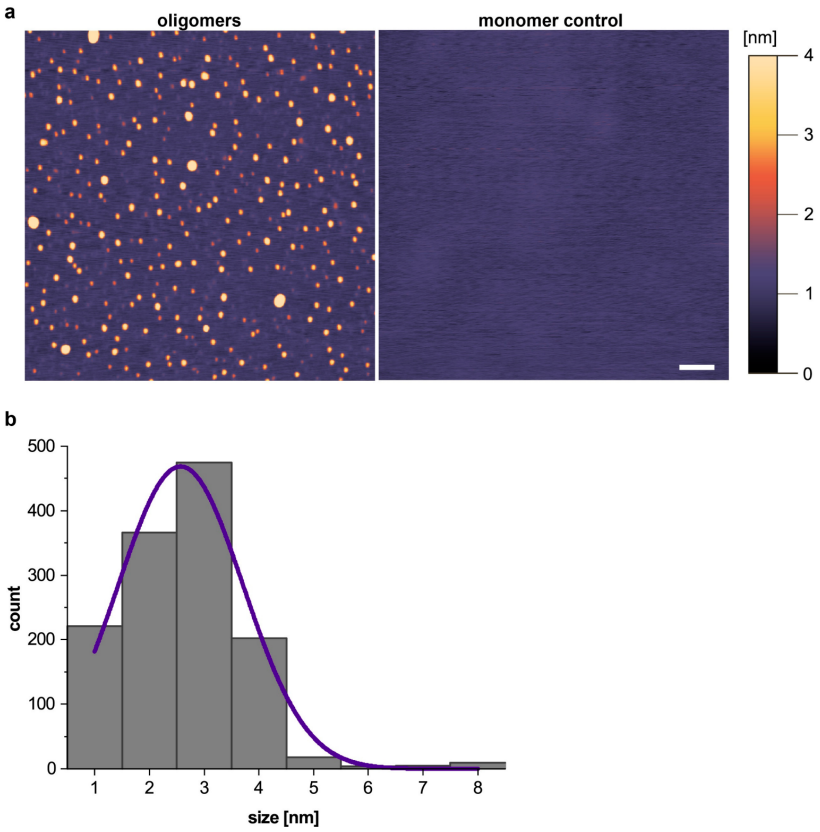


Figure 2. Analysis of the Aβ oligomers measured by AFM. (**a**) AFM images of the monomer control and Aβ oligomer samples. The color scale indicates the height profile. Scale bar = 200 nm. (**b**) Histogram showing the size distribution of 1300 oligomers. Abbreviations: Aβ, amyloid-β; AFM, atomic force microscopy.

3.2. Successful Application of the Aβ Oligomer-Based IQC Sample in the sFIDA Assay

The applicability of the prepared Aβ oligomers as an IQC sample for in vitro oligomer-based diagnostic methods using the sFIDA assay was investigated. We prepared a 3.16-fold concentration series of the oligomers in dilution buffer and subjected each sample to sFIDA analysis in quadruplicate determination. The molar concentrations represent monomer concentrations ranging from 0.01 pM (IQC-1) to 100 nM (IQC-15). Using the SiNaPs calibration curve ($y = 5.08x - 0.25$), we calculated the Aβ oligomer concentrations in each IQC sample from the sFIDA readouts. Individual sFIDA readouts and calibrated particle concentrations for each IQC sample are listed in Table S1.

Figure 3 illustrates the sFIDA IQC performance, which exhibits a 5 log dynamic range and an analytical sensitivity below the femtomolar level (LoB: 0.25 fM, LoD: 0.28 fM). The lower limit of quantification (LLoQ), upper limit of quantification (ULoQ), and acceptable dilution linearity (acceptance range of 80–120%, Section 2.4.1) defined the working range of the used IQC samples. Data were not normally distributed (p-value: 6.97×10^{-6}). Thus, the two quantification limits were identified using the one-sided Mann–Whitney U test with a confidence interval of 5% (Table S1) and were set to a particle concentration of 0.36 fM (IQC-3) and 197 pM (IQC-14). Within this range, a mean percentage dilution linearity of 107% was determined (Table S2). Interestingly, a coefficient of determination of 0.73 indicated that the dilution linearity could be improved. A closer inspection of the data indicated that the IQC-14 readout was an outlier with a similar readout to that of IQC-13. Removing IQC-14 from the fit yielded a coefficient of determination of 0.99. This refit resulted in a change in the percentage dilution linearity; however, the value of 109% was still acceptable. Furthermore, within this linear working range of 0.36 fM–196 pM, a mean CV% of 18.4% was determined, indicating acceptable intra-assay variance for single-particle analysis.

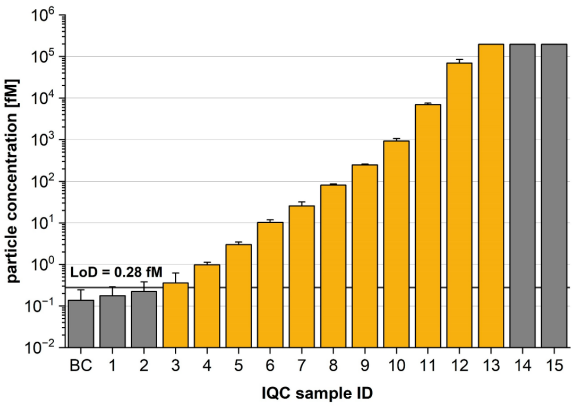


Figure 3. Molar particle concentration of internal quality control (IQC) samples and blank control (BC). On the basis of 24 replicates of the BC, the limit of detection (LoD) was calculated and translated into a particle concentration of 0.28 fM using the calibration curve. The linear working range (yellow) was identified by acceptable dilution linearity between the upper (196 pM) and lower (0.36 fM) limits of quantification. Note the logarithmic scale. Data are presented as the mean and standard deviation of four replicates.

3.3. sFIDA Features High Selectivity for the Aβ Oligomer-Based IQC Sample

Testing different assay controls confirmed that sFIDA is highly selective for aggregated Aβ species and robust against false-positive signals because of matrix interference and cross-reactivities. Figure 4a shows sFIDA readouts of IQC-13 applied on different assay setups. For all controls, a signal reduction of almost 100% was observed (Table S3a). Because data showed a non-normal distribution (Shapiro–Wilk test p-value: 2.53×10^{-4}), we applied the nonparametric one-sided Mann–Whitney U test with a confidence interval of 5% to

investigate differences between the sFIDA readouts of the respective assay control and the reference. For all controls, significantly lower sFIDA readouts were observed compared to the reference (for individual *p*-values, see Table S3). Aβ oligomers were only detected when captured on the assay surface via the anti-Aβ antibodies, whereas no detection was observed in the absence of the capture antibody. In addition, the capture control readout was significantly lower than the reference values (*p*-value: 0.0152). Moreover, false-positive signals generated by the autofluorescence of chemicals and buffers were not detected because the sFIDA readout of the autofluorescence control was significantly lower than the sFIDA readout of the reference, as indicated by the *p*-value of 0.0147. Using anti-Tau antibodies as the detection probe or monomers (Figure 4b, Table S3b) as the target yielded no false-positive signals caused by cross-reactivity. For both controls, significantly lower sFIDA readouts compared to the reference were observed (*p*-value of 0.0152).

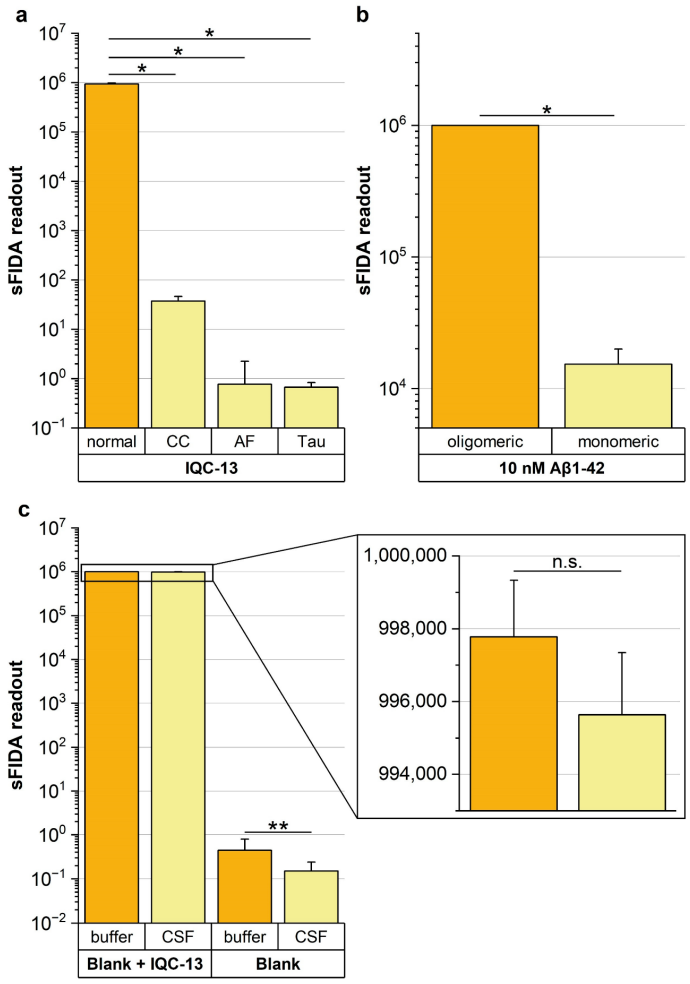


Figure 4. Comparison of sFIDA readout of IQC-13 applied on different assay setups. (**a**) sFIDA readouts of the normal assay setup were compared to assay setups without the capture antibody (capture control, CC), without Aβ-specific detection probes (TBST + 0.1% BSA without any detection probes, autofluorescence control, AF) or with Tau-specific detection probes (equimolar mixture of Tau12 antibodies labeled with CF633 and CF488A in TBST + 0.1% BSA, Tau). A signal reduction of almost 100% and significantly lower sFIDA readouts compared to the standard assay setup (normal,

p-values between 0.0152 and 0.0147) were observed for all controls. (**b**) In addition, equal molar concentrations of monomeric Aβ1–42 were applied on the assay surface to demonstrate that the assay is insensitive toward monomers. A signal reduction of nearly 99% and significantly lower sFIDA readouts compared to the standard assay setup were observed (*p*-value: 0.0152), showing that interference from monomeric Aβ can be excluded. (**c**) To evaluate the matrix effects of CSF, IQC-13 was spiked into bovine CSF, and sFIDA readouts were calculated on the basis of the background signal of the additionally applied bovine CSF-blank. For IQC-13, no significant difference in the sFIDA readouts was observed (*p*-value: 0.108), and only a slight signal reduction of 0.2% was observed. In contrast, the sFIDA readout of CSF-blank was significantly lower compared to the buffer control (*p*-value: 0.002, signal reduction: 67%). Note the logarithmic scale. Data are presented as the mean and standard deviation of four replicates. Significant differences between groups were calculated using the one-sided Mann–Whitney U test with a confidence interval of 5%. Significant differences are marked as follows: * $0.01 \leq p < 0.05$; ** $0.001 \leq p < 0.01$; n.s. not significant. Abbreviations: CSF, cerebrospinal fluid; IQC, internal quality control.

Furthermore, after spiking the Aβ oligomers in CSF, only negligible matrix effects were observed, with a minor signal reduction of 0.2% and no significant difference in the readouts (*p*-value: 0.108) (Figure 4c, Table S3c). In addition, matrix components in the CSF-blank reduced the background signal more efficiently than the dilution buffer, indicated by a signal reduction of approximately 67% and significantly lower readouts indicated by a *p*-value of 0.002 (CSF-blank vs. BC). Consequently, the signal-to-noise ratio between IQC-13 and the respective blank was three times higher in CSF than in the dilution buffer.

3.4. Shewhart Chart as a Reliable QC-Tool for Monitoring IQC Performance

Control charts are a valuable tool for monitoring assay performance and can be used by any laboratory [25]. In this work, we demonstrated the use of a Shewhart chart to monitor the performance of three IQC samples in sFIDA (for respective TIRFM images showing co-localized pixel above cutoff values, see Figure S2) by integrating values of 20 observations of each IQC sample into a separate chart (Table S4). Charts were then interpreted analogously to defined rules (Section 2.4.3).

All three IQC samples showed low inter-assay variability as the calculated mean CV% of the respective 20 observations was below 20% (IQC-6 = 16.2%, IQC-8 = 16.5%, IQC-10 = 17.6%). As illustrated in Figure 5, none of the IQC samples exceeded the action limit. In addition, neither IQC-6 nor IQC-8 exceeded the control limits, but one value of sample IQC-10 occurred between the control and action limit. Nonetheless, assay performance was considered acceptable within the predefined range because this was the only deviation. No ascending or descending trend of the nine consecutive observation points was seen in IQC samples. Even if no out-of-control situation could be determined in IQC samples, IQC-6 should be monitored further as a general downward progression became apparent. Moreover, an out-of-control situation may arise in the foreseeable future if the next three observation points of IQC-6 also occur between the central line and the lower control limit.

In particular, for those assays subjected to quality management, such as sFIDA technology, troubleshooting out-of-order situations can be monitored rapidly, as possible causes related to the operator, instruments, manufacturing protocols, and/or lot numbers of assay components are regularly documented.

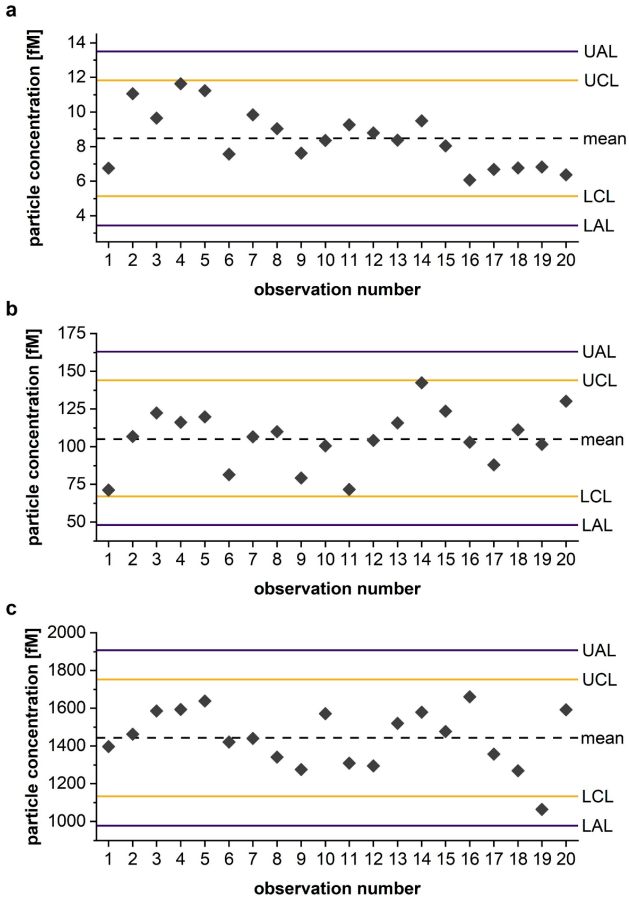


Figure 5. Shewhart chart monitoring the performance of IQC-6 (**a**), IQC-8 (**b**) and IQC-10 (**c**). The calibrated particle concentrations of 20 observations of each IQC sample (gray dots) were plotted to simulate assay performance in chronological order. Mean: central dashed line; upper and lower control limit (UCL, LCL): yellow line; upper and lower action limit (UAL, LAL): purple line. Data are presented as the mean of four replicates (gray data points). Abbreviation: IQC, internal quality control.

4. Discussion

In the present study, we developed a homogeneous and reproducible Aβ oligomer-based IQC sample for sFIDA and established a QC-tool for monitoring assay performance.

We characterized the formation of Aβ oligomers by AFM, which revealed globular-shaped oligomers with a median size of 2.67 nm, whereby AFM analysis revealed the size of a dried oligomer and not the hydrodynamic size. Oligomers are in thermodynamic equilibrium with monomers and larger aggregates, such as amyloid fibrils. In vitro produced oligomers have been shown to dissociate into monomers within a few hours, with only a small fraction of oligomers converting to fibrils [26]. Conversion to fibrils can be excluded herein because no fibrillary morphologies were detected by AFM. Noteworthily, the sFIDA assay currently does not discriminate oligomers from larger yet still soluble aggregates because of the diffraction limit of the optical detection system. However, as larger particles bind more fluorescent probes, a size determination of sub-resolution particles should be possible based on pixel intensity. For this purpose, the oligomers developed can serve as a size standard. In addition to established AD biomarkers, such as monomeric Aβ1–42, the ratio of Aβ1–42 to Aβ1–40, phosphorylated Tau, and total Tau in CSF, and magnetic

resonance imaging and positron emission tomography (PET), i.e., Amyloid-PET or Tau-PET [2,27,28], oligomeric forms of Aβ represent a promising biomarker candidate for early AD diagnosis [5,6,29]. Consequently, in vitro, oligomer-based diagnostics are the subject of current biomarker research.

We detected and quantified oligomers at sub-femtomolar concentrations, down to 0.28 fM (LoD), which qualifies the sFIDA assay for biofluid-based in vitro oligomer-based diagnostic methods [5]. We previously showed that Aβ oligomers and aggregates are detectable in human CSF samples [10] and complex matrices such as murine and human brain homogenate samples [9] using sFIDA. Due to further development of the assay protocol, including the use of synthetic Aβ oligomers shown herein, the analytical sensitivity was further improved compared to our previously published data [7]. The potential of this analytical sensitivity to improve diagnostic performance must be validated using a large set of clinical samples. In comparison to other oligomer-specific Aβ assays, sFIDA ensures single-particle sensitivity. Although a direct comparison of sensitivity among different assays is challenging because of variations in assay design, calibration standards, and detection limit calculations, we evaluated the sensitivity ranges of various assays (Table 1).

Table 1. Comparison of several Aβ oligomer quantification assays according to their sensitivity level. For this purpose, the respective weight concentrations pg/mL were converted into femtomolar oligomer concentrations using the approximate molecular weights of the used calibration standards.

Reference	Assay Setup	Calibration Standard	Sensitivity [fM]
sFIDA	Single-particle analysis with fluorescence microscopy, overlapping epitopes capture: Nab228 aa1–11 detection: IC16 aa2–8 + Nab228 aa1–11	Aβ1–15 SiNaPs	LoD = 0.28
Savage et al. [30]	Single particle analysis with bead-based assay capture: 19.3 oligomer-specific detection: 82E1 aa1–16	Aβ1–42 oligomers (MW 1117 kDa)	LoD = 0.08
IBL [31]	ELISA capture: 82E1 aa1–16 detection: 24B3 oligomer-specific	E22P–Aβ40 Dimer	31.4 (N/A)
Hölttä et al. [32]	ELISA, overlapping epitopes capture and detection: 82E1 aa1–16	Dimer Aβ1–11	LLoQ = 90.9
Kasai et al. [33]	ELISA, overlapping epitopes capture and detection: Ban50 aa1–10	MAP 16-mer (lysine core)	LoD = 190
Esparza et al. [34]	Single particle analysis with bead-based assay overlapping epitopes capture and detection: HJ3.4 aa1–13	Aβ1–40Ser26Cys dimer	LLoQ = 720

Only the assay described by Savage et al. (0.08 fM) [30] or the commercial ELISA assay from Immuno-Biological Laboratories Co. Ltd. (IBL, Fujioka, Japan) [31] (31.4 fM), which also claims to detect single particles, offers sensitivity in the low femtomolar range, which is presumably because of the combined use of N-terminal and oligomer-specific assay antibodies. In contrast, all listed homotypic assays, using the same antibody for capture and detection, showed insufficient sensitivity levels between 91 and 720 fM. However, because of epitope competition, these assays [32–34] and the sFIDA assay are insensitive toward monomers.

Through our experiments, we demonstrated that Aβ oligomer-based IQC samples are reproducible, homogeneous, and suitable in oligomer-based diagnostic methods such as sFIDA. However, as our studies were performed in an artificial sample matrix, further

validation data from authentic biological sample matrices such as the plasma or CSF should be obtained, including extensive recovery and parallelism studies [35]. In addition, the critical concentration at which endogenous components compromise the readout and lead to false-positive or false-negative results must be investigated. For sFIDA analysis of α-synuclein and Tau aggregates in CSF, we showed that blood contamination and HAMAs can affect the sFIDA readout [8]. In particular, for CSF, validation should be straightforward because we determined a signal loss of only 0.2% for IQC-15 due to matrix effects. The Aβ oligomer IQC can also facilitate the development of a blood-based sFIDA assay, which is currently in progress. However, the complex plasma matrix could make validation more challenging, as strong matrix effects such as interference between Aβ and human serum albumin or between circulating human antibodies with the assay antibodies are expected [6,15,36,37]. In addition to matrix effects, sample stability and sample tubing can also influence the measurement signal [38,39]. For future routine applications and regulatory approval of the sFIDA technology, the IQC sample should ideally be available as a ready-to-use kit component. Hence, the benchtop stability and long-term stability of the IQC sample should be investigated by testing different sample tubes, storage temperatures and durations, and the effects of repetitive freeze–thaw cycles [2,35,40].

5. Conclusions

Since protein misfolding and aggregation are pathological hallmarks for a variety of neurodegenerative diseases, it is necessary to establish additional IQC samples, e.g., based on Tau or α-synuclein oligomers that improve the routine application of oligomer-based diagnostic methods such as sFIDA. Transitioning from research use to in vitro diagnostics (IVD) has various regulatory requirements [11]. The Aβ oligomer-based IQC sample implemented represents an important step toward the standardization, routine application and ultimately, registration of sFIDA as a diagnostic tool of AD for the IVD market.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at https://www.mdpi.com/article/10.3390/diagnostics13101702/s1: Figure S1. Scheme of monomerization and oligomerization procedure; Figure S2. TIRFM-images of colocalized pixels of IQC-6, IQC-8, and IQC-10 samples with intensities above blank control-based cutoff; Table S1. Individual sFIDA readouts, calibrated molar particle concentrations, and CV% for each IQC sample; Table S2. Calculation of dilution linearity of Aβ oligomer-based IQC samples within working range; Table S3. Selectivity and recovery of the sFIDA assay to IQC-13; Table S4. Raw data used to generate Shewhart charts in Figure 5.

Author Contributions: Conceptualization, M.P., A.D. and O.B.; formal analysis, M.P., A.D. and F.R.; funding acquisition, D.W. and O.B.; investigation, M.P. and A.D.; methodology, M.P., A.D., L.B., T.B. and V.K.-S.; project administration, D.R., D.W. and O.B.; supervision, D.R., D.W. and O.B.; validation, M.P. and A.D.; writing—original draft, M.P. and A.D.; writing—review and editing, W.H., D.R., D.W. and O.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Helmholtz Association, grant number HVF0079.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the article and its Supplementary Materials.

Acknowledgments: The authors thank Volker Nischwitz (Central Institute for Engineering, Electronics and Analytics, Analytics (ZEA-3), Forschungszentrum Jülich, 52428, Jülich, Germany) for determining silicon concentrations in the Aβ1–15 SiNaPs using inductively coupled plasma mass spectrometry. The authors also thank Carsten Korth (Institute of Neuropathology, Universitätsklinikum Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany) for providing the IC16 antibody. Jürgen Rehage, Maike Heppelmann, and Ioannis Proios (University of Veterinary Medicine Hannover, 30559 Hannover, Germany) kindly provided the bovine CSF used for the spiking experiment. Lastly, the authors thank Andrew Dingley for proofreading the manuscript.

Conflicts of Interest: Dieter Willbold and Oliver Bannach are cofounders and shareholders of attyloid GmbH. Dieter Willbold and Detlev Riesner are members of attyloid's supervisory board. These factors did not influence the interpretation of the data. The remaining authors declare no conflicts of interest.

References

1. Brettschneider, J.; Del Tredici, K.; Lee, V.M.; Trojanowski, J.Q. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: A focus on human studies. *Nat. Rev. Neurosci.* **2015**, *16*, 109–120. [CrossRef] [PubMed]
2. Dulewicz, M.; Kulczyńska-Przybik, A.; Mroczko, P.; Kornhuber, J.; Lewczuk, P.; Mroczko, B. Biomarkers for the Diagnosis of Alzheimer's Disease in Clinical Practice: The Role of CSF Biomarkers during the Evolution of Diagnostic Criteria. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8598. [CrossRef] [PubMed]
3. Tolar, M.; Abushakra, S.; Sabbagh, M. The path forward in Alzheimer's disease therapeutics: Reevaluating the amyloid cascade hypothesis. *Alzheimers Dement.* **2020**, *16*, 1553–1560. [CrossRef] [PubMed]
4. Lotz, G.P.; Legleiter, J. The role of amyloidogenic protein oligomerization in neurodegenerative disease. *J. Mol. Med.* **2013**, *91*, 653–664. [CrossRef]
5. Kulenkampff, K.; Wolf Perez, A.-M.; Sormanni, P.; Habchi, J.; Vendruscolo, M. Quantifying misfolded protein oligomers as drug targets and biomarkers in Alzheimer and Parkinson diseases. *Nat. Rev. Chem.* **2021**, *5*, 277–294. [CrossRef]
6. Mroczko, B.; Groblewska, M.; Litman-Zawadzka, A.; Kornhuber, J.; Lewczuk, P. Amyloid β oligomers (AβOs) in Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.* **2018**, *125*, 177–191. [CrossRef]
7. Herrmann, Y.; Kulawik, A.; Kühbach, K.; Hülsemann, M.; Peters, L.; Bujnicki, T.; Kravchenko, K.; Linnartz, C.; Willbold, J.; Zafiu, C.; et al. sFIDA automation yields sub-femtomolar limit of detection for Aβ aggregates in body fluids. *Clin. Biochem.* **2017**, *50*, 244–247. [CrossRef]
8. Blömeke, L.; Pils, M.; Kraemer-Schulien, V.; Dybala, A.; Schaffrath, A.; Kulawik, A.; Rehn, F.; Cousin, A.; Nischwitz, V.; Willbold, J.; et al. Quantitative detection of α-Synuclein and Tau oligomers and other aggregates by digital single particle counting. *NPJ Parkinsons Dis.* **2022**, *8*, 68. [CrossRef]
9. Kass, B.; Schemmert, S.; Zafiu, C.; Pils, M.; Bannach, O.; Kutzsche, J.; Bujnicki, T.; Willbold, D. Aβ oligomer concentration in mouse and human brain and its drug-induced reduction ex vivo. *Cell. Rep. Med.* **2022**, *3*, 100630. [CrossRef]
10. Wang-Dietrich, L.; Funke, S.A.; Kühbach, K.; Wang, K.; Besmehn, A.; Willbold, S.; Cinar, Y.; Bannach, O.; Birkmann, E.; Willbold, D. The amyloid-β oligomer count in cerebrospinal fluid is a biomarker for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **2013**, *34*, 985–994. [CrossRef]
11. Kulawik, A.; Heise, H.; Zafiu, C.; Willbold, D.; Bannach, O. Advancements of the sFIDA method for oligomer-based diagnostics of neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* **2018**, *592*, 516–534. [CrossRef] [PubMed]
12. Schaffrath, A.; Schleyken, S.; Seger, A.; Jergas, H.; Özdüzenciler, P.; Pils, M.; Blömeke, L.; Cousin, A.; Willbold, J.; Bujnicki, T.; et al. Patients with isolated REM-sleep behavior disorder have elevated levels of alpha-synuclein aggregates in stool. *NPJ Parkinsons Dis.* **2023**, *9*, 14. [CrossRef] [PubMed]
13. Hülsemann, M.; Zafiu, C.; Kühbach, K.; Lühmann, N.; Herrmann, Y.; Peters, L.; Linnartz, C.; Willbold, J.; Kravchenko, K.; Kulawik, A.; et al. Biofunctionalized Silica Nanoparticles: Standards in Amyloid-β Oligomer-Based Diagnosis of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2016**, *54*, 79–88. [CrossRef] [PubMed]
14. Zielinski, M.; Röder, C.; Schröder, G.F. Challenges in sample preparation and structure determination of amyloids by cryo-EM. *J. Biol. Chem.* **2021**, *297*, 100938. [CrossRef] [PubMed]
15. Vanderstichele, H.; Stoops, E.; Vanmechelen, E.; Jeromin, A. Potential sources of interference on Abeta immunoassays in biological samples. *Alzheimers Res. Ther.* **2012**, *4*, 39. [CrossRef]
16. Blacksell, S.D.; Cameron, A.R.; Chamnanpood, C.; Chamnanpood, P.; Tatong, D.; Monpolsiri, M.; Westbury, H.A. Implementation of internal laboratory quality control procedures for the monitoring of ELISA performance at a regional veterinary laboratory. *Vet. Microbiol.* **1996**, *51*, 1–9. [CrossRef]
17. Sturgeon, C.M. Chapter 6.2—Quality Assurance. In *The Immunoassay Handbook*, 4th ed.; Wild, D., Ed.; Elsevier: Oxford, UK, 2013; pp. 441–454.
18. Lock, R.J. My approach to internal quality control in a clinical immunology laboratory. *J. Clin. Pathol.* **2006**, *59*, 681–684. [CrossRef]
19. Ryan, D.A.; Narrow, W.C.; Federoff, H.J.; Bowers, W.J. An improved method for generating consistent soluble amyloid-beta oligomer preparations for in vitro neurotoxicity studies. *J. Neurosci. Methods* **2010**, *190*, 171–179. [CrossRef]
20. Kotler, S.A.; Ramamoorthy, A. Preparation of Stable Amyloid-β Oligomers Without Perturbative Methods. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1777*, 331–338. [CrossRef]
21. Stine, W.B.; Jungbauer, L.; Yu, C.; LaDu, M.J. Preparing synthetic Aβ in different aggregation states. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *670*, 13–32. [CrossRef]
22. Brener, O.; Dunkelmann, T.; Gremer, L.; van Groen, T.; Mirecka, E.A.; Kadish, I.; Willuweit, A.; Kutzsche, J.; Jürgens, D.; Rudolph, S.; et al. QIAD assay for quantitating a compound's efficacy in elimination of toxic Aβ oligomers. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13222. [CrossRef]
23. Novo, M.; Freire, S.; Al-Soufi, W. Critical aggregation concentration for the formation of early Amyloid-β(1–42) oligomers. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1783. [CrossRef] [PubMed]

24. Armbruster, D.A.; Pry, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin. Biochem. Rev.* **2008**, *29* (Suppl. S1), S49–S52. [PubMed]
25. Reichenbächer, M.; Einax, J.W. *Challenges in Analytical Quality Assurance*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2011.
26. Michaels, T.C.T.; Šarić, A.; Curk, S.; Bernfur, K.; Arosio, P.; Meisl, G.; Dear, A.J.; Cohen, S.I.A.; Dobson, C.M.; Vendruscolo, M.; et al. Dynamics of oligomer populations formed during the aggregation of Alzheimer's Aβ42 peptide. *Nat. Chem.* **2020**, *12*, 445–451. [CrossRef] [PubMed]
27. Jack, C.R., Jr.; Bennett, D.A.; Blennow, K.; Carrillo, M.C.; Dunn, B.; Haeberlein, S.B.; Holtzman, D.M.; Jagust, W.; Jessen, F.; Karlawish, J.; et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **2018**, *14*, 535–562. [CrossRef] [PubMed]
28. Lewczuk, P.; Łukaszewicz-Zając, M.; Mroczko, P.; Kornhuber, J. Clinical significance of fluid biomarkers in Alzheimer's Disease. *Pharmacol. Rep.* **2020**, *72*, 528–542. [CrossRef]
29. Shea, D.; Colasurdo, E.; Smith, A.; Paschall, C.; Jayadev, S.; Keene, C.D.; Galasko, D.; Ko, A.; Li, G.; Peskind, E.; et al. SOBA: Development and testing of a soluble oligomer binding assay for detection of amyloidogenic toxic oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2022**, *119*, e2213157119. [CrossRef]
30. Savage, M.J.; Kalinina, J.; Wolfe, A.; Tugusheva, K.; Korn, R.; Cash-Mason, T.; Maxwell, J.W.; Hatcher, N.G.; Haugabook, S.J.; Wu, G.; et al. A sensitive aβ oligomer assay discriminates Alzheimer's and aged control cerebrospinal fluid. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 2884–2897. [CrossRef]
31. IBL-International. Human Amyloid β Toxic Oligomer Assay Kit—IBL. Instruction for Use Code No. 27709. Available online: https://www.ibl-japan.co.jp/files/topics/4751_ext_02_en_0.pdf (accessed on 29 March 2023).
32. Hölttä, M.; Hansson, O.; Andreasson, U.; Hertze, J.; Minthon, L.; Nägga, K.; Andreasen, N.; Zetterberg, H.; Blennow, K. Evaluating amyloid-β oligomers in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e66381. [CrossRef]
33. Kasai, T.; Tokuda, T.; Taylor, M.; Nakagawa, M.; Allsop, D. Utilization of a multiple antigenic peptide as a calibration standard in the BAN50 single antibody sandwich ELISA for Aβ oligomers. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **2012**, *422*, 375–380. [CrossRef]
34. Esparza, T.J.; Zhao, H.; Cirrito, J.R.; Cairns, N.J.; Bateman, R.J.; Holtzman, D.M.; Brody, D.L. Amyloid-β oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. *Ann. Neurol.* **2013**, *73*, 104–119. [CrossRef] [PubMed]
35. Andreasson, U.; Perret-Liaudet, A.; van Waalwijk van Doorn, L.J.; Blennow, K.; Chiasserini, D.; Engelborghs, S.; Fladby, T.; Genc, S.; Kruse, N.; Kuiperij, H.B.; et al. A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. *Front. Neurol.* **2015**, *6*, 179. [CrossRef] [PubMed]
36. Kuo, Y.M.; Kokjohn, T.A.; Kalback, W.; Luehrs, D.; Galasko, D.R.; Chevallier, N.; Koo, E.H.; Emmerling, M.R.; Roher, A.E. Amyloid-beta peptides interact with plasma proteins and erythrocytes: Implications for their quantitation in plasma. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **2000**, *268*, 750–756. [CrossRef] [PubMed]
37. Sehlin, D.; Söllvander, S.; Paulie, S.; Brundin, R.; Ingelsson, M.; Lannfelt, L.; Pettersson, F.E.; Englund, H. Interference from heterophilic antibodies in amyloid-β oligomer ELISAs. *J. Alzheimers Dis.* **2010**, *21*, 1295–1301. [CrossRef] [PubMed]
38. Vanderstichele, H.M.; Janelidze, S.; Demeyer, L.; Coart, E.; Stoops, E.; Herbst, V.; Mauroo, K.; Brix, B.; Hansson, O. Optimized Standard Operating Procedures for the Analysis of Cerebrospinal Fluid Aβ42 and the Ratios of Aβ Isoforms Using Low Protein Binding Tubes. *J. Alzheimers Dis.* **2016**, *53*, 1121–1132. [CrossRef]
39. Schoonenboom, N.S.; Mulder, C.; Vanderstichele, H.; Van Elk, E.J.; Kok, A.; Van Kamp, G.J.; Scheltens, P.; Blankenstein, M.A. Effects of processing and storage conditions on amyloid β(1–42) and tau concentrations in cerebrospinal fluid: Implications for use in clinical practice. *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 189–195. [CrossRef]
40. van de Merbel, N.; Savoie, N.; Yadav, M.; Ohtsu, Y.; White, J.; Riccio, M.F.; Dong, K.; de Vries, R.; Diancin, J. Stability: Recommendation for best practices and harmonization from the Global Bioanalysis Consortium Harmonization Team. *Aaps J.* **2014**, *16*, 392–399. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4.2 Quantifizierung von Aβ-Oligomeren in humanen Liquorproben

Aβ oligomers peak in early stages of Alzheimer's disease preceding Tau pathology

Autoren	Lara Blömeke*, Fabian Rehn*, Victoria Kraemer-Schulien*, Janine Kutzsche, **Marlene Pils**, Tuyen Bujnicki, Piotr Lewczuk, Silka D. Freiesleben, Luisa-Sophie Schneider, Lukas Preis, Josef Priller, Eike J. Spruth, Slawek Altenstein, Andrea Lohse, Anja Schneider, Klaus Fliessbach, Jens Wiltfang, Niels Hansen, Ayda Rostamzadeh, Emrah Düzel, Wenzel Glanz, Enise I. Incesoy, Michael Butryn, Katharina Buerger, Daniel Janowitz, Michael Ewers, Robert Perneczky, Boris-Stephan Rauchmann, Stefan Teipel, Ingo Kilimann, Doreen Goerss, Christoph Laske, Matthias H. Munk, Carolin Sanzenbacher, Annika Spottke, Nina Roy-Kluth, Michael T. Heneka, Frederic Brosseron, Michael Wagner, Steffen Wolfsgruber, Luca Kleineidam, Melina Stark, Matthias Schmid, Frank Jessen, Oliver Bannach, Dieter Willbold, Oliver Peters * Autoren sind gleichberechtigt
Publiziert in	**Alzheimers Dement (Amst). 2024 Apr 25;16(2):e12589 (Mai 2023)** Impact-Faktor: 5,3 (2021) DOI: https://doi.org/10.1002/dad2.12589
Beitrag	**Eigener Anteil 15%** ▪ Weiterentwicklung und Validierung der sFIDA-Technologie für den Nachweis von Aβ- und Tau-Oligomeren ▪ Beteiligung bei Studiendurchführung ▪ Diskussion der Ergebnisse ▪ Beteiligung beim Schreiben des Manuskripts
Druckgenehmigung	Siehe Anhang 23

Received: 19 December 2023 | Revised: 11 March 2024 | Accepted: 15 March 2024

DOI: 10.1002/dad2.12589

Alzheimer's & Dementia
Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring

RESEARCH ARTICLE

Aβ oligomers peak in early stages of Alzheimer's disease preceding tau pathology

Lara Blömeke[1,2,3] | Fabian Rehn[1,2,3] | Victoria Kraemer-Schulien[1] | Janine Kutzsche[1] | Marlene Pils[1,2,3] | Tuyen Bujnicki[1] | Piotr Lewczuk[4] | Johannes Kornhuber[4] | Silka D. Freiesleben[5,6] | Luisa-Sophie Schneider[5] | Lukas Preis[5] | Josef Priller[5,6,7,8] | Eike J. Spruth[5,6] | Slawek Altenstein[5,6] | Andrea Lohse[5] | Anja Schneider[9,10] | Klaus Fliessbach[9,10] | Jens Wiltfang[11,12,13] | Niels Hansen[12] | Ayda Rostamzadeh[14] | Emrah Düzel[15,16] | Wenzel Glanz[15] | Enise I. Incesoy[15,16,17] | Michaela Butryn[15] | Katharina Buerger[18,19] | Daniel Janowitz[19] | Michael Ewers[18,19] | Robert Perneczky[18,20,21,22] | Boris-Stephan Rauchmann[20,23,24] | Stefan Teipel[25,26] | Ingo Kilimann[25,26] | Doreen Goerss[25,26] | Christoph Laske[27,28] | Matthias H. Munk[27,29] | Carolin Sanzenbacher[27] | Annika Spottke[9,30] | Nina Roy-Kluth[9] | Michael T. Heneka[31] | Frederic Brosseron[9] | Michael Wagner[9,10] | Steffen Wolfsgruber[9,10] | Luca Kleineidam[9,10] | Melina Stark[10] | Matthias Schmid[9,32] | Frank Jessen[9,14,33] | Oliver Bannach[1,2] | Dieter Willbold[1,2,3] | Oliver Peters[5,6]

[1]Institute of Biological Information Processing (Structural Biochemistry: IBI-7), Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, Germany

[2]attyloid GmbH, Düsseldorf, Germany

[3]Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

[4]Department of Psychiatry and Psychotherapy, Universitätsklinikum Erlangen and Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

[5]Department of Psychiatry and Psychotherapy, Charité, Berlin, Germany

[6]German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Berlin, Germany

[7]School of Medicine, Department of Psychiatry and Psychotherapy, Technical University of Munich, Munich, Germany

[8]University of Edinburgh and UK DRI, Edinburgh, UK

[9]German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Bonn, Germany

[10]Department of Neurodegenerative Disease and Geriatric Psychiatry/Psychiatry, University of Bonn Medical Center, Bonn, Germany

[11]German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Göttingen, Germany

[12]Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Center Göttingen, University of Göttingen, Göttingen, Germany

[13]Department of Medical Sciences, Neurosciences and Signaling Group, Institute of Biomedicine (iBiMED), University of Aveiro, Aveiro, Portugal

[14]Department of Psychiatry, Medical Faculty, University of Cologne, Cologne, Germany

[15]German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Magdeburg, Germany

[16]Institute of Cognitive Neurology and Dementia Research (IKND), Otto-von-Guericke University, Magdeburg, Germany

[17]Department for Psychiatry and Psychotherapy, University Clinic Magdeburg, Magdeburg, Germany

[18]German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE, Munich), Munich, Germany

Lara Blömeke, Fabian Rehn, and Victoria Kraemer-Schulien contributed equally to this study.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.
© 2024 The Authors. Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring published by Wiley Periodicals LLC on behalf of Alzheimer's Association.

[19]Institute for Stroke and Dementia Research (ISD), University Hospital, LMU Munich, Munich, Germany

[20]Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Hospital, LMU Munich, Munich, Germany

[21]Munich Cluster for Systems Neurology (SyNergy) Munich, Munich, Germany

[22]Ageing Epidemiology Research Unit (AGE), School of Public Health, Imperial College London, London, UK

[23]Sheffield Institute for Translational Neuroscience (SITraN), University of Sheffield, Sheffield, UK

[24]Department of Neuroradiology, University Hospital LMU, Munich, Germany

[25]German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Rostock, Germany

[26]Department of Psychosomatic Medicine, Rostock University Medical Center, Rostock, Germany

[27]German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Tübingen, Germany

[28]Section for Dementia Research, Hertie Institute for Clinical Brain Research and Department of Psychiatry and Psychotherapy, University of Tübingen, Tübingen, Germany

[29]Department of Psychiatry and Psychotherapy, University of Tübingen, Tübingen, Germany

[30]Department of Neurology, University of Bonn, Bonn, Germany

[31]Luxembourg Centre for Systems Biomedicine (LCSB), University of Luxembourg, Belvaux, Luxemburg

[32]Institute for Medical Biometry, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

[33]Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD), University of Cologne, Köln, Germany

Correspondence
Oliver Peters, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie CBF, Hindenburgdamm 30, 12203 Berlin, Germany.
Email: oliver.peters@charite.de

Oliver Bannach, attyloid GmbH, Merowingerplatz 1a, 40225 Düsseldorf, Germany.
Email: o.bannach@attyloid.com

Dieter Willbold, Institute of Biological Information Processing (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, Wilhelm-Johnen-Straße, 52428 Jülich, Germany.
Email: d.willbold@fz-juelich.de

Funding information
"Biomarkers Across Neurodegenerative Diseases I + II" of The Alzheimer's Association; Alzheimer's Research UK and the Weston Brain Institute, Grant/Award Numbers: 11084, BAND-19-614337; The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research, Grant/Award Numbers: 14977, 009889; ALS Association, Grant/Award Number: 19-SI-476; Packard Center, Grant/Award Number: 19-SI-476; Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant/Award Numbers: INST 208/616-1 FUGG, INST 208/794-1 FUGG; Helmholtz Association, Grant/Award Number: HVF0079

Abstract

INTRODUCTION: Soluble amyloid beta (Aβ) oligomers have been suggested as initiating Aβ related neuropathologic change in Alzheimer's disease (AD) but their quantitative distribution and chronological sequence within the AD continuum remain unclear.

METHODS: A total of 526 participants in early clinical stages of AD and controls from a longitudinal cohort were neurobiologically classified for amyloid and tau pathology applying the AT(N) system. Aβ and tau oligomers in the quantified cerebrospinal fluid (CSF) were measured using surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) technology.

RESULTS: Across groups, highest Aβ oligomer levels were found in A+ with subjective cognitive decline and mild cognitive impairment. Aβ oligomers were significantly higher in A+T− compared to A−T− and A+T+. *APOE* ε4 allele carriers showed significantly higher Aβ oligomer levels. No differences in tau oligomers were detected.

DISCUSSION: The accumulation of Aβ oligomers in the CSF peaks early within the AD continuum, preceding tau pathology. Disease-modifying treatments targeting Aβ oligomers might have the highest therapeutic effect in these disease stages.

KEYWORDS
Alzheimer's disease, *APOE*, AT(N) classification, Aβ, cerebrospinal fluid, oligomers, preclinical, prodromal, sFIDA, tau

Highlights

- Using surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) technology, we quantified Aβ oligomers in cerebrospinal fluid (CSF) samples of the DZNE-Longitudinal Cognitive Impairment and Dementia (DELCODE) cohort
- Aβ oligomers were significantly elevated in mild cognitive impairment (MCI)
- Amyloid-positive subjects in the subjective cognitive decline (SCD) group increased compared to the amyloid-negative control group

- Interestingly, levels of Aβ oligomers decrease at advanced stages of the disease (A+T+), which might be explained by altered clearing mechanisms

1 | BACKGROUND

Alzheimer's disease (AD) is a neuropathological disorder accompanied by abnormal protein deposits such as amyloid plaques and neurofibrillary tangles (NFTs)[1] which may occur up to 20 years before the onset of clinical symptoms.[2,3]

Soluble amyloid beta (Aβ) oligomers are neuro- and synaptotoxic Aβ aggregates implicated in triggering AD-related Aβ pathology that are derived from the sequential cleavage of the transmembrane amyloid precursor protein (APP).[4,5] A growing body of research indicates that deficient clearing mechanisms prevent Aβ oligomer degradation and facilitate the accumulation of Aβ species into insoluble plaques.[4,6–9] Furthermore, the formation of toxic Aβ oligomers and fibrils in the cerebrospinal fluid (CSF) has been associated with a decreased ratio of Aβ42/Aβ40, and an increased amyloid plaque burden as measured by positron emission tomography (PET).[10,11] Thus, increased Aβ oligomer levels and increasing Aβ plaque burden might act as a surrogate marker for deficient Aβ monomer clearance. Furthermore, in a series of experiments that included human brain autopsy and rat models, tau pathology measured by phosphorylated tau (pTau) in the CSF or by PET was found to act downstream of synaptic Aβ oligomer accumulation.[12] Consequently, examining potential differences in Aβ oligomer concentrations in different biomarker profiles across the AD spectrum might help identify individuals in the earliest stages of AD, thereby allowing to identify a unique window of opportunity for effective therapeutic intervention.[13] Yet, little is known how the levels of Aβ oligomers in the CSF correlate with the stages of AD, or whether they could serve as reliable biomarkers for disease progression.[14] In order to investigate the role of Aβ oligomer concentrations, the National Institute on Aging and the Alzheimer's Association (NIA-AA) research framework provide a unified biological definition of Alzheimer's disease, capable of identifying early pathological changes and biomarker interactions related to the disease.[1,15]

According to the NIA-AA research framework, individuals can be placed on the Alzheimer continuum once pathological Aβ aggregation (ie, A+) arises, regardless of their cognitive status.[1,15] In the revised NIA-AA research framework, six symptom stages of AD are defined,[16] with stages 1 and 2 characterizing individuals with preclinical AD that are cognitively unimpaired (CU).[15,16] In stage 1, experiencing subjective cognitive decline (SCD) has to be absent, whereas individuals can experience SCD or newly acquired neurobehavioral symptoms in stage 2.[16] Stages 3, 4, 5, and 6 correspond to mild cognitive impairment (MCI), and mild, moderate and severe AD dementia, respectively. Although the revised research framework is closely linked to the AT(N) (A, amyloid; T, tau; N, neurodegeneration) classification system for AD biomarkers, the presence of pTau pathology (ie, T+) is not essential to be placed on the AD continuum, as pTau pathology has been suggested to be a downstream event of amyloid pathology, and may therefore arise at later disease stages.[1] Consequently, individuals on the AD continuum can have varying biomarker profiles (eg, A+T− or A+T+), where A+T− indicates early pathologic change, whereas full-blown AD pathology (ie, the presence of both pathological amyloid and pTau deposition; A+T+) might occur at a later time[1].

Accordingly, the present study aims to elucidate the role of CSF Aβ and tau oligomers in individuals along the AD continuum stratified for different biomarker profiles (ie, A−T−, A−T+, A+T−, and A+T+), assuming that these different cross-sectional profiles reflect the temporal evolution of AD, with subjects being in one of these biological disease stages. Using surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA), a platform technology for the quantitation of protein aggregates in biofluids,[17–21] we specifically aimed to investigate whether oligomer titers differ between biomarker profiles, and whether there is an association between amyloid positivity (ie, A+), oligomer concentrations, and diagnostic status. Lastly, as carrying the ε4 allele of the apolipoprotein E (*APOE*) gene is the most important genetic risk factor in sporadic AD,[22] we examined whether the concentrations of Aβ and tau oligomers are increased in *APOE* ε4 carriers.

2 | METHODS

2.1 | Samples and design

In the present study, demographic and clinical information and CSF baseline samples from 526 participants of the DZNE-Longitudinal Cognitive Impairment and Dementia (DELCODE) study[23] were included. Details on the overall DELCODE study design, definition of patient groups including criteria for patient enrollment, and execution of cognitive, neuropsychological tests as well as biomaterial sampling, *APOE*-genotyping, PET, magnetic resonance imaging (MRI) and CSF biomarker assessment are described in Jessen et al.[23] All participants provided their written informed consent. Only participants with a minimum of 18 points on the Mini-Mental State Examination (MMSE) qualified for the AD group in the DELCODE study.[23] In short, participants were recruited from 10 memory clinics throughout Germany and allocated to 5 participant groups, that is, the cognitively unimpaired control (C) group, SCD, MCI, mild AD dementia, and healthy first-degree relatives of AD patients (REL). To increase the number of controls in the present study, the REL were integrated into the control group. In order to classify participants according to the AT(N) classification system, we used cutoffs established within the DELCODE cohort, that is, Aβ42 ≤ 638.7 pg/mL, total tau (tTau) > 510.9 pg/mL,

and pTau ≥ 73.65 pg/mL.[24] CSF samples were stored at −80°C and did not undergo a freeze-thaw cycle. All 526 samples were blinded at the timepoint of sFIDA measurement.

2.2 | Oligomer measurement using sFIDA

We previously developed sFIDA to specifically and sensitively measure protein oligomers and aggregates in biofluids.[17–19] sFIDA uses a sandwich-like biochemistry employing the same capture and detection antibodies with linear epitopes to reliably measure the whole fraction of Aβ or tau oligomers and larger, but still soluble, aggregates even in the presence of excessive monomers. Due to the use of fluorescence microscopy and sophisticated image analysis, sFIDA yields single particle sensitivity.

2.3 | Synthesis of protein conjugated silica nanoparticles

For assay development and as assay control we used our previously developed silica nanoparticle (SiNaP) standard standard.[25,26] Aβ SiNaPs were coated with amino acids 1—15 of the Aβ protein (peptides and elephants, Henningsdorf, Germany) as described in Blömeke et al.[19] Shortly, SiNaPs were synthetized using the Stöber process and afterwards aminated using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).[25,26] In the next step, activated maleimidohexanoic acid (MIHA, abcr GmbH, Karlsruhe, Germany) was allowed to react covalently with the amines. Finally, Aβ1—15 functionalized with cysteamine at the C-terminus was added to react with the maleimide groups of the particles.

Tau SiNaPs were coated with full-length tau protein (2N4R). Here, we used a different approach which was previously described in Hülsemann et al.[25] In this approach, synthesized and aminated SiNaPs were further functionalized with succinic anhydride (Sigma-Aldrich). To enable reaction, the pellet of aminated SiNaPs was redispersed in 0.1 M succinic acid anhydride in N,N-dimethylformamide anhydrous (DMF) and incubated for 2 hours at 70°C and afterwards for 2 days at room temperature (RT) when stirring. The carboxylated SiNaPs were washed three times with ddH_2O by centrifugation (7 minutes at 10,000 × *g*) and redispersion. For biofunctionalization, carboxylated SiNaPs were activated with 20 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC; Sigma-Aldrich) and 5 mM N-hydroxysuccinimide (NHS; Sigma-Aldrich) in a buffer of 0.1 M 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid (MES; Carl Roth, Karlsruhe, Germany) while shaking for 1 hour at RT. After two washing steps (centrifugation at 18,200 × *g* for 10 minutes) and redispersion in phosphate-buffered saline (PBS), full-length tau protein was added. The next day, biofunctionalized SiNaPs were washed twice with ddH_2O as described before.

SiNaPs were characterized based on particle size and shape as previously described.[19,25] Size and shape of the particles were determined using transmission electron microscopy while concentrations were determined using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS).

RESEARCH IN CONTEXT

1. **Systematic review**: Aβ oligomers are the most toxic Aβ species. They disrupt synaptic communication and may thereby initiate neurodegeneration in Alzheimer's disease (AD). In order to elucidate the temporal order of amyloid (A) and tau (T) pathology along the AD continuum, we quantified cerebrospinal fluid (CSF) Aβ and tau oligomers in different disease stages.
2. **Interpretation**: CSF Aβ oligomers were significantly higher in participants with subjective cognitive decline (stage 2) and mild cognitive impairment (stage 3) classified as A+. Interestingly, A+T+ showed comparably lower Aβ oligomer levels, which might be due to increased binding to amyloid plaques over time.
3. **Future directions**: Further research examining the underlying mechanisms of the rise and fall of Aβ oligomers along the AD continuum is needed.

2.4 | Labeling of antibodies

To detect oligomers in samples, we labeled the antibodies Nab228 (Sigma-Aldrich) and Tau12 (BioLegend, San Diego, CA, USA) with the fluorescent dyes CF633 (Sigma-Aldrich) and CF488A (Sigma-Aldrich) according to manufacturer's protocol. The principle of reaction, the purification, and the determination of concentration and degree of labeling were previously described.[19]

2.5 | Assay protocol

The biochemical principle of sFIDA has been reported elsewhere.[27,28] In the present study, we used Nunc MicroWell 384-well plates for each experiment (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) functionalized with N-terminal monoclonal antibodies Nab228 (Sigma-Aldrich) and Tau12 (BioLegend) at a concentration of 2.5 µg/mL in 0.1 M NaHCO3. After overnight incubation at 4°C, we washed the plates five times with 80 µL tris-buffered saline (TBS)-T (1×TBS; Serva Electrophoresis, Duisburg, Germany) containing 0.05% Tween20 (AppliChem, Darmstadt, Germany) and afterwards five times with TBS (405 LS Microplate Washer, BioTek, VT, USA). To block remaining binding sides of the glass surface, 1% bovine serum albumin (BSA; AppliChem) in TBS with 0.03% ProClin (Sigma-Aldrich) were incubated for 1.5 h at RT. After washing five times with TBS-T and TBS as described above, we diluted a mix of Aβ and tau SiNaPs in PBS (Sigma-Aldrich) containing 0.5% BSA and 0.05% Tween (dilution factor 1:2) and applied 20 µL of each dilution and 20 µL of undiluted samples to the plate. The plate was incubated for 2 hours at RT and thereafter washed five times with TBS. Then 20 µL of fluorescent detection antibodies Nab228 CF633 (0.156 µg/mL) and Tau12 CF488A

(0.312 µg/mL) diluted in TBS were applied and incubated for 1 hour at RT. Finally, the plate was washed five times with TBS and the buffer was exchanged against TBS-ProClin. In order to obtain a sufficient number of replicates, each dilution and all samples were applied in a quadruple determination.

2.6 | Image data acquisition

For imaging of the assay surface, we used total internal reflection microscopy (TIRF-M; Leica, Wetzlar, Germany)[27] (excitation: 635 nm, emission filter: 705/22 nm; excitation: 488 nm, emission filter: 525/36 nm; exposure time: 1500 ms; gain: 800). In total, 25 images per well were measured with 1000 × 1000 pixels each.

2.7 | Quantification and statistical analyses

Quantification and general statistical analyses were carried out using Python 3.9.7 (Python software foundation, Wilmington, USA; packages: scipy version 1.7.3) and Origin 2020 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). Data were further analyzed for normal distribution and in the case of not normally distributed data, nonparametric tests, for example, Spearman correlation or Mann–Whitney *U*-test, were used for further analyses.

2.8 | Image data analysis

For analysis of the images, the in-house developed software tool sFIDAta was used including the detection and elimination of artefact-containing images.[26,27] The analysis itself is based on the number of pixels above a defined cutoff value, which is defined as the pixel count. The cutoff is defined as the grayscale value at which the blank control exceeds a number of 100 pixels (0.01% of total pixels). The cutoff value is determined for each experiment individually. Moreover, 10% of images per well with the highest and lowest pixel counts were excluded from analysis to ensure that no artificial images influence the readouts.[28,29] Given pixel counts were calculated as the mean of the four sample wells.

2.9 | Analytical validation

To assess intra-assay variability of SiNaPs and samples, the coefficient of variation (CV) percentage of the four test replicates within the same run was calculated (Table S1). Furthermore, analytical selectivity of the assay was investigated applying different assay control setups as described previously.[18,19,30] In this study, we investigate if 2 pM of Aβ or tau SiNaPs interfere with the assay surface in the absence of capture antibodies (capture control), show false-positive signals due to autofluorescence component of the used assay buffers (autofluorescence control, no detection probe), or show cross-reactivity with anti-α-synuclein detection antibodies. In addition, the selectivity of the used assay antibodies was analyzed using equimolar concentrations of α-synuclein-coated SiNaPs. Since monomeric species of Aβ and tau are present in excess compared to synthetic oligomers and therefore can falsify the measurement signals, we have additionally compared equimolar concentrations of monomeric as well as oligomeric species, that is, 1 nM of synthetic Aβ oligomers[30] and 250 pM tau oligomers[19] (Figure S1). Afterward, the signal reduction of each assay control was calculated based on the normalized pixel counts according to Equation (1).

$$\textit{Signal reduction}\ [\%] = \left(1 - \frac{\textit{pixel count}_{\textit{assay control}} - \textit{pixel count}_{\textit{blank control}}}{\textit{pixel count}_{\textit{reference}} - \textit{pixel count}_{\textit{blank control}}}\right) \times 100\% \quad (1)$$

2.10 | Data scaling

Since oligomer levels in samples were lower than suggested, not enough data points of the SiNaPs concentration series were available to create a suitable calibration curve. However, as it was not possible to use the raw data directly without distorting the statistical results, a scaling method was used to compensate for differences between the experiments. This method was based on the samples of the control group and was carried out separately for Aβ and tau oligomers. For each oligomer type, a cross-plate median *globalMedian* of all control group samples was calculated. Subsequently, a separate medium *plateMedian* was formed for each plate *p*. Using these values, a scaling factor (Table S2) was calculated for each plate *p* according to Equation (2).

$$\textit{scaleFactor}_p = \frac{\textit{globalMedian}}{\textit{plateMedian}_p} \quad (2)$$

Finally, all measurement results of a plate were multiplied by the corresponding $\textit{scaleFactor}_p$. The scaled pixel counts for Aβ and tau oligomers, in the following referred to as Aβ and tau oligomer pixel counts, were used for all analyses. Figure S2 and Figure S3 show the data before and after scaling, respectively.

2.11 | Descriptive analysis

Using Spearman correlations and two-sided Mann–Whitney *U*-tests, we examined the association of oligomer pixel counts with demographic variables and known risk factors for AD, including age, sex, and *APOE* status,[31,32] as well as associations with further CSF biomarkers.

2.12 | Differences in Aβ and tau oligomer levels

To test for differences between participant groups, we performed a two-sided Mann–Whitney *U*-test. For this purpose, we regrouped the samples stepwise, based first on clinical diagnosis. However, symptoms used for the clinical diagnosis of AD can also be caused by other

forms of dementia, which leads to a clinical diagnosis not necessarily being free of errors. Therefore, we subsequently subdivided the four clinically defined groups based on the amyloid status using Aβ42 biomarker data. Afterward, the samples were analyzed independently of their clinical diagnosis using the AT(N) classification. To this end, cutoffs established within the study of Jessen et al.[24] can be used to classify the participants according to AT(N) system. In the present study, the cut-offs for Aβ42 (≤ 638.7 pg/mL), pTau (≥ 73.65 pg/mL) and tTau (> 510.9 pg/mL) positivity were applied to determine amyloid positivity or tau positivity or neurodegeneration. In addition, we also regrouped the samples based on *APOE* status with carrying at least one *APOE* ε4 allele defining *APOE* positivity (ε2/ε4, ε3/ε4, or ε4/ε4) since the *APOE* ε4 allele is an important genetic risk factor for AD.[22]

2.13 | Modeling Aβ oligomer levels in the AD continuum

In an effort to model levels of Aβ oligomers in the course of AD, a regression pipeline was designed to anticipate the Aβ oligomers utilizing Aβ42 and pTau monomers as features. The pipeline is made up of a standard scaler and a bagging model, the latter comprising three support vector regression models with radial basis function (RBF) kernels that are trained on various data subsets. Given the presumption that the relationship between the features and target might vary depending on the *APOE* ε4 status, three different instances of this pipeline were created using solely *APOE* ε4 carrier data, *APOE* ε4 noncarrier data, and all-encompassing data.

To generate continuous oligomer curves describing the progression of AD with these pipelines, it is necessary to establish a probable trajectory of Aβ42 and pTau monomers throughout the AD stages. In order to exclude bias arising from disproportionate representation of AT groups, equal numbers of samples were randomly chosen from the A−T−, A+T−, and A+T+ sets. Following this, data were scaled employing a min-max scaler, centered, and aligned to the antidiagonal. The trajectory was finally ascertained by applying a second-degree polynomial regression, and subsequently reverse transformed. The resulting trajectory was utilized as input to predict oligomer curves for *APOE* ε4 carrier, *APOE* ε4 noncarrier, and all data by the three system instances, which were later refined by a moving average. Given their relationship to Aβ42 and pTau, these curves can be integrated into other models. With this feature in mind, the curves were deliberately superimposed on a biomarker model for AD progression.[33]

All of the above was achieved using the scikit-learn Python package, version 1.0.2.

3 | RESULTS

The aim of the present study was to investigate Aβ and tau oligomer levels in human CSF samples of patients across the clinical and neurobiological continuum of AD.

3.1 | Descriptive analysis of patient and control groups

In the present study, 526 CSF samples from DELCODE, that is, 137 samples from controls, 211 samples from SCD participants, 112 samples from MCI patients, and 66 samples from AD patients, were screened for Aβ and tau oligomer levels. Demographic and clinical information for these four groups on age, gender, neuropsychological tests, amyloid-, tau-, and *APOE* ε4-status is available in Table 1.

To avoid misinterpretation of the statistical results due to demographic characteristics, we checked for correlations of age and gender with oligomer levels. Since the Shapiro–Wilk test showed that neither Aβ nor tau oligomer values were normally distributed ($p = 9.22 \times 10^{-42}$ and 1.44×10^{-34}, respectively), nonparametric tests were used. No significant Spearman correlation was found between age and oligomer pixel counts (Aβ: $r = .033$, $p = .446$; tau: $r = .016$, $p = .709$). Results from two-sided Mann–Whitney *U*-tests showed that Aβ and tau oligomer pixel counts did not significantly differ between genders, even if the significance is nearly reached for Aβ oligomers ($p = .063$; tau $p = .973$). Furthermore, as age and gender are equally distributed for all combinations of groupings by AT(N) classification as well as *APOE* ε4 genotpye, it can be assumed that there is no respective bias for the analysis.

3.2 | Clinically diagnosed MCI patients showed significantly higher levels of Aβ oligomers compared to controls

First, we investigated if Aβ and tau oligomer levels differ between clinical diagnosis groups, using two-tailed Mann–Whitney *U*-tests (Figure 1). In the case of MCI patients, significantly higher Aβ oligomer levels were found compared to the control group ($p = .017$, Figure 1A). Although Aβ and tau oligomer levels showed a highly significant correlation (Spearman $r = .541$, $p = 2.7 \times 10^{-41}$), no increase of tau oligomer levels regarding the disease stage was observed (Figure 1B).

Next, we divided the four clinical groups based on presence of amyloid pathology into amyloid negative (A−) and amyloid positive (A+) cases to analyze if differences in Aβ oligomer levels are due to underlying AD pathology. When comparing these refined groups with the A− control group, it became apparent that SCD ($p = .014$) and MCI ($p = .003$) participants with underlying amyloid pathology, but not those without evidence for AD, showed significantly increased Aβ oligomer levels (Figure 1C). Furthermore, SCD participants with amyloid positive states showed elevated Aβ oligomer levels compared to SCD individuals without diagnosed amyloid pathology ($p = .048$). However, even after the additional breakdown by A, there was no difference in tau oligomer levels (Figure 1D).

3.3 | Differences in Aβ oligomer levels based on AT(N) profiles and *APOE* ε4 status

As the results of Section 3.2 indicate the importance of the underlying pathologies for increases of Aβ oligomers, we regrouped and analyzed

TABLE 1 Demographic information and study characteristics of participants grouped by clinical diagnosis.

	Control	SCD	MCI	AD
Number	137	211	112	66
Age, years (SD)	68.2 (4.9)	71.4 (5.8)	72.3 (5.4)	75.5 (6.3)
Female	54%	43%	43%	65%
MMSE (SD)	29.3 (0.9)	29.1 (1.1)	27.5 (1.9)	23.2 (3.1)
A+	27.7%	40.8%	72.3%	92.4%
T+	7.3%	15.2%	37.5%	68.2%
APOE ε4[a]	27.6%	34.6%	50.5%	64.5%

Abbreviations: A+, amyloid pathology above cut-off; AD, Alzheimer's disease; *APOE ε4*, apolipoprotein E ε4 allele; MCI, mild cognitive impairment; MMSE, Mini-Mental State Examination; SCD, subjective cognitive decline; SD, standard deviation; T+, tau pathology above cut-off.
[a]No *APOE* data were available for 17 participants.

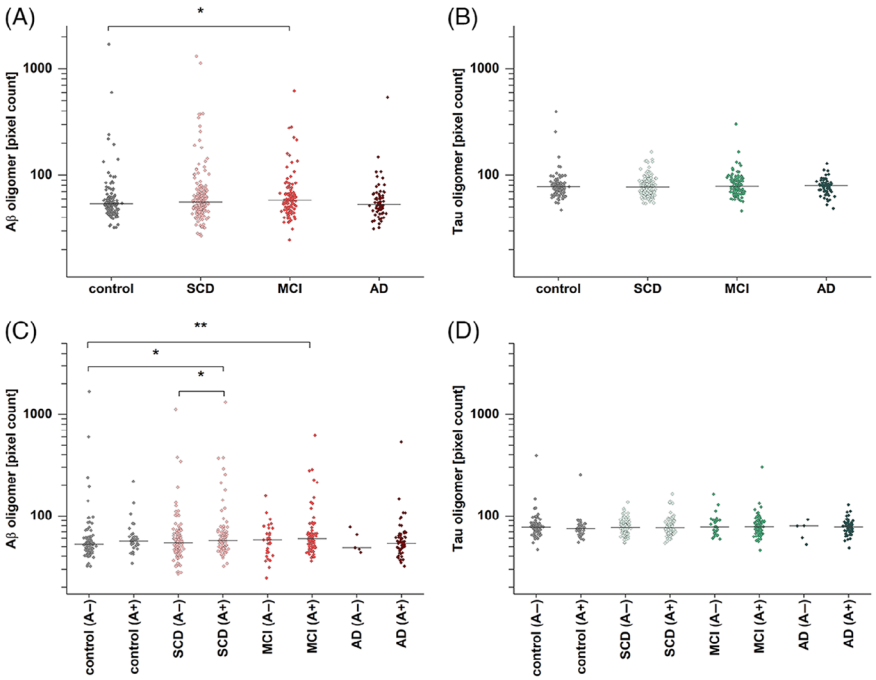


FIGURE 1 Amyloid beta (Aβ) and tau oligomer pixel count based on amyloid pathology (A+/A−). (A) Aβ oligomer pixel counts in mild cognitive impairment (MCI) are significantly increased compared to the controls ($p = .017$). (B) By contrast, no significant changes were detected for tau oligomer pixel count. (C) After dividing groups along amyloid status, significantly higher levels in subjective cognitive decline (SCD) (A+) and MCI (A+) compared to controls (A−) were observed ($p = .014$ and $p = .0028$, respectively). Furthermore, SCD (A+) is significantly elevated compared to SCD (A−) ($p = .048$). (D) Tau oligomers in subgroups show no significant differences when divided in A+ and A−. Effect sizes for the significantly differing groups are provided in Table S3, while receiver operating characteristic curves and area under the curve scores are presented in Figure S4 and Table S5. Horizontal lines indicate the median; y-axis scales are logarithmic. A two-sided Mann–Whitney *U*-test (confidence interval = .05) was carried out to investigate differences between the groups. Abbreviation: AD, Alzheimer's disease. $^{*}p \leq .05$, $^{**}p \leq .01$.

the results based on the AT classification proposed by the NIA-AA research framework and the currently established cutoff values by Jessen et al. for Aβ42 and pTau[24] (Figure 2). Furthermore, demographic information was regrouped based on AT classification (Table 2). Since again no differences in tau oligomer levels between the sample groups were observed, the subsequent analyses were only described with respect to Aβ oligomer levels.

Applying this classification, samples of participants with amyloid pathology without tau pathology (A+T−) had significantly increased levels of Aβ oligomers compared to A+T+ participants with amyloid and tau pathology ($p = 5.8 \times 10^{-5}$). This applied to participants with (A+T−N+) and without (A+T−N−), a concomitant non-Alzheimer's pathologic change (A+T−N+: $p = .032$; A+T−N−: $P = 1.8 \times 10^{-4}$). Aβ oligomer levels of participants classified as A+T+ did not differ

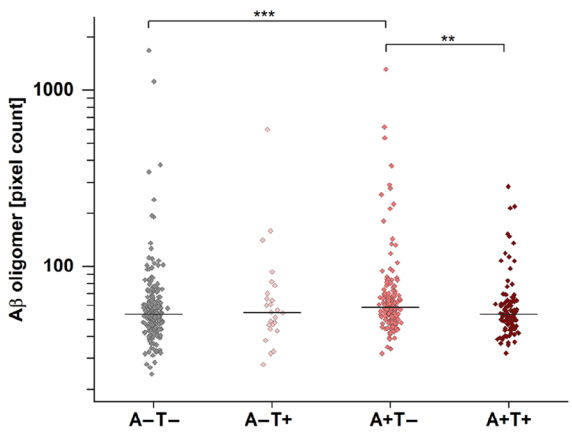


FIGURE 2 Amyloid beta (Aβ) oligomers in quantified cerebrospinal fluid (CSF) samples after AT (amyloid/tau) classification. Aβ oligomer pixel counts in CSF of A+T− patients are significantly increased compared to the reference group A−T− ($p = 5.8 \times 10^{-5}$) and to A+T+ ($p = .0026$). Effect sizes for the significantly differing groups are provided in Table S3, while receiver operating characteristic curves and area under the curve scores are presented in Figure S4 and Table S5. Horizontal lines indicate the median; y-axis scale is logarithmic. A two-sided Mann–Whitney *U*-test (confidence interval = .05) was carried out to investigate differences between the groups. $^{**}p \leq .01$, $^{***}p$ value $\leq .001$.

significantly from control group participants but compared to A+T− participants ($p = .0026$).

Because the *APOE* ε4 allele is an important genetic risk factor for AD,[22] we also investigated Aβ oligomer levels in *APOE* ε4 carriers. Here, significantly increased Aβ oligomer levels were found compared *APOE* ε4 noncarriers independent of the disease stage ($p = .02$). For further evaluation, receiver operating characteristic (ROC) curves, area under the curve (AUC) scores, and effect sizes were presented in Figure S4, Tables S3 and S4.

3.4 | Aβ oligomer levels are elevated in early disease stages

To investigate how Aβ oligomers fit into the AD continuum, we established a regression model that predicts Aβ oligomer levels based on monomeric Aβ42 and pTau concentrations. This model was validated by normalized mean absolute error (Table S5) and by comparing the binned raw data and the binned regression model predictions (Figure S5). As displayed in Figure 3A, increased oligomer levels were only found at low Aβ42 and pTau concentrations in early AD stages. Furthermore, we also investigated if the observed increase and later decrease of Aβ oligomer levels depends on *APOE* ε4 status. To this end, we classified samples into *APOE* ε4 carriers (Figure 3B) and noncarriers (Figure 3C). The predicted Aβ oligomer levels in context of different *APOE* ε4 states indicated that the levels of Aβ oligomers are increased in *APOE* ε4 carriers, and that the peak shifted to higher pTau concentrations (red areas in Figure 3B,C). To provide a more specific statement about the probable level of the Aβ oligomer in the AD continuum, the prediction was reduced to the most likely trajectory of Aβ42 and pTau monomer through the AD stages, as described in 2.3.6 and displayed in Figure 4A. The model of Jack et al.[33] supplemented by the modeled Aβ oligomer curves revealed that in *APOE* ε4

TABLE 2 Demographic information of participants based on the AT classification.

Characteristic	A−T−	A−T+	A+T−	A+T+
number	234	26	163	103
Age, years (SD)	69.62 (5.61)	73.08 (5.15)	71.61 (6.00)	74.08 (5.78)
Female	48.7%	53.8%	61.0%	51.5%
MMSE (SD)	29.1 (1.3)	28.3 (2.9)	28.2 (2.4)	25.7 (3.4)
Aβ42, pg/mL (SD)	960.9 (212.2)	1218.9 (471.2)	445.3 (122.9)	419.8 (116.4)
Aβ42/40 ratio (SD)	0.108 (0.015)	0.094 (0.029)	0.071 (0.023)	0.046 (0.009)
pTau, pg/mL (SD)	47.7 (10.9)	102.2 (45.3)	46.4 (16.3)	108.3 (35.8)
tTau, pg/mL (SD)	333.0 (120.2)	696.8 (361.0)	353.0 (153.3)	849.8 (273.3)
APOE ε4[a]	20.0%	23.1%	48.1%	73.0%
Clinical diagnosis in percentage of subgroups				
Control	39.7%	23.1%	20.9%	3.9%
SCD	48.3%	46.2%	40.5%	19.4%
MCI	10.7%	23.1%	27.6%	35.0%
AD	1.3%	7.7%	11.0%	41.7%
	100%	100%	100%	100%

Abbreviations: A+, amyloid pathology above cut-off; Aβ, amyloid beta; AD, Alzheimer's disease; *APOE* ε4, apolipoprotein E ε4 allele; AT, amyloid/tau; MCI, mild cognitive impairment; MMSE, Mini-Mental State Examination; SCD, subjective cognitive decline; SD, standard deviation; T+, tau pathology above cut-off.
[a]No *APOE* data were available for 17 participants.

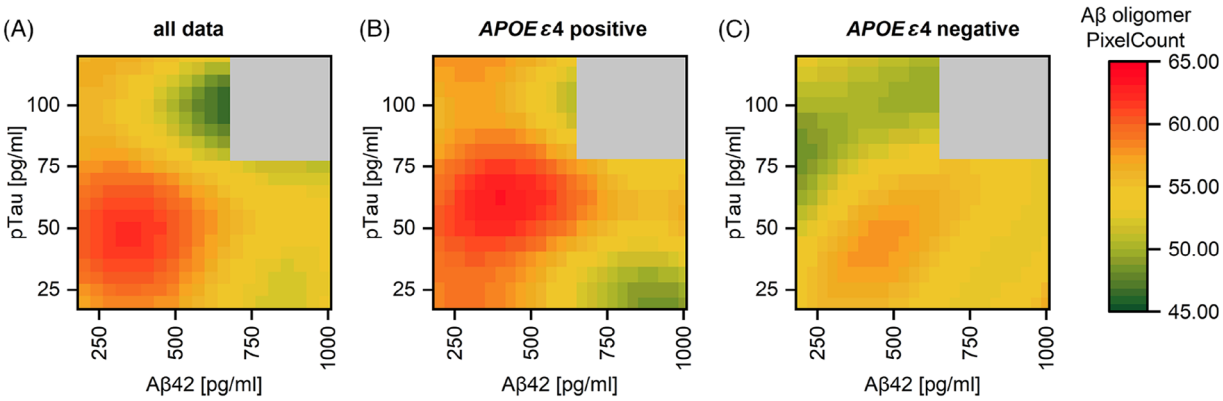


FIGURE 3 Regression model for the interrelationship of amyloid beta (Aβ) oligomers pixel count, Aβ42, and phosphorylated tau (pTau) in cerebrospinal fluid (CSF). Based on Aβ42, pTau, and Aβ oligomer levels in CSF, regression models for prediction of Aβ oligomers pixel count were performed. Highest Aβ oligomer levels can be expected in patients with low Aβ42 while pTau is relatively low in (A) all patients, (B) apolipoprotein E (*APOE*) gene ε4 allele carriers, and (C) *APOE* ε4 noncarriers. Aβ42 oligomer levels in *APOE* ε4-positive participants are overall higher and shifted toward higher pTau concentrations compared to those who were *APOE* ε4 negative.

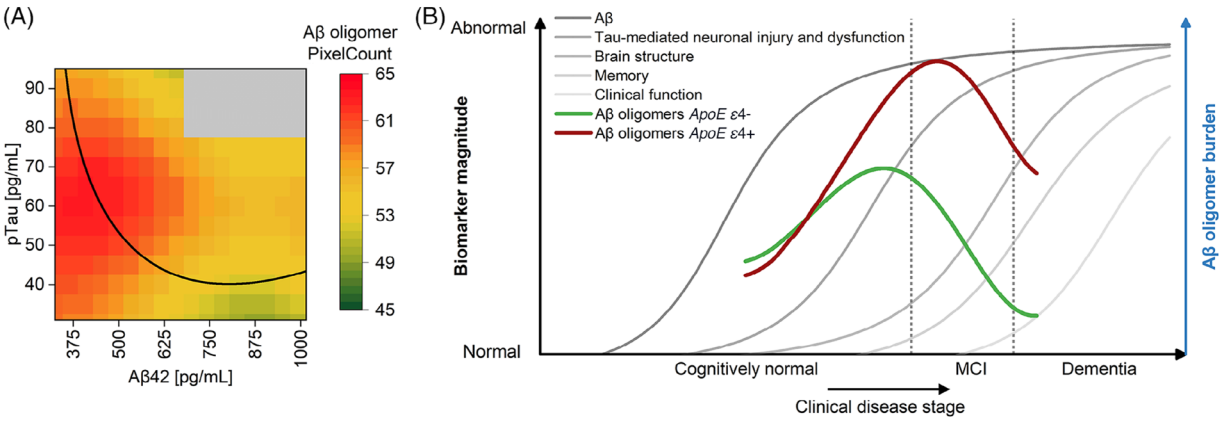


FIGURE 4 Hypothetical model of amyloid beta (Aβ) oligomers in cerebrospinal fluid (CSF) within the Alzheimer's disease (AD) continuum. (A) Along the trajectory of biomarkers during AD progression from high Aβ42 and low pTau (A−T−) to lowered Aβ42 first (A+T−) followed by elevated pTau (A+T+), Aβ oligomers start to rise until a turning point is reached. Soon after pTau starts to increase, Aβ oligomer concentrations decrease. This panel is a zoomed-in portion of Figure 3B. Data are represented in a binned form. (B) Hypothetical changes of Aβ oligomers during disease progression are transferred to the model of AD biomarker changes according to Jack et al.[1] Apolipoprotein E (*APOE*) gene ε4 allele carriers show higher oligomer concentrations with a peak at a more advanced disease stage but still in the early stages of the disease. Due to the high age of the cohort (60+) and the absence of persons with advanced AD, it was not possible to cover the entire x-axis with the curves. For validation of the model, Figure S5 shows a comparison between the measured oligomer level and the oligomer level determined by regression. Figure modified after Jack et al.[33]

noncarriers the peak is reached during the SCD stage, whereas in *APOE* ε4 carriers it is reached at the MCI stage (Figure 4B). Regardless of the *APOE* ε4 status, Aβ oligomer levels already decrease within the MCI stage.

4 | DISCUSSION

In the present study we measured Aβ oligomers in CSF aiming to allocate the presence of these most neurotoxic Aβ species within the neurobiological continuum of AD and thereby elucidate the temporal sequence of Aβ oligomers in AD pathology. Our work provides novel evidence for the importance of Aβ oligomers in early biological and symptomatic disease stages, as we found the highest levels of Aβ oligomers in participants with the clinical diagnosis of MCI. However, 59.8% of SCD and 27.7% of MCI participants did not have evidence for amyloid pathology and might therefore not suffer from AD. Stratification for amyloid positivity (ie, A+ vs A−) alone yielded significant differences within the SCD group and enhanced the discrimination of SCD and MCI to controls. Strikingly, stratification of participants by A/T

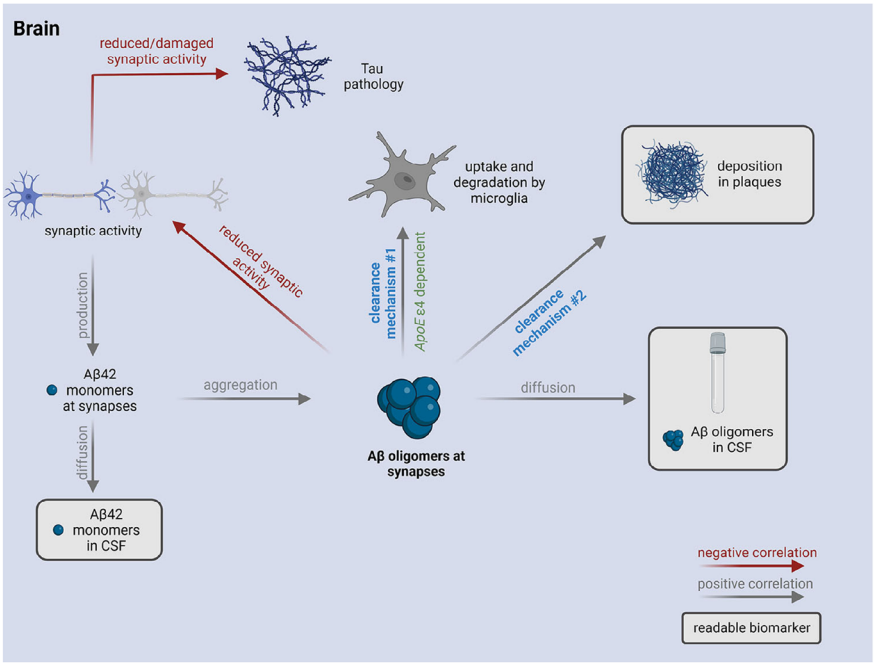


FIGURE 5 Proposed clearance mechanisms for amyloid beta (Aβ) oligomers and the influence on the use of Aβ oligomers as biomarker. Hypothetic scenario: Aβ monomer production at synapses is dependent on synaptic activity. At a certain time point, aggregation of Aβ monomers leads to the formation of toxic Aβ oligomers which can be cleared by different mechanisms. Aβ oligomers can be degraded by microglia (clearance mechanism #1), diffuse into cerebrospinal fluid (CSF), or be deposited into plaques (clearance mechanism #2) as soon as there are plaques. Formation of plaques in patients with amyloid pathology allows oligomers to be deposited there (clearance mechanism #2), which may well become the preferred fate of Aβ oligomers. Figure created with BioRender.com. *APOE* ε4, apolipoprotein E ε4 allele.

biomarker profiles, thereby also taking tau pathology as reflected by CSF pTau into account, yielded significantly elevated Aβ oligomer levels in individuals with an A+/T− biomarker profile compared to participants with nonpathological AD biomarkers (A−/T−) on the one hand, and full-blown AD neuropathological changes (A+/T+ profile) on the other. Consequently, Aβ oligomers in our cohort peak in early disease stages, where tau pathology is still inconspicuous (A+T−). Intuitively, one may assume that while Aβ aggregation is increasing in the brain during early disease stages, the Aβ oligomer level is also rising in the CSF. That is exactly what we observed in the present study when comparing A−T− with A+T− subjects. Rather surprisingly, we observed reduced Aβ oligomer levels in the more advanced disease stage A+T+ compared to the earlier A+T− stage. Deposition of oligomer species into plaques or breakdown of active clearance mechanisms from brain to CSF are just two of many possible explanations (Figure 5). To elucidate the relationship of Aβ oligomers, Aβ42, and pTau (Figure 3), we calculated a chronological sequence of Aβ oligomer levels based on the regression model and superimposed it to key biomarkers of AD as depicted in Figure 4. With respect to the limited range of disease stages within our cohort, lacking very early and advanced disease stages, no statements about oligomer levels over the whole spectrum of disease stages can be made. A limitation of the study is the low number of samples from stage 1 of AD to determine the age at which Aβ oligomer levels start to rise. According to our model, Aβ oligomers start to rise approximately at the beginning of stage 2 and reach their peak early in stage 3 before the oligomer level decreases again, which is in line with previous studies.[34,35] However, other studies, which did not include early stages, reported increased Aβ oligomer concentrations in CSF samples of demented patients compared to the control group[21,34,36] or no differences between dementia or MCI and controls.[37] In addition to differences in patient preanalytical variables such as freeze-thaw cycles, storage period, or centrifugation of the samples,[38] different results may be caused by the choice of assay setups, especially regarding the selection of antibodies,[35] targeting different epitopes and oligomer structures. More recent publications focused on blood-based detection reported increased Aβ oligomer levels in plasma over the course of the disease or a correlation with amyloid-PET positivity.[39–41]

We further investigated the effect of *APOE* ε4 positivity on Aβ oligomer levels. As can be seen in the regression model (Figure 3) and the hypothetical model of Aβ oligomer changes (Figure 4), *APOE* ε4 carriers showed higher oligomer levels. Notably, in *APOE* ε4 carriers, the Aβ oligomer level in CSF peaks further right of the peak in *APOE* ε4 noncarriers. This is not later in time, but further down in disease progression strengthening the view that *APOE* ε4 carriers start earlier into the Alzheimer's continuum.[22,42]

Although Aβ and tau oligomers show a highly significant correlation, no differences of tau oligomers with respect to the biomarker

profile or the clinical syndrome were observed, which is in line with previous findings from our lab.[19] In the present study, we investigated patients who were at mild disease stages when enrolled in the DELCODE study.[23] Presumably, tau oligomers in CSF might be increased and detectable in late stages of dementia. Indeed, a previous study from Sengupta et al. reported elevated tau oligomers only at moderate to severe dementia.[43]

Our results emphasize the relevance of the biologically based definition of Alzheimer's disease, as Aβ oligomers, which are thought to be the major toxic species in the disease, are only increased in patients with abnormal Aβ42. Moreover, we have previously demonstrated that sFIDA is now a robust method to quantitate aggregates from tau, α-synuclein, and Aβ in body fluids.[17–20,30] To further understand the differences between assay outcomes and investigate setups or antibodies which are best suited for diagnosis, it will be of great interest to measure a pool of samples with diverse Aβ oligomer assays. Probably, the combination of different oligomer biomarkers improves the understanding of the underlying pathology and the diagnostic accuracy as calculated by the probability analysis of Lewczuk et al.[44] In particular, longitudinal analysis of Aβ and tau oligomer concentrations over a longer period of time may support our model of Aβ oligomer concentration changes and add to our understanding about which patients at a predementia stage will develop AD in the future. Besides the diagnostic aspects, Aβ oligomers measured by sFIDA are promising biomarkers for clinical drug development to easily monitor their effects.[20]

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Victoria Kraemer-Schulien, Lara Blömeke, and Marlene Pils developed the assay. Victoria Kraemer-Schulien performed the experiments together with Lara Blömeke and Marlene Pils. Fabian Rehn, Victoria Kraemer-Schulien, and Lara Blömeke analyzed the data and carried out the statistics. Lara Blömeke, Fabian Rehn, and Victoria Kraemer-Schulien wrote the manuscript together with Oliver Peters, Marlene Pils, Oliver Bannach, and Dieter Willbold. Oliver Bannach, Dieter Willbold, and Oliver Peters supervised the project. Piotr Lewczuk and Johannes Kornhuber were involved in the establishment of the assay. Janine Kutzsche, Tuyen Bujnicki, Luisa-Sophie Schneider, Silka D. Freiesleben, and Michael Wagner carefully revised the manuscript. Lukas Preis, Josef Priller, Eike J. Spruth, Slawek Altenstein, Anja Schneider, Klaus Fliessbach, Jens Wiltfang, Frank Jessen, Wenzel Glanz, Katharina Buerger, Daniel Janowitz, Robert Perneczky, Boris-Stephan Rauchmann, Stefan Teipel, Ingo Kilimann, Doreen Goerss, Christoph Laske, Matthias H. Munk, Michael Ewers, Emrah Düzel, Andrea Lohse, Niels Hansen, Ayda Rostamzadeh, Enise I. Incesoy, Michaela Butryn, Carolin Sanzenbacher, Matthias Schmid were responsible for the management of the DELCODE study at the various sites. Oliver Peters, Frank Jessen, Annika Spottke, Nina Roy-Kluth, Michael T. Heneka, Frederic Brosseron, Steffen Wolfsgruber, Luca Kleineidam, Melina Stark, Michaela Butryn, and Emrah Düzel were responsible for methodological core central data management and quality control of the DELCODE study.

ACKNOWLEDGMENTS

We received funding from the programs "Biomarkers Across Neurodegenerative Diseases I + II" of The Alzheimer's Association, Alzheimer's Research UK and the Weston Brain Institute (11084 and BAND-19-614337). We are also grateful for support from The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research (14977, 009889), from the ALS Association, and from the Packard Center (19-SI-476). We further received funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (INST 208/616-1 FUGG, INST 208/794-1 FUGG) and the Helmholtz Association (HVF0079).

Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

CONFLICTS OF INTERESTS STATEMENT

Dieter Willbold and Oliver Bannach are co-founders and shareholders of attyloid GmbH. This had no influence of the interpretation of the data. All other authors declare no competing interests related to this work. The sFIDA method is protected by patents EP3271724A1, EP3014279B1 and EP2794655B1. Author disclosures are available in the supporting information.

CODE AVAILABILITY STATEMENT

For image data analysis, we used the sFIDAta software tool which can be made available upon request.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary materials.

CONSENT STATEMENT

All local institutional review boards and ethical committees approved the study protocol. All participants gave written informed consent before inclusion in the study. DELCODE is registered at the German clinical trials register (drks00007966) (04/may/2015).

REFERENCES

1. Jack CR Jr, Bennett DA, Blennow K, et al. NIA-AA Research framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2018;14:535-562.
2. Jack CR Jr, Holtzman DM. Biomarker modeling of Alzheimer's disease. *Neuron*. 2013;80:1347-1358.
3. Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, et al. Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol*. 2013;12:357-367.
4. Tolar M, Hey J, Power A, Abushakra S. Neurotoxic soluble amyloid oligomers drive Alzheimer's pathogenesis and represent a clinically validated target for slowing disease progression. *Int J Mol Sci*. 2021;22(12):6355.
5. Larson ME, Lesné SE. Soluble Aβ oligomer production and toxicity. *J Neurochem*. 2012;120(supp l):125-139.
6. Brinkmalm G, Hong W, Wang Z, et al. Identification of neurotoxic cross-linked amyloid-beta dimers in the Alzheimer's brain. *Brain*. 2019;142:1441-1457.
7. Gaspar RC, Villarreal SA, Bowles N, Hepler RW, Joyce JG, Shughrue PJ. Oligomers of beta-amyloid are sequestered into and seed new plaques in the brains of an AD mouse model. *Exp Neurol*. 2010;223:394-400.
8. Iljina M, Garcia GA, Dear AJ, et al. Quantitative analysis of co-oligomer formation by amyloid-beta peptide isoforms. *Sci Rep*. 2016;6:28658.

9. O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*. 2011;34:185-204.
10. Olsson B, Lautner R, Andreasson U, et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2016;15:673-684.
11. Lewczuk P, Lukaszewicz-Zajac M, Mroczko P, Kornhuber J. Clinical significance of fluid biomarkers in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rep*. 2020;72:528-542.
12. Bilousova T, Miller CA, Poon WW, et al. Synaptic amyloid-β oligomers precede p-Tau and differentiate high pathology control cases. *Am J Pathol*. 2016;186:185-198.
13. Hefti F, Goure WF, Jerecic J, Iverson KS, Walicke PA, Krafft GA. The case for soluble Aβ oligomers as a drug target in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34:261-266.
14. Hayden EY, Teplow DB. Amyloid β-protein oligomers and Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res Ther*. 2013;5:60.
15. Kiselica AM. Empirically defining the preclinical stages of the Alzheimer's continuum in the Alzheimer's disease neuroimaging initiative. *Psychogeriatrics*. 2021;21:491-502.
16. Knopman DS, Haeberlein SB, Carrillo MC, et al. The National Institute on Aging and the Alzheimer's Association Research Framework for Alzheimer's disease: perspectives from the research roundtable. *Alzheimer's Dement*. 2018;14:563-575.
17. Pils M, Rutsch J, Eren F, et al. Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) protein aggregates in cerebrospinal fluid are elevated in first-episode psychosis patients. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2023;77:665-671.
18. Schaffrath A, Schleyken S, Seger A, et al. Patients with isolated REM-sleep behavior disorder have elevated levels of alpha-synuclein aggregates in stool. *NPJ Parkinson's Dis*. 2023;9:14.
19. Bloemeke L, Pils M, Kraemer-Schulien V, et al. Quantitative detection of alpha-synuclein and Tau oligomers and other aggregates by digital single particle counting. *NPJ Parkinsons Dis*. 2022;8:68.
20. Kass B, Schemmert S, Zafiu C, et al. Abeta oligomer concentration in mouse and human brain and its drug-induced reduction ex vivo. *Cell Rep Med*. 2022;3:100630.
21. Wang-Dietrich L, Funke SA, Kuhbach K, et al. The amyloid-beta oligomer count in cerebrospinal fluid is a biomarker for Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2013;34:985-994.
22. Yamazaki Y, Zhao N, Caulfield TR, Liu CC, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat Rev Neurol*. 2019;15:501-518.
23. Jessen F, Spottke A, Boecker H, et al. Design and first baseline data of the DZNE multicenter observational study on predementia Alzheimer's disease (DELCODE). *Alzheimer's Res Ther*. 2018;10:15.
24. Jessen F, Wolfsgruber S, Kleineindam L, et al. Subjective cognitive decline and stage 2 of Alzheimer disease in patients from memory centers. *Alzheimer's Dement*. 2022;19(2):487-497.
25. Hülsemann M, Zafiu C, Kühbach K, et al. Biofunctionalized silica nanoparticles: standards in amyloid-beta oligomer-based diagnosis of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2016;54:79-88.
26. Kühbach K, Hülsemann M, Herrmann Y, et al. Application of an amyloid beta oligomer standard in the sFIDA assay. *Front Neurosci*. 2016;10:8.
27. Kravchenko K, Kulawik A, Hülsemann M, et al. Analysis of anticoagulants for blood-based quantitation of amyloid beta oligomers in the sFIDA assay. *Biol Chem*. 2017;398:465-475.
28. Herrmann Y, Bujnicki T, Zafiu C, et al. Nanoparticle standards for immuno-based quantitation of alpha-synuclein oligomers in diagnostics of Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Clin Chim Acta*. 2017;466:152-159.
29. Herrmann Y, Kulawik A, Kuhbach K, et al. sFIDA automation yields sub-femtomolar limit of detection for Aβ aggregates in body fluids. *Clin Biochem*. 2017;50:244-247.
30. Pils M, Dybala A, Rehn F, et al. Development and implementation of an internal quality control sample to standardize oligomer-based diagnostics of Alzheimer's disease. *Diagnostics*. 2023;13:1702.
31. Vermunt L, Sikkes SAM, van den Hout A, et al. Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimer's Dement*. 2019;15:888-898.
32. Alzheimer's Association. 2022 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement*. 2022;18:700-789.
33. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *The Lancet Neurology*. 2010;9:119-128.
34. Holtta M, Hansson O, Andreasson U, et al. Evaluating amyloid-beta oligomers in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease. *PLOS ONE*. 2013;8:e66381.
35. Yang T, O'Malley TT, Kanmert D, et al. A highly sensitive novel immunoassay specifically detects low levels of soluble Aβ oligomers in human cerebrospinal fluid. *Alzheimer's Res Ther*. 2015;7:14.
36. Savage MJ, Kalinina J, Wolfe A, et al. A sensitive Aβ oligomer assay discriminates Alzheimer's and aged control cerebrospinal fluid. *J Neurosci*. 2014;34:2884-2897.
37. Jongbloed W, Bruggink KA, Kester MI, et al. Amyloid-beta oligomers relate to cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2015;45:35-43.
38. Dulewicz M, Kulczynska-Przybik A, Mroczko P, Kornhuber J, Lewczuk P, Mroczko B. Biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease in clinical practice: the role of CSF biomarkers during the evolution of diagnostic criteria. *Int J Mol Sci*. 2022:23:8598.
39. Babapour Mofrad R, Scheltens P, Kim S, et al. Plasma amyloid-beta oligomerization assay as a pre-screening test for amyloid status. *Alzheimer's Res Ther*. 2021;13:133.
40. Liu L, Kwak H, Lawton TL, et al. An ultra-sensitive immunoassay detects and quantifies soluble Aβ oligomers in human plasma. *Alzheimer's Dement*. 2022;18:1186-1202.
41. Shea D, Colasurdo E, Smith A, et al. SOBA: development and testing of a soluble oligomer binding assay for detection of amyloidogenic toxic oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119:e2213157119.
42. Leoni V. The effect of apolipoprotein E (ApoE) genotype on biomarkers of amyloidogenesis, tau pathology and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49:375-383.
43. Sengupta U, Portelius E, Hansson O, et al. Tau oligomers in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Ann Clin Transl Neurol*. 2017;4:226-235.
44. Lewczuk P, Wiltfang J, Kornhuber J, Verhasselt A. Distributions of Aβ42 and Aβ42/40 in the cerebrospinal fluid in view of the probability theory. *Diagnostics*. 2021;11:2372.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Blömeke L, Rehn F, Kraemer-Schulien V, et al. Aβ oligomers peak in early stages of Alzheimer's disease preceding tau pathology. *Alzheimer's Dement*. 2024;16:e12589. https://doi.org/10.1002/dad2.12589

4.3 Quantifizierung von Aβ-Oligomeren in humanen Plasmaproben

Blood-based quantification of Aβ oligomers indicates impaired clearance from brain in ApoE ε4 positive subjects

Autoren	Lara Blömeke, Fabian Rehn, **Marlene Pils**, Victoria Kraemer-Schulien, Anne Cousin, Janine Kutzsche, Tuyen Bujnicki, Silka D. Freiesleben, Luisa-Sophie Schneider, Lukas Preis, Arda C. Cetindag, Daria Gref, Nicoleta C. Cosma, Deniz Keles, Xiao Wang, Josef Priller, Eike J. Spruth, Slawek Altenstein, Anja Schneider, Klaus Fliessbach, Jens Wiltfang, Niels Hansen, Ayda Rostamzahdeh, Emrah Düzel, Wenzel Glanz, Enise I. Incesoy, Katharina Buerger, Daniel Janowitz, Michael Ewers, Robert Perneczky, Boris-Stephan Rauchmann, Stefan Teipel, Ingo Kilimann, Christoph Laske, Matthias H. Munk, Annika Spottke, Nina Roy, Michael T. Heneka, Frederic Brosseron, Michael Wagner, Sandra Roeske, Alfredo Ramirez, Matthias Schmid, Frank Jessen, Oliver Bannach, Oliver Peters, Dieter Willbold
In Revision bei	**Communication medicine (2023)**
Beitrag	**Eigener Anteil 10%** ▪ Weiterentwicklung und Validierung der sFIDA-Technologie für den Nachweis von Aβ-Oligomeren ▪ Diskussion der Ergebnisse ▪ Beteiligung bei Studiendurchführung ▪ Beteiligung beim Schreiben des Manuskripts

Blood-based quantification of Aβ oligomers indicates impaired clearance from brain in ApoE ε4 positive subjects

Lara Blömeke[1,2], Fabian Rehn[1,2], Marlene Pils[1,2], Victoria Kraemer-Schulien[1], Anneliese Cousin[1], Janine Kutzsche[1], Tuyen Bujnicki[1], Silka D. Freiesleben[3,4], Luisa-Sophie Schneider[4], Lukas Preis[4], Josef Priller[3,4,5,6], Eike J. Spruth[3, 4], Slawek Altenstein[3,4], Anja Schneider[7,8], Klaus Fliessbach[7,8], Jens Wiltfang[9,10,11], Niels Hansen[10], Ayda Rostamzadeh[12], Emrah Düzel[13,14], Wenzel Glanz[13], Enise I. Incesoy[13,14,15], Katharina Buerger[16,17], Daniel Janowitz[17], Michael Ewers[16, 17], Robert Perneczky[16,18,19,20], Boris-Stephan Rauchmann[18,21,22], Stefan Teipel[23,24], Ingo Kilimann[23,24], Christoph Laske[25,26], Matthias H. Munk[25,27], Annika Spottke[7,9], Nina Roy[7], Michael T. Heneka[28], Frederic Brosseron[7], Michael Wagner[7,8], Sandra Roeske[7], Alfredo Ramirez[7,8,29,30,31], Matthias Schmid[7,32], Frank Jessen[7,10,29], Oliver Bannach[1,2], Oliver Peters[3,4], Dieter Willbold[1,2,33*]

[1]Institute of Biological Information Processing (Structural Biochemistry: IBI-7), Forschungszentrum Jülich, 52428 Jülich, Germany
[2]attyloid GmbH, 40225 Düsseldorf, Germany
[3]German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), 10117 Berlin, Germany
[4]Department of Psychiatry and Psychotherapy, Charité, 10117 Berlin, Germany
[5]School of Medicine, Technical University of Munich; Department of Psychiatry and Psychotherapy, 81675 Munich, Germany
[6]University of Edinburgh and UK DRI, Edinburgh, UK
[7]German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Bonn, 53127 Bonn, Germany
[8]University of Bonn Medical Center, Dept. of Neurodegenerative Disease and Geriatric Psychiatry/Psychiatry, 53127 Bonn, Germany
[9]German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), 37075 Goettingen, Germany
[10]Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Center Goettingen, University of Goettingen, 37075 Goettingen, Germany
[11]Neurosciences and Signaling Group, Institute of Biomedicine (iBiMED), Department of Medical Sciences, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal
[12]Department of Psychiatry, University of Cologne, Medical Faculty, 50924 Cologne, Germany
[13]German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), 39120 Magdeburg, Germany
[14]Institute of Cognitive Neurology and Dementia Research (IKND), Otto-von-Guericke University, 39106 Magdeburg, Germany
[15]Department for Psychiatry and Psychotherapy, University Clinic Magdeburg, 39120 Magdeburg, Germany
[16]German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE, Munich), 81377 Munich, Germany
[17]Institute for Stroke and Dementia Research (ISD), University Hospital, LMU Munich, 81377 Munich, Germany
[18]Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Hospital, LMU Munich, 81377 Munich, Germany
[19]Munich Cluster for Systems Neurology (SyNergy) Munich, 81377 Munich, Germany
[20]Ageing Epidemiology Research Unit (AGE), School of Public Health, Imperial College London, London, UK
[21]Sheffield Institute for Translational Neuroscience (SITraN), University of Sheffield, Sheffield, UK
[22]Department of Neuroradiology, University Hospital LMU, 81377 Munich, Germany
[23]German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), 18147 Rostock, Germany
[24]Department of Psychosomatic Medicine, Rostock University Medical Center, 18147 Rostock, Germany
[25]German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), 72076 Tübingen, Germany
[26]Section for Dementia Research, Hertie Institute for Clinical Brain Research and Department of Psychiatry and Psychotherapy, University of Tübingen, 72076 Tübingen, Germany
[27]Department of Psychiatry and Psychotherapy, University of Tübingen, 72076 Tübingen, Germany
[28]Luxembourg Centre for Systems Biomedicine (LCSB), University of Luxembourg, L-4367 Belvaux, Luxembourg
[29]Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD), University of Cologne, 50931 Cologne, Germany

[30]Division of Neurogenetics and Molecular Psychiatry, Department of Psychiatry and Psychotherapy, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, 50931 Cologne, Germany
[31]Department of Psychiatry & Glenn Biggs Institute for Alzheimer's and Neurodegenerative Diseases, San Antonio, TX, USA
[32]Institute for Medical Biometry, University Hospital Bonn, 53127 Bonn, Germany
[33]Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

***Corresponding Author:**

Prof. Dr. Dieter Willbold, Institute of Biological Information Processing (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, Wilhelm-Johnen-Straße, 52428 Jülich, Germany
Tel.: +49 2461 61 2100; E-Mail: d.willbold@fz-juelich.de

Abstract

Quantification of Aβ oligomers in plasma enables early diagnosis of Alzheimer's Disease (AD) and improves our understanding of underlying pathologies. However, quantification necessitates an extremely sensitive and selective technology because of very low Aβ oligomer concentrations and possible interference from matrix components. In this report, we developed and validated an sFIDA assay for quantification of Aβ oligomers in plasma. The blood-based sFIDA assay delivered a sensitivity of 1.8 fM, an inter- and intra-assay variation below 20% for oligomer calibration standards and no interference with matrix components. Quantification of Aβ oligomers in 359 plasma samples from the DELCODE cohort revealed lower oligomer concentrations in subjective cognitive decline and AD patients than healthy Control participants. Correlation analysis between CSF and plasma oligomer concentrations indicates an impaired clearance of Aβ oligomers that is dependent on the ApoE ε4 status.

Introduction

Although Alzheimer's Disease (AD) is the most prominent neurodegenerative disorder affecting 50 million people worldwide [1], there remains a lack of therapeutic options and diagnostic tools, such as a blood-based test suitable for use in primary care. As increasing evidence supports the role of Aβ oligomers as the most toxic component in AD progression [2-4], these oligomers represent a promising biomarker candidate for diagnosis of AD and drug development. The level of Aβ oligomers in the brains of AD patients are higher and, because of the direct connection to brain parenchyma and liquor [5], also in CSF, as supported by previous studies [6-9]. Moreover, more than 50% of monomeric brain Aβ is transferred and cleared in the periphery [10], reaching the blood via blood-brain-barrier (BBB), blood-CSF barrier (BCSFB) or perivascular and glymphatic clearance [11]. Although the exact clearance mechanisms of Aβ oligomers from the brain and CSF to plasma remain largely unknown, earlier studies have confirmed the presence of Aβ oligomer species in plasma samples [12] and have reported higher oligomer concentrations in AD patients [13-16]. However, disease progression may lead to a reduction in Aβ oligomers in plasma samples because of their deposition in amyloid plaques and impaired clearance from the brain into the blood stream [15]. For example, an inverse correlation between efficiency of glymphatic clearance and oligomer size has been described [2]. Additionally, transport of Aβ across the BBB is affected in AD patients, especially in carriers of the AD risk gene allele apolipoprotein E (ApoE) ε4 [2,17]. Quantification of Aβ oligomer concentrations in plasma samples, especially in early disease stages, and in-depth analysis of dependencies between Aβ oligomers and different biomarkers should improve our understanding of the role of amyloid pathology in AD.

We previously developed a surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) technology that is a versatile platform for quantification of protein aggregates in biofluids. sFIDA features single particle sensitivity due to a microscopy-based readout and selectivity for aggregated Aβ because of the use of antibodies with overlapping epitopes (principle of sFIDA in Fig. 1a). Moreover, these antibodies are directed against linear epitopes, i.e., against the N-terminus of Aβ, allowing the quantification of the entire population of oligomers irrespective of their conformation, morphology and size. We previously established protein conjugated silica nanoparticles (SiNaPs) as calibration standards for oligomer-based assays [18-20]. Additionally, we demonstrated that sFIDA sensitively and specifically detects alpha synuclein (αSyn), Tau and Aβ oligomers in CSF samples [9,21]. Nonetheless, the reliable quantification of Aβ oligomers in plasma samples poses an even greater challenge, as plasma typically contains a 200-fold higher total protein concentration than CSF [5]. This high protein background can lead to false negative readouts because of epitope masking, or false positive readouts because of interferences with human anti-mouse-antibodies [22]. Moreover, Aβ oligomer concentrations are expected to be in the low femto- to even attomolar range [23], thus requiring an extremely sensitive method for detection.

In this report, an sFIDA assay for quantification of Aβ oligomers in plasma samples was developed and validated. This assay was used to examine blood samples from the DELCODE cohort to determine whether Aβ oligomer concentrations reflect the clinical disease stage and correlate with CSF biomarker profiles.

Results

Initially, we validated the sFIDA assay using recombinant $Aβ_{1-42}$ aggregates spiked in plasma as an internal quality control (IQC) [24] and our $Aβ_{1-15}$-coated silica nanoparticle (SiNaPs) standard [20]. Additionally, we confirmed the sensitivity and selectivity of the assay for Aβ oligomers in a validation cohort comprising 20 plasma samples of control subjects (Control), mild cognitive impairment (MCI) and AD patients. Exemplary raw data images for the red and green fluorescence channels and colocalization are shown in Fig. 1b. We then applied the assay to a larger set of plasma samples of the DELCODE cohort, which comprises a control group, subjective cognitive decline (SCD), MCI, AD patients and first-degree relatives of AD patients.

sFIDA features high sensitivity and precision

Analytical sensitivity: Quantification of Aβ oligomers in plasma requires extreme sensitivity. Therefore, we initially investigated analytical sensitivity of sFIDA using $Aβ_{1-15}$-coated SiNaPs spiked in plasma and calculated a limit of detection (LOD) of 1.8 fM for the colocalization (Fig. 1c). Dilution linearity of SiNaPs was demonstrated between 2 fM to 8 pM with a mean dilution linearity of 100.6% and coefficient of determination of 0.994. Moreover, an upper limit of quantification (ULOQ) for SiNaPs was determined to be 256 pM, showing a 5-log dynamic range of sFIDA (data not shown). For recombinant Aβ aggregates as IQC, an LOD of 1.9 pg/ml (monomer unit concentration) and a mean dilution linearity of 98.2% was calculated (Fig. 1d). Colocalization enhances the analytical sensitivity by two-fold for SiNaPs and ten-fold for recombinant aggregates compared to the individual channels red and green (Supplementary Fig. 1). Thus, colocalization was used unless otherwise stated. In a small proof-of-concept study including 20 plasma samples of healthy Control, MCI and AD patients, we measured Aβ oligomer concentrations ranging from 0 to 500 fM, confirming sufficient sensitivity of sFIDA for *in vivo* Aβ oligomers (sFIDA readouts in Supplementary Fig. 2a). Moreover, these oligomers showed a similar size distribution and amount of colocalization compared to synthetic Aβ-SiNaPs and aggregates (Fig. 1b). Pre-analytical studies indicated that tube transfers and freeze-thaw-cycles should be avoided (Supplementary Fig. 3).

Intra-assay precision: Mean intra-assay variation of SiNaPs among all concentrations was 9.4% for the red fluorescence channel (IC16 CF633), 4.9% for the green fluorescence channel (Nab228 CF488) and 15.5% for

colocalization based on four replicates (Fig. 1c). Recombinant aggregates showed a mean intra-assay variation of 19.1% for the colocalization (Fig. 1d).

Inter-assay precision: Repeated measurements of SiNaPs spiked in plasma yielded a mean inter-assay variation of 19.3% for all concentrations tested (Fig. 2a). Calibrated concentrations of BC, two IQC and seven plasma samples showed a mean inter-assay variation of 41.9%. Using repeated measures ANOVA, the individual experiments for measurement of SiNaPs, IQC and plasma samples did not differ significantly (*p*-value >0.05).

Aβ oligomer quantification is not influenced by endogenous substances

Recovery and dilution linearity: We spiked three concentrations of SiNaPs in plasma samples from three individual patients to investigate matrix effects and calculated a mean percent recovery of 92% (excluding one concentration/sample) (Supplementary Fig. 4a, b). Additionally, the calibrated concentrations of SiNaPs and aggregates spiked in plasma were not affected by dilution with buffer (Supplementary Fig. 4c, d). The observed negligible effects of the sample matrix in both experiments showed that quantification of Aβ oligomers in individual plasma samples is accurate.

Monomers: In plasma, concentrations of approximately 300 pg/ml $Aβ_{1–40}$ and 20 pg/ml $Aβ_{1–42}$ have been determined [25]. Interference from Aβ monomers on sFIDA measurements was investigated by spiking 452 pg/ml Aβ monomers in a blank plasma sample. As a positive control, the same concentration of aggregated $Aβ_{1–42}$ was used. Monomer samples yielded a signal equivalent to the non-spiked blank control, whereas $Aβ_{1–42}$ aggregates yielded a nearly 100x stronger signal (Fig. 2d), indicating negligible interference from monomeric Aβ at physiologically relevant concentrations in our assay.

HAMAs: A prominent interfering factor in plasma samples is the presence of heterophilic antibodies (HA), especially human anti-mouse-antibodies (HAMAs). These HAMAs are postulated to be present in 5%–40% of plasma samples [26] at concentrations of 1 to 100 ng/ml [27] (refer also to concentration ranges measured with Legend Max ELISA Kit, Biolegend). In sandwich ELISAs, these HAMAs can crosslink capture and detection antibodies, causing false-positive signals [22]. Using mouse monoclonal antibody Nab228 as the capture antibody, as used in previous sFIDA studies [9,28], gave false-positive signals at HA concentrations of 10 ng/ml or higher (Fig. 2e). By changing the capture antibody to bapineuzumab, which is a humanized equivalent to 3D6 [29], interference from the spiked anti-mouse antibody was reduced to <0.005% at the highest concentration tested. Although a false-positive signal was observed at 1000 ng/ml HA, such concentrations are unlikely to be present in human plasma.

Cross-reaction with αSyn and Tau aggregates: We next investigated whether other protein aggregates composed of Tau or αSyn cross-reacted with our Aβ-specific detection system. The presence of αSyn or Tau aggregates gave no false-positive (BC spiked with αSyn or Tau aggregates) or false-negative signals ($Aβ_{1–42}$ aggregates spiked with αSyn or Tau aggregates), as all signals were ±20% from the non-spiked sample (Supplementary Fig. 2b).

Haemolytic plasma: During blood donation, erythrocytes may be damaged, leading to the release of haemoglobin through haemolysis [30]. As erythrocytes bind Aβ [31], their disruption may affect the sFIDA readout. This potential interference was examined by spiking a non-haemolytic sample with different concentrations of haemolytic plasma. Concentrations of 0.5% and 1% of haemolytic plasma produced a higher background signal, but did not affect aggregate detection (Fig. 2e). However, haemolytic plasma at a concentration of 0.5% gave a visibly reddish colour, indicating that these samples should be excluded from analysis.

sFIDA readouts in plasma samples are solely attributed to Aβ oligomers

Immunodepletion: Immunodepletion was used to further demonstrate that the sFIDA-based Aβ oligomer signal does not originate from the plasma matrix. We removed Aβ species using magnetic beads coated with bapineuzumab, and used magnetic beads that were not coated with antibodies as a control. Non-specific immunodepletion reduced the signal for the recombinant aggregates (IQC-1) by 93.1% and on average by 79.8% for patient samples. In contrast, immunodepletion with bapineuzumab reduced the signal for Aβ aggregates by 99.3% and that of the clinical samples by 94.9% for samples above LOD. Moreover, specific immunodepletion with bapineuzumab yielded a lower signal compared to unspecific immunodepletion for almost every sample tested with a mean signal reduction of 50.3% (Fig. 2c).

Detection probe control: The validation cohort was subjected to sFIDA in the absence of detection antibodies to exclude false-positive signals because of plasma sample autofluorescence. The autofluorescence signal was below the LOD for each sample tested with a mean signal reduction of >99% compared to the signal with detection antibodies (data not shown). Possible matrix interferences with IgG detection antibodies in general was investigated by probing plasma samples with an IgG isotype control (MOPC CF633) and an anti-αSyn antibody (211 CF488). The signals of the 20 plasma samples with these non-Aβ-specific probes were also reduced by >97% for the individual channels and colocalization (values of the colocalization are plotted in Supplementary Fig. 2a). Assay specificity was further increased by choosing an assay setup with two different anti-Aβ-probes and analysing only colocalized pixels.

Capture control: As non-specific adherence of Aβ oligomers to surfaces was reported previously [32], we investigated the binding of the analyte to the sFIDA assay surface. In the absence of a capture antibody, SiNaPs and aggregates spiked in plasma showed a signal of 33.5% and 54.7%, respectively. However, the signals of SiNaPs and aggregates spiked in buffer were reduced by >99.9% in absence of a capture antibody (data not shown), indicating that surface binding is mediated by plasma matrix components. Similar to the calibration standards, five plasma samples tested showed non-specific binding of the analyte to the assay surface, indicated by a signal still at 77.2% (data not shown).

Aβ oligomer concentrations in plasma samples are in the low femtomolar range

After analysing the sensitivity and selectivity of the analytical assay and investigating differences among the 20-sample validation cohort, we examined the disease-relevance and correlation with other AD-related biomarkers. Thus, we subjected 359 plasma samples from the DELCODE cohort to sFIDA analysis.

Like the validation cohort, Aβ oligomer concentrations determined in the samples from the DELCODE cohort spanned three orders of magnitude, ranging from 0.4 to 400 fM. Unexpectedly, participants from the control group showed significantly increased plasma Aβ oligomer concentrations compared to SCD (*p*-value: 0.023) and AD patients (*p*-value: 0.037) using Mann-Whitney-U test, whereas samples of first-degree relatives and MCI patients did not show any significant differences (Fig. 3a). Interestingly, after subdividing groups according to their CSF amyloid pathology status (A+/A-), it became evident that oligomer concentrations are reduced in amyloid positive SCD, MCI and AD patients only (Fig. 3b).

Correlations of Aβ oligomers in CSF and plasma depend on cognitive staging, amyloid pathology and ApoE status

We performed several correlation analyses to explore the pathophysiological basis for determining Aβ oligomer concentrations in plasma. We performed bootstrapping (re-sampling with replacement, see statistics) to enhance the reliability of our correlation analysis. Moreover, we grouped Control, relatives and SCD patients as well as MCI and AD patients for correlation analysis to enhance clarity and meaningfulness of our statistical

analyses. No correlations of Aβ oligomers with Aβ monomers in plasma or with age or MMSE were observed (Supplementary Table 1). In contrast, Aβ oligomers in plasma of MCI and AD patients showed a significant correlation with monomeric Aβ in CSF. We also analysed the correlation of Aβ oligomer concentrations in plasma versus CSF, which were recently measured by sFIDA (manuscript in submission by LB, FR and VK). Although oligomer concentrations in Control, relatives and SCD patients showed a direct correlation between CSF and plasma, oligomer concentrations in MCI and AD patients showed an inverse correlation (Fig. 4a). In AD, clearance of Aβ species from the brain is hypothesised to be impaired [2], which is probably dependent on the ApoE ε4 status or TREM-2 mutations affecting microglia activity [33,34]. Thus, we examined the dependency of Aβ oligomers in CSF and plasma on amyloid pathology or ApoE ε4 status. For both Control, relatives and SCD and MCI and AD patient groups, significant correlations were only observed for amyloid negative and ApoE ε4 negative patients, respectively. In contrast, when patients are ApoE ε4 positive or amyloid positive (A+), no significant correlations were found (Fig. 4b, c).

Discussion

In the present study we adapted the sFIDA technology to quantify Aβ oligomers in human plasma samples. We demonstrated femtomolar sensitivity and low inter- and intra-assay variations for SiNaPs spiked in plasma. In contrast, plasma samples showed an increased inter-assay variation suggesting a yet unknown, possibly pre-analytical influence. However, taking into consideration the inherently high inter-assay variations at low concentrations [35], the 3-log difference between individual samples and the limited effect on the individual ranking of the samples, intra-assay variation was considered to be acceptable currently. Nevertheless, intra- and inter-assay variation should be improved by in-depth analyses of pre-analytical influences or applying previously established automation of the sFIDA assay to the plasma protocol [36].

Investigation of possible interfering factors, such as monomers and HAMAs, and analysis of patient plasma samples from the validation cohort confirmed the sensitivity and selectivity of the sFIDA assay for quantification of Aβ oligomers. Although non-specific binding of Aβ oligomers to experimental surfaces did not influence the interpretation of the results, future efforts aim to reduce this issue to avoid signal loss in pre-analytical steps.

As the validation experiments showed the suitability of sFIDA to sensitively and specifically quantitate Aβ oligomers in plasma samples, we investigated Aβ oligomer concentrations in 359 plasma samples of the DELCODE cohort. Remarkably, we observed significantly reduced oligomer concentrations in SCD and AD patients compared to the Control group, which is in contrast to previous studies reporting increased Aβ oligomer concentrations in the plasma of AD patients [15,37,38]. Importantly, most of these previous studies detected different oligomeric sub-species because of the use of structure-specific antibodies [16,39], detection of seeding-competent oligomers [37] or α-sheet content [38], whereas sFIDA quantifies the total amount of Aβ oligomers in plasma. Exploring whether differences in patient enrollment or pre-analytical aspects are responsible for these inconsistencies or alternative subpopulations of Aβ oligomers are measured by different assays is essential, and comparative studies using the same set of samples should be conducted. These varying outcomes across different assay setups emphasize the importance of such investigations.

This study aimed to quantify and better understand the potential origin of total Aβ oligomer concentrations in plasma samples. We observed that monomeric Aβ in plasma did not correlate with Aβ oligomers in plasma, whereas a correlation with CSF monomers and oligomers was observed. This observation indicates that Aβ oligomers, at least partially, originate from CSF (Fig. 5 clearance mechanism #4) or directly from the brain (Fig. 5 clearance mechanism #3). Therefore, it is possible that elevated oligomer concentrations in plasma may result from an increase in oligomer concentrations in CSF. Indeed, we observed a positive correlation of Aβ oligomers between CSF and plasma in Controls, relatives and SCD patients. However, this correlation was only evident

for patients without amyloid pathology (A-) or without the genetic risk factor. We hypothesize that once amyloid positivity becomes evident (A+), Aβ oligomers are preferentially deposited in plaques (clearance mechanism #2), leading to a reduced clearance via other pathways (clearance mechanisms #1, #3, #4). This may explain the absence of a correlation between Aβ oligomers in the CSF and plasma, and the decrease in oligomer concentrations in the plasma of amyloid positive patients. Additionally, impaired clearance mechanisms for Aβ monomers across the BBB, BCSFB and perivascular drainage, and impaired degradation by microglia, have been reported for ApoE ε4 carriers (clearance mechanisms #1 and probably #3 and #4) [10,34]. Assuming similar pathological effects for oligomers, the most likely clearance mechanism in ApoE ε4 carriers is the deposition of Aβ oligomers into plaques (clearance mechanism #2), which limits the transport and results in a weaker correlation between CSF and plasma.

When interpreting correlations of Aβ oligomers between CSF and plasma in MCI and AD patients, it is important to consider previous sFIDA studies that have quantified Aβ oligomers in CSF. These studies have shown that Aβ oligomer concentrations in CSF are highest in the early stages of the disease and decrease as the disease progresses, particularly in ApoE ε4 carriers who have a higher Aβ oligomer burden during the early stages of the disease (manuscript in submission by LB, FR, and VK). Decreasing concentrations of oligomers in CSF in advanced disease stages may arise from negative feedback mechanisms initiated by Aβ oligomers at synapses, resulting in reduced synaptic activity and consequently reduced production of Aβ monomers and replenishment of Aβ oligomers. Additionally, enhanced clearance through other pathways, such as deposition in plaques (clearance mechanism #2) or transport to the blood in a CSF-independent manner, may also contribute to reduced oligomer concentrations in CSF. We observed an inverse correlation of Aβ oligomer concentrations in CSF and plasma indicating an impaired clearance via CSF pathways (clearance mechanism #4) and an uncoupling of Aβ oligomer concentrations in blood and CSF. Moreover, this correlation was not observed for ApoE ε4 carriers, which supports the idea that ApoE ε4 plays a role in transporting Aβ oligomers from the brain and thus an increase in oligomer concentrations in CSF for these carriers. However, these are only a few factors that influence Aβ oligomer clearance. Activation of microglia have also been associated with TREM-2 variants [33], which should be analyzed in future studies, as well as the weakly pronounced differences in oligomer concentrations and correlations, which has previously been observed in studies measuring plasma Aβ monomer concentrations [40]. Moreover, monomer concentrations in plasma were reported to depend on co-pathologies like hypertension, dyslipidemia, diabetes, liver function and chronic kidney disease [41]. These co-pathologies might be determinants of Aβ oligomer concentrations in plasma and should be considered in future studies.

Full interpretation of the results requires a better understanding of how Aβ oligomers are distributed and cleared from the brain and peripheral tissues during disease progression. Although the developed assay accurately measures total Aβ oligomer concentrations in plasma, the potential for using Aβ oligomers as a diagnostic biomarker has not been fully exploited and warrants further research and development. In particular, concentration and distribution analysis of different body fluids, such as novel matrices like stool [42], may improve our understanding of oligomer distributions in peripheral tissues. Owing to their central role in AD pathology, oligomers are an attractive therapeutic target to prohibit disease progression or even cure AD [43]. In pre-clinical and clinical development of anti-oligomer compounds, sFIDA is well suited to determine target engagement and to monitor therapeutic success at the molecular level.

Acknowledgements

We thank Dr. Carsten Korth (Institute of Neuropathology, Universitätsklinikum Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany) who kindly provided the IC16 antibody. We thank Dr. Volker Nischwitz (Central Institute of Engineering, Electronics and Analytics (ZEA-3), Forschungszentrum Jülich, 52428 Jülich, Germany) for ICP-MS

measurements of silica nanoparticles. We thank Dr. Andrew Dingley for proof-reding the manuscript. This work was supported by the Helmholtz Association [grant number HVF0079].

Author contributions

LB developed the assay with support of MP. LB performed the experiments and LB and FR analysed the data and carried out the statistics. VK, AC and TB aid in experimental work and evaluation of the data. JK supported organization of the samples. LB, OB and DW wrote the manuscript. OB, DW and OP supervised the project. OP, SDF, LSS, LP, JP, EJS, SA, AS, KL, JF, NH, FJ, AR, ED, WG, EII, KB, DJ, MW, RP, BSR, ST, IK, CL, MHM, AS, NR, MTH, FB, MW, SR, AR, MS were responsible for overall design, implementation and collection of data for the DELCODE study at the respective study sites. All authors approved the final version of this manuscript.

Disclosure

DW and OB are co-founders and shareholders of attyloid GmbH. This affiliation had no influence of the interpretation of the data. All other authors declare no competing interests related to this work.

Online Methods

SiNaPs

We used our previously developed silica nanoparticle standard (SiNaPs) as an assay control and for calibration. SiNaPs are small, spherical particles with a diameter of ~18.5 nm, which are functionalized with amino acids 1–15 of the Aβ peptide. Synthesis and characterization of the particles have been described previously [20,21]. The silica core of the particles was synthesized via the Stöber process and subsequently modified with APTES (3-aminopropyl(triethoxysilane), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) to create an aminated surface. As a crosslinker between protein and aminated particles, we used maleimido hexanoic acid (MIHA, abcr, Karlsruhe, Germany), which was activated using EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, Sigma-Aldrich) and NHS (N-hydroxysuccinimide, Sigma-Aldrich). After washing, $A\beta_{1-15}$ (Peptides and Elephants, Henningsdorf, Germany) functionalized with cysteamine at the C-terminus was reacted with the maleimide group of SiNaPs to form a covalent attachment. $A\beta_{1-15}$ was added to achieve a theoretical protein load of ~18 $A\beta_{1-15}$ peptides per SiNaP. After 1 h, TCEP (Tris-(2-carboxyethyl)-phosphine, abcr, Karlsruhe, Germany) was added to prevent oxidation of the cysteamine-functionalized protein, and 1 h later, the reaction was terminated by adding 2-mercaptoethanol. SiNaPs were washed twice with ddH_2O. Prior to use, SiNaPs were subjected to ultrasonication for 15 s at 50% amplitude with a 1 s pulse - 1 s pause cycle.

Aggregates

Aβ aggregates: $A\beta_{1-42}$ was purchased from Bachem AG (Bubendorf, Switzerland). 50 µg aliquots of $A\beta_{1-42}$ were dissolved in 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP, Sigma-Aldrich) and divided in 5 µg aliquots. HFIP was then evaporated in a vacuum concentrator (Vacufuge concentrator, Eppendorf, Hamburg, Germany) and stored at RT. 5 µg of $A\beta_{1-42}$ was dissolved in 5 µl dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) for 10 min with shaking at 650 rpm (Thermomixer, Eppendorf). PBS and 1% sodium azide (AppliChem, Darmstadt, Germany) were added to achieve a concentration of 10 µM $A\beta_{1-42}$ containing 0.04% sodium azide. $A\beta_{1-42}$ was allowed to aggregate for 16 h at RT with shaking at 650 rpm. Aggregates were used directly or stored at –80 °C in 5 µl aliquots. Aβ aggregates have previously been characterized in Pils et al. [24].

αSyn aggregates: αSyn (expressed and purified in-house) was dissolved to 1 mg/ml in 20 mM Tris-HCl containing 100 mM sodium chloride (pH 7.4) and incubated for seven days at 37 °C with shaking at 1000 rpm.

Aggregates were then sonicated for 60 s in 15 s intervals with a 1 s sonication pulse and a 1 s pause. Aggregates were aliquoted and stored at –80 °C.

Tau aggregates: Full-length Tau (expressed and purified in-house) was dissolved in TBS buffer (Serva, Duisburg, Germany) containing 10-fold excess TCEP. Tau was centrifuged at 18213 *g* for 1 h at RT and the Tau concentration in the supernatant was determined using UV-Vis spectroscopy. For aggregation, 8 µM heparin and 0.05% sodium azide were added to 15 µM Tau. The mixture was incubated at 37 °C with shaking at 300 rpm every 10 min for 10 days.

Fluorescent antibodies

Fluorescently labelled detection antibodies were used for detection of SiNaPs and aggregates. IC16 (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) was labelled with a red-fluorescent dye (CF633, Sigma-Aldrich), whereas Nab228 (Sigma-Aldrich) was labelled with a green-fluorescent dye (CF488, Sigma-Aldrich). The labelling process, the determination of concentration and degree of labelling are described in the manufacturer's protocol. Purification was carried out with a polyacrylamide bead suspension (Bio-Gel P-30, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

Assay setup

Greiner BioOne 384 well plates (Kremsmünster, Austria) were used to ensure an adequate sample and replicate number within one assay. The biochemical principle of sFIDA was described previously[19]. For capturing, 40 µl of the humanized monoclonal antibody bapineuzumab (ProteoGenix, Schiltigheim, France) was used at a concentration of 0.625 µg/ml in 0.1 M carbonate buffer (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) overnight at 4 °C. Wells were washed using an automated microplate washer (405 LS Microplate Washer, BioTec, VT, USA), with five washing cycles with 80 µl TBS-T (TBS (Serva) containing 0.05% Tween (AppliChem)) and five washing cycles with 80 µl TBS. Washing with TBS-T and TBS was performed after each incubation step. After washing, the remaining binding sites were blocking using 0.5% BSA (AppliChem) in TBS containing 0.03% ProClin (Sigma-Aldrich) for 1.5 h at RT. After washing, we first applied 15 µl of LowCross buffer strong (Candor Bioscience, Wangen, Germany) to the wells to reduce matrix effects and then added 15 µl sample or SiNaPs and aggregates spiked in plasma. Samples were centrifuged at 2500 *g* for 5 min prior to analysis. The supernatant was transferred to a new tube and incubated on the plate for 2 h at RT. Fluorescently labelled IC16 CF633 and Nab228 CF488, each at 0.625 µg/ml in TBS containing 0.03% ProClin were first diluted in 0.1% BSA and 0.05% Tween and then centrifuged for 1 h at 100'000 xg. For detection, 20 µl per well of the probes were incubated for 1 h at RT. The TBS buffer was exchanged with 80 µl TBS-ProClin prior to measurement to prevent bacterial growth during measurement and storage. Calibration standards (SiNaPs and aggregates) were spiked and analysed in plasma to prevent plasma matrix effects on the calibration of the results.

Influence of monomeric $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$: $A\beta_{1-40}$ was dissolved at 0.1 µg/ml in HFIP, whereas $A\beta_{1-42}$ was dissolved to 10 µM (approximately 45 µg/ml) and shaken for 24 h at RT and 600 rpm. Prior to analysis, monomeric Aβ was diluted to 25 nM in LowCross buffer strong and then to 100 pM in plasma.

Influence of heterophilic anti-mouse antibodies (HAMAs): HAMA interference was analysed by spiking different concentrations of goat anti-mouse antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in neat plasma. In addition to the capture antibody bapineuzumab, the Nab228 antibody was coated at 2.5 µg/ml in 0.1 M carbonate buffer to the glass surface to compare their HAMA interference in sFIDA.

Influence of haemolysis: Non-haemolytic plasma was spiked with different concentrations of haemolytic plasma to examine the effects of red blood cell haemolysis on assay results. Haemolytic plasma was prepared by freezing whole blood at –80 °C for 24 h and centrifugation at 1200 *g* for 15 min after thawing. Plasma prepared using this procedure is referred to as 100% haemolytic.

Measurement

Measurement of the sFIDA assay surface was performed using total internal reflection microscopy (TIRF-M, Leica DMI6000B, Wetzlar, Germany) with 100x magnification, as described previously (excitation: 635 nm, emission filter: 705 nm; excitation: 488 nm, emission filter: 525 nm; exposure time both channels: 1000 ms; gain 1300) [36]. Each image consisted of 1,000,000 pixels (1,000 x 1,000 pixels) and in total, 100 images per sample (25 images per well) were measured, which covers 3.14% of the total well surface.

For measurement and calibration of the DELCODE cohort plasma samples, a third fluorescence channel was added (excitation: 405 nm, emission filter: 450 nm) for automated detection and elimination of artificial pixels, as described in statistics.

sFIDAta

The in-house software tool sFIDAta was used for analysis of the images. sFIDAta enables automated detection and elimination of artefact-containing images and counting of pixel above a cutoff value. The cutoff value is defined as the grey-scale value, at which a predefined number of pixels in the blank control are counted and is determined individually for each fluorescence channel and for each experiment to compensate for fluorescence fluctuations. For analysis, a cutoff value of 0.05% (blank control exceeds 500 pixel) was chosen. PixelCount refers to the average number of pixels in an image above the cutoff value for each fluorescent channel, whereas the sFIDA readout describes the number of colocalized pixels that exceed the cutoff value in both fluorescence channels. Min-max filtering was applied to prevent possible remaining artificial images influencing outcomes after artefact detection. Min-max filtering excluded 10% of images per well with the highest fluorescence and 10% of images per well with the lowest PixelCounts [21].

The measurement procedure was extended by an additional step for analysis of DELCODE cohort samples and for inter-assay measurements. After using a red laser (635 nm) and a green laser (488 nm) to detect the IC16 CF633 and Nab228 CF488 antibodies, respectively, a blue laser (405 nm) was used, which does not target any specific antibody. By comparing the colocalized signals with the signals resulting from the blue laser, artificial autofluorescence signals can be detected and removed. This was performed by subtracting the number of autofluorescence pixels above the calculated cutoff from the number of colocalized pixels (corrected sFIDA readouts).

Statistics

Statistical analyses were performed using Excel 2020 (Microsoft corporation, Redmond, USA), Matlab 2019b (The MathWorks, Natick, USA), OriginPro 2020 (OriginLab Corporation, Northhampton, USA) and python 3.9.7 (Python software foundation, Wilmington, USA; packages: pandas 1.3.4, scipy 1.7.1, seaborn 0.11.2).

Intra-assay precision: The PixelCount, coefficient of variation (CV %) and the sFIDA readout were calculated based on the mean value and standard deviation of the four replicates.

Calibration: Linear regression was performed for dilution experiments and to determine the concentration of aggregates in plasma samples. To this end, PixelCounts of the silica nanoparticles and the aggregate standards were weighted with 1/readout.

Corrected sFIDA readouts were used for calibration of DELCODE plasma samples: Based on these adjusted PixelCounts, the calibration of the samples was carried out using the SiNaPs dilution series between 0 and 125 fM for each of the six plates. After regression, the y-intercept of the regression models was subtracted from the respective calibrated values.

The limit of detection (LOD) and die lower limit of quantification (LLOQ) is described in Eq. (1) and (2) and subsequently converted to a molar concentration using linear regression.

$$LOD\ [pixel] = PixelCount\ (blank\ control) + 1\sigma \quad (1)$$

$$LLOQ\ [pixel] = PixelCount\ (blank\ control) + 10\sigma \quad (2)$$

Analysis of the assay controls is mainly based on colocalization (sFIDA readout).

Inter-assay precision: Inter-assay precision was calculated among six individual experiments. Inter-assay variation for SiNaPs was calculated based on the mean coefficient of variation (CV %) for each concentration and thereafter by calculating the mean among the whole calibration curve. For inter-assay variation of aggregates and samples, we first determined the molar concentrations and afterwards proceeded as described above for inter-assay variation of SiNaPs. The potential significance of experimental differences was further examined by performing ANOVA of repeated measurements for SiNaPs, aggregates and samples with a 5% level of significance.

Dilution linearity: Two-fold dilutions were performed to analyse the influence of dilution on the calibration standard and a simulated plasma sample (aggregates spiked in plasma). sFIDA readouts were calibrated to molar concentrations and corrected by the dilution factor.

Tube transfer: For analysis of the effect of repeated tube transfers on sFIDA readout, 100 µl of plasma were transferred to a new tube, incubated for 5 min at RT and transferred once again (repeated according to the number of tube transfers).

Spike and recovery: A blank plasma sample (reference) and three plasma samples of Control, MCI or AD patients were analysed directly (unspiked) and after spiking with a low (31.3 fM), medium (250 fM) and high (2 pM) concentration of $A\beta_{1-15}$ SiNaPs. Recovery was calculated based on Eq. 3:

$$Recovery[\%] = \frac{sFIDA\ Readout_{spiked\ sample} - sF\quad Readout_{non-spike\ \ sample}}{sFIDA\ Readout_{spiked\ BC} - sFID\quad Readout_{non-spike\ \ BC}} \quad (3)$$

Pre-analytical and selectivity studies: The effect of freeze-thaw cycles was evaluated using aliquots of six plasma samples, which were thawed repeatedly for 2 h at RT and frozen again [44]. The remaining signal (recovery) and signal reduction for sFIDA readouts of tube transfer, capture control (CC), autofluorescence control (AF), other probes (OP) and immunodepletion (IP) was calculated according to Eq. 4 and Eq. 5 directly, whereas PixelCounts were initially normalized with the blank control.

$$Recovery\ and\ remaining\ signal\ [\%] = \frac{sFIDA\ readout_{assay\ control}}{sFIDA\ readout_{reference}} * 100\% \quad (4)$$

$$signal\ reduction\ [\%] = 100\% - remaining\ signal[\%] \quad (5)$$

DELCODE plasma samples: After calibration, samples below the LOD were set to zero. Calibrated concentrations were first tested for normal distribution. For non-normally distributed data, non-parametric tests like Mann-Whitney-U test and Spearman correlation tests were performed.

Bootstrapping: For testing the significance of the Spearman correlation, bootstrapping was applied to all samples with Aβ oligomer concentrations above LOD. This was achieved by performing 5000 replications of the bootstrapping with replacement and calculating the mean Spearman *r* value of the results. After normalization of the standard deviation, bootstrapping *p*-values were calculated using a normal distribution.

Plasma samples

Plasma of validation cohort: Samples of Control, MCI and AD patients were kindly provided by the working group of Oliver Peters at Charité Berlin from patients. Plasma samples were centrifuged, aliquoted to 500 µl and stored at –80 °C. Samples did not undergo a freeze-thaw cycle prior to analysis. Written, informed consent was obtained from all participants. The number for ethical approval of the Charité Berlin was EA2/118/15.

Plasma of DELCODE cohort: Plasma samples were collected as part of the multicentre DZNE-Longitudinal Cognitive Impairment and Dementia Study (DELCODE) at ten clinical centres in Germany, according to a standard operating procedure. After processing, plasma samples were stored at –80 °C [45]. The project was approved by the ethical committee of the Charité Berlin (EA1/074/21 and EA4/066/17).

We received plasma samples from 429 patients, including healthy Controls (*n* = 44), SCD (*n* = 148), MCI (*n* = 92), AD patients (*n* = 52) and first-degree relatives of AD patients (*n* = 30). Sixty-two samples were excluded from analysis because of contamination in one experiment, one sample was excluded because of missing data and seven samples were excluded because of haemolysis. Besides testing cognitive function using different neuropsychological tests (i.e., mini mental state examination (MMSE), Alzheimer's disease assessment scale (ADAS), clinical dementia rating), CSF and plasma biomarkers like $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$, tau phosphorylated at threonine 181 (pTau) and total tau (tTau) were determined. Information on patient selection, sampling of blood and CSF, neuropathological tests and biomarker quantification are described in Jessen et al. [45]. Subdivision of patient groups by amyloid pathology is based on the $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ ratio with previously established limits [46].

References

1 Cummings, J. *et al.* Alzheimer's disease drug development pipeline: 2022. *Alzheimers Dement (N Y)* **8**, e12295 (2022). https://doi.org:10.1002/trc2.12295

2 Cline, E. N., Bicca, M. A., Viola, K. L. & Klein, W. L. The Amyloid-β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *J Alzheimers Dis* **64**, S567-s610 (2018). https://doi.org:10.3233/jad-179941

3 Hampel, H. *et al.* The Amyloid-β Pathway in Alzheimer's Disease. *Molecular Psychiatry* **26**, 5481-5503 (2021). https://doi.org:10.1038/s41380-021-01249-0

4 Mroczko, B., Groblewska, M., Litman-Zawadzka, A., Kornhuber, J. & Lewczuk, P. Amyloid beta oligomers (AbetaOs) in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* **125**, 177-191 (2018). https://doi.org:10.1007/s00702-017-1820-x

5 Hladky, S. B. & Barrand, M. A. Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence. *Fluids Barriers CNS* **11**, 26 (2014). https://doi.org:10.1186/2045-8118-11-26

6 Holtta, M. *et al.* Evaluating amyloid-beta oligomers in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease. *PLoS One* **8**, e66381 (2013). https://doi.org:10.1371/journal.pone.0066381

7 Savage, M. J. *et al.* A sensitive abeta oligomer assay discriminates Alzheimer's and aged control cerebrospinal fluid. *J Neurosci* **34**, 2884-2897 (2014). https://doi.org:10.1523/JNEUROSCI.1675-13.2014

8 Herskovits, A. Z., Locascio, J. J., Peskind, E. R., Li, G. & Hyman, B. T. A Luminex assay detects amyloid beta oligomers in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. *PLoS One* **8**, e67898 (2013). https://doi.org:10.1371/journal.pone.0067898

9 Wang-Dietrich, L. *et al.* The amyloid-beta oligomer count in cerebrospinal fluid is a biomarker for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **34**, 985-994 (2013). https://doi.org:10.3233/JAD-122047

10 Xin, S. H., Tan, L., Cao, X., Yu, J. T. & Tan, L. Clearance of Amyloid Beta and Tau in Alzheimer's Disease: from Mechanisms to Therapy. *Neurotox Res* **34**, 733-748 (2018). https://doi.org:10.1007/s12640-018-9895-1

11 Wang, J., Gu, B. J., Masters, C. L. & Wang, Y. J. A systemic view of Alzheimer disease - insights from amyloid-β metabolism beyond the brain. *Nat Rev Neurol* **13**, 612-623 (2017). https://doi.org:10.1038/nrneurol.2017.111

12 Liu, L. *et al.* An ultra-sensitive immunoassay detects and quantifies soluble Aβ oligomers in human plasma. *Alzheimers Dement* **18**, 1186-1202 (2022). https://doi.org:10.1002/alz.12457

13 An, S. S. A. *et al.* Dynamic changes of oligomeric amyloid β levels in plasma induced by spiked synthetic Aβ(42). *Alzheimers Res Ther* **9**, 86 (2017). https://doi.org:10.1186/s13195-017-0310-6

14 Dominguez, J. C. *et al.* Multimer Detection System-Oligomerized Amyloid Beta (MDS-OAβ): A Plasma-Based Biomarker Differentiates Alzheimer's Disease from Other Etiologies of Dementia. *Int J Alzheimers Dis* **2022**, 9960832 (2022). https://doi.org:10.1155/2022/9960832

15 Xia, W. *et al.* A specific enzyme-linked immunosorbent assay for measuring beta-amyloid protein oligomers in human plasma and brain tissue of patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol* **66**, 190-199 (2009). https://doi.org:10.1001/archneurol.2008.565

16 Santos, A. N., Simm, A., Holthoff, V. & Boehm, G. A method for the detection of amyloid-beta1-40, amyloid-beta1-42 and amyloid-beta oligomers in blood using magnetic beads in combination with Flow cytometry and its application in the diagnostics of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **14**, 127-131 (2008). https://doi.org:10.3233/jad-2008-14201

17 Kurz, C., Walker, L., Rauchmann, B. S. & Perneczky, R. Dysfunction of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease: Evidence from human studies. *Neuropathol Appl Neurobiol* **48**, e12782 (2022). https://doi.org:10.1111/nan.12782

18 Kulawik, A., Heise, H., Zafiu, C., Willbold, D. & Bannach, O. Advancements of the sFIDA method for oligomer-based diagnostics of neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* **592**, 516-534 (2018). https://doi.org:10.1002/1873-3468.12983

19 Herrmann, Y. *et al.* Nanoparticle standards for immuno-based quantitation of alpha-synuclein oligomers in diagnostics of Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Clin Chim Acta* **466**, 152-159 (2017). https://doi.org:10.1016/j.cca.2017.01.010

20 Hülsemann, M. *et al.* Biofunctionalized Silica Nanoparticles: Standards in Amyloid-beta Oligomer-Based Diagnosis of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* **54**, 79-88 (2016). https://doi.org:10.3233/JAD-160253

21 Bloemeke, L. *et al.* Quantitative detection of alpha-Synuclein and Tau oligomers and other aggregates by digital single particle counting. *NPJ Parkinsons Dis* **8**, 68 (2022). https://doi.org:10.1038/s41531-022-00330-x

22 Sehlin, D. *et al.* Interference from heterophilic antibodies in amyloid-beta oligomer ELISAs. *J Alzheimers Dis* **21**, 1295-1301 (2010). https://doi.org:10.3233/jad-2010-100609

23 Kulenkampff, K., Wolf Perez, A.-M., Sormanni, P., Habchi, J. & Vendruscolo, M. Quantifying misfolded protein oligomers as drug targets and biomarkers in Alzheimer and Parkinson diseases. *Nature Reviews Chemistry* **5**, 277-294 (2021). https://doi.org:10.1038/s41570-021-00254-9

24 Pils, M. *et al.* Development and Implementation of an Internal Quality Control Sample to Standardize Oligomer-Based Diagnostics of Alzheimer’s Disease. *Diagnostics* **13**, 1702 (2023). https://doi.org:10.3390/diagnostics13101702

25 Janelidze, S. *et al.* Plasma β-amyloid in Alzheimer's disease and vascular disease. *Sci Rep* **6**, 26801 (2016). https://doi.org:10.1038/srep26801

26 Vanderstichele, H., Stoops, E., Vanmechelen, E. & Jeromin, A. Potential sources of interference on Abeta immunoassays in biological samples. *Alzheimers Res Ther* **4**, 39 (2012). https://doi.org:10.1186/alzrt142

27 Mohammadi, M. M. & Bozorgi, S. Investigating the presence of human anti-mouse antibodies (HAMA) in the blood of laboratory animal care workers. *Journal of Laboratory Medicine* **43**, 87-91 (2019). https://doi.org:doi:10.1515/labmed-2018-0084

28 Kravchenko, K. *et al.* Analysis of anticoagulants for blood-based quantitation of amyloid beta oligomers in the sFIDA assay. *Biol Chem* **398**, 465-475 (2017). https://doi.org:10.1515/hsz-2016-0153

29 Miles, L. A., Crespi, G. A., Doughty, L. & Parker, M. W. Bapineuzumab captures the N-terminus of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide in a helical conformation. *Sci Rep* **3**, 1302 (2013). https://doi.org:10.1038/srep01302

30 Hsieh, S.-Y., Chen, R.-K., Pan, Y.-H. & Lee, H.-L. Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low-molecular-weight serum/plasma proteome profiling. *PROTEOMICS* **6**, 3189-3198 (2006). https://doi.org:https://doi.org/10.1002/pmic.200500535

31 Kuo, Y. M. *et al.* Amyloid-beta peptides interact with plasma proteins and erythrocytes: implications for their quantitation in plasma. *Biochem Biophys Res Commun* **268**, 750-756 (2000). https://doi.org:10.1006/bbrc.2000.2222

32 Willemse, E. *et al.* How to handle adsorption of cerebrospinal fluid amyloid β (1-42) in laboratory practice? Identifying problematic handlings and resolving the issue by use of the Aβ(42)/Aβ(40) ratio. *Alzheimers Dement* **13**, 885-892 (2017). https://doi.org:10.1016/j.jalz.2017.01.010

33 Gratuze, M., Leyns, C. E. G. & Holtzman, D. M. New insights into the role of TREM2 in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* **13**, 66 (2018). https://doi.org:10.1186/s13024-018-0298-9

34 Yamazaki, Y., Zhao, N., Caulfield, T. R., Liu, C. C. & Bu, G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat Rev Neurol* **15**, 501-518 (2019). https://doi.org:10.1038/s41582-019-0228-7

35 Horwitz, W. & Albert, R. The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *J AOAC Int* **89**, 1095-1109 (2006). https://doi.org:10.1093/jaoac/89.4.1095

36 Herrmann, Y. *et al.* sFIDA automation yields sub-femtomolar limit of detection for Abeta aggregates in body fluids. *Clin Biochem* **50**, 244-247 (2017). https://doi.org:10.1016/j.clinbiochem.2016.11.001

37 Wang, M. J. *et al.* Oligomeric forms of amyloid-β protein in plasma as a potential blood-based biomarker for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* **9**, 98 (2017). https://doi.org:10.1186/s13195-017-0324-0

38 Shea, D. *et al.* SOBA: Development and testing of a soluble oligomer binding assay for detection of amyloidogenic toxic oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **119**, e2213157119 (2022). https://doi.org:10.1073/pnas.2213157119

39 Zhou, L. *et al.* Plasma amyloid-β oligomers level is a biomarker for Alzheimer's disease diagnosis. *Biochem Biophys Res Commun* **423**, 697-702 (2012). https://doi.org:10.1016/j.bbrc.2012.06.017

40 Olsson, B. *et al.* CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* **15**, 673-684 (2016). https://doi.org:10.1016/S1474-4422(16)00070-3

41 O'Bryant, S. E., Petersen, M., Hall, J. & Johnson, L. A. Medical comorbidities and ethnicity impact plasma Alzheimer's disease biomarkers: Important considerations for clinical trials and practice. *Alzheimers Dement* (2022). https://doi.org:10.1002/alz.12647

42 Schaffrath, A. *et al.* Patients with isolated REM-sleep behavior disorder have elevated levels of alpha-synuclein aggregates in stool. *npj Parkinson's Disease* **9**, 14 (2023). https://doi.org:10.1038/s41531-023-00458-4

43 Kutzsche, J. *et al.* Safety and pharmacokinetics of the orally available antiprionic compound PRI-002: A single and multiple ascending dose phase I study. *Alzheimers Dement (N Y)* **6**, e12001 (2020). https://doi.org:10.1002/trc2.12001

44 Andreasson, U. *et al.* A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. *Front Neurol* **6**, 179 (2015). https://doi.org:10.3389/fneur.2015.00179

45 Jessen, F. *et al.* Design and first baseline data of the DZNE multicenter observational study on predementia Alzheimer's disease (DELCODE). *Alzheimers Res Ther* **10**, 15 (2018). https://doi.org:10.1186/s13195-017-0314-2

46 Jessen, F. *et al.* Subjective cognitive decline and stage 2 of Alzheimer disease in patients from memory centers. *Alzheimers Dement* (2022). https://doi.org:10.1002/alz.12674

47 Lucey, B. P. & Bateman, R. J. Amyloid-β diurnal pattern: possible role of sleep in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiology of Aging* **35**, S29-S34 (2014). https://doi.org:https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.035

48 Lucey, B. P. *et al.* Effect of sleep on overnight cerebrospinal fluid amyloid β kinetics. *Ann Neurol* **83**, 197-204 (2018). https://doi.org:10.1002/ana.25117

Figures and Tables

Table 1 Demographic information and biomarker concentrations of participants from the DELCODE cohort (mean ± standard deviation; SCD: subjective cognitive decline, MCI: mild cognitive impairment, AD: Alzheimer's Disease)

	Controls	Relatives	SCD	MCI	AD
Patient information					
number	44	30	146	88	51
% female	45%	63%	42%	45%	67%
Age [years]	68.7 ± 5.2	65.7 ±5.0	70.8 ± 6.0	71.4 ± 5.0	75.9 ± 5.7
Education [years]	14.5 ± 2.5	14.4 ± 2.7	15.2 ± 2.8	13.6 ±2.8	13.1 ± 3.1
MMSE	29.6 ± 0.6	29.2 ± 1.1	29.2 ± 1.1	27.5 ± 2.0	23.2 ± 3.3
ApoE ε4 positive	8 (18.2%)	11 (36.7%)	46* (31.5%)	40* (46.0%)	31* (60.8%)
CSF biomarkers					
$A\beta_{1-40}$ [pg/ml]	9321.1 ± 2617.7	8675.0 ± 2412.6	8679.5 ± 2213.3	8158.6 ± 2378.5	8179.5 ± 2475.2
$A\beta_{1-42}$ [pg/ml]	875.2 ± 344.4	903.6 ± 353.1	808.6 ± 355.3	604.7 ± 309.7	426.6 ± 211.9
$A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$	0.094 ± 0.024	0.103 ± 0.024	0.092 ± 0.028	0.075 ± 0.030	0.053 ± 0.018
tTau [pg/ml]	413.3 ± 185.1	333.0 ± 135.9	379.1 ± 194.3	532.5 ± 287.4	744.2 ± 344.2
pTau [pg/ml]	54.9 ± 22.6	49.8 ± 20.3	55.9 ± 24.1	69.7 ± 43.3	89.7 ± 34.1
Plasma biomarkers					
$A\beta_{1-40}$ [pg/ml]	76.9 ± 18.7	74.6 ± 19.0	84.3 ± 20.0	86.1 ± 20.8	94.5 ± 28.0
$A\beta_{1-42}$ [pg/ml]	8.8 ± 1.9	8.5 ± 1.7	9.1 ± 1.9	8.5 ± 2.1	9.1 ± 2.5
$A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$	0.117 ± 0.022	0.115 ± 0.013	0.110 ± 0.015	0.099 ± 0.014	0.094 ± 0.019

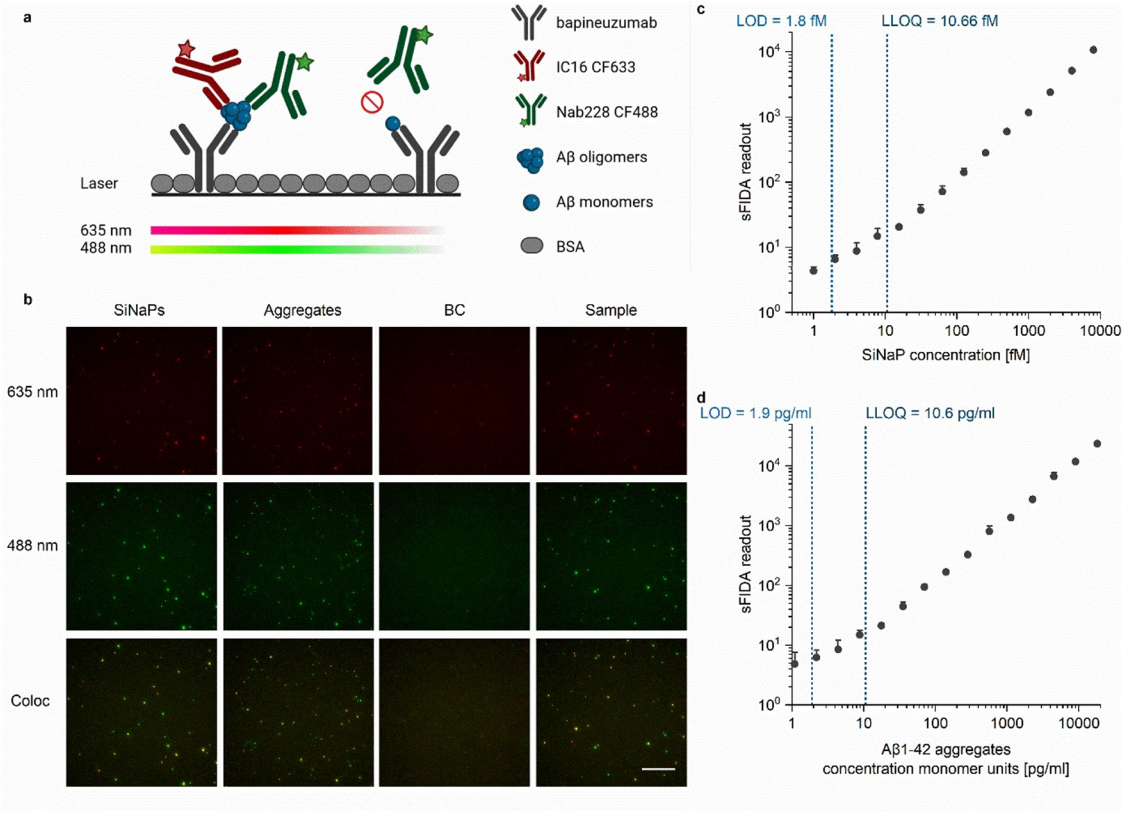


Fig. 1 Principle of sFIDA setup, imaging and calibration. **a** The biochemical principle of sFIDA is similar to a sandwich ELISA with capture and detection antibodies directed against overlapping epitopes of the Aβ N-terminus. Therefore, monomers can be captured but not detected as the epitope is already occupied. After preparation, the assay surface is imaged using dual colour fluorescence microscopy (635 and 488 nm, respectively). *Created with biorender.com* **b** Exemplary images of 500 fM SiNaPs coated with $Aβ_{1–15}$, aggregates composed of 564 pg/ml $Aβ_{1–42}$, a blank plasma (blank control, BC) and an AD plasma sample for the red (illumination with 635 nm) and green (illumination with 488 nm) fluorescence channels and colocalization. For imaging, the gray-scale value of 14-bit images was adjusted to min and max values of 750 and 7500, respectively. The scale bar is 25 µm. **c** Calibration curve of 1 fM to 8 pM $Aβ_{1–15}$ SiNaPs for the colocalization. **d** Dilution series of $Aβ_{1–42}$ aggregates consisting of 1.1 to 18,060 pg/ml $Aβ_{1–42}$ monomers. The standard deviation was calculated across the four replicates. Limit of detection (LOD) and lower limit of quantification (LLOQ) were calculated as BC with a single- or ten-fold standard deviation. Please note the logarithmic scale.

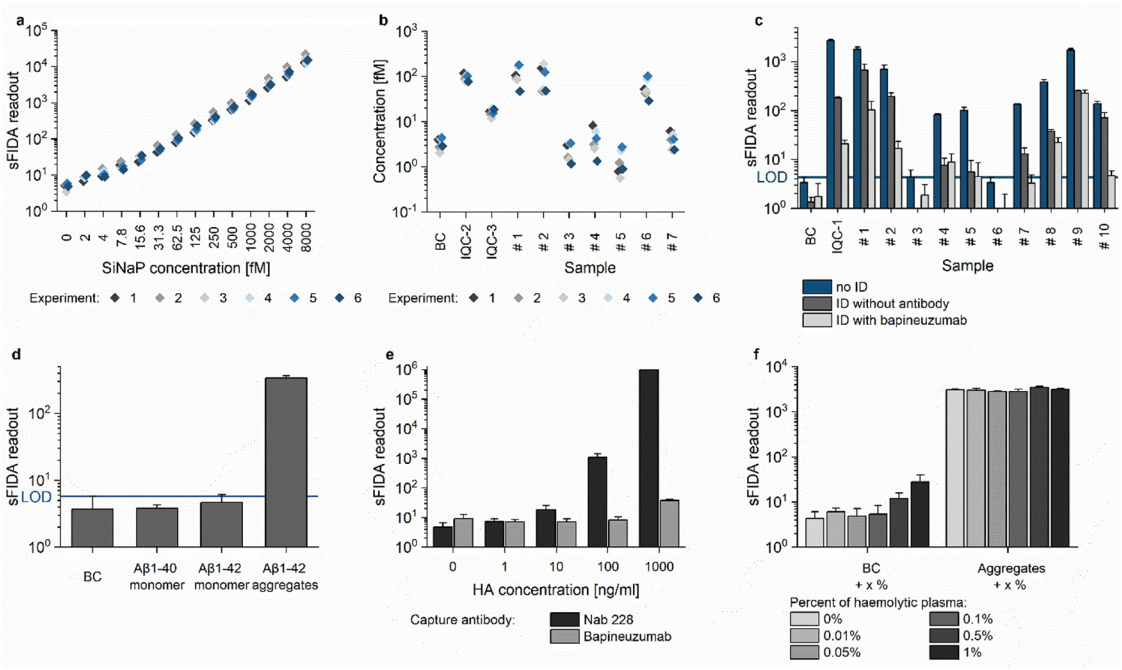


Fig. 2 Inter-assay variation (a, b) and specificity controls for Aβ oligomer quantification in plasma (c-f). a Repeated preparation of SiNaP calibration in six individual experiments showed an inter-assay variation of 19.3%. **b** Repeated measurements of seven samples of the validation cohort, a blank plasma (BC) and two internal quality controls (IQC, refers to aggregates at 141 pg/ml (IQC-2) and 17.6 pg/ml $Aβ_{1–42}$ monomers (IQC-3), respectively) were calibrated and mean inter-assay variation was calculated as 41.9%. **c** A blank control, $Aβ_{1–42}$ aggregates (IQC-1 with 18 ng/ml $Aβ_{1–42}$ monomer concentration) and 10 plasma samples of Control, MCI and AD patients were subjected to immunodepletion (ID). Unspecific ID (beads without antibody conjugation) resulted in a signal reduction to 6.9% for IQC-1 and to 20.2% for plasma samples for signals above the LOD (limit of detection). However, with specific immunodepletion using bapineuzumab, the signal of IQC-1 was eliminated (signal <1% compared to the non-depleted sample) and that of the samples was reduced on average to 5.1%. **d** Blank plasma (BC) was spiked with 452 pg/ml of $Aβ_{1–40}$, $Aβ_{1–42}$ monomer and aggregates formed from 452 pg/ml $Aβ_{1–42}$ monomer. Samples were analysed by sFIDA. **e** Plasma was spiked with different concentrations of heterophilic antibody (HA) and analysed in two different assay setups, i.e., with monoclonal mouse antibody Nab228 as the capture antibody or with monoclonal humanized antibody bapineuzumab, respectively, to investigate heterophilic antibody interference. **f** Blank plasma and 18 ng/ml Aβ aggregates (concentration based on the monomer unit concentration) were spiked with haemolytic plasma and the effect on detection of aggregates was analysed. Standard deviations were calculated across the four replicates. Please, note the logarithmic scaling.

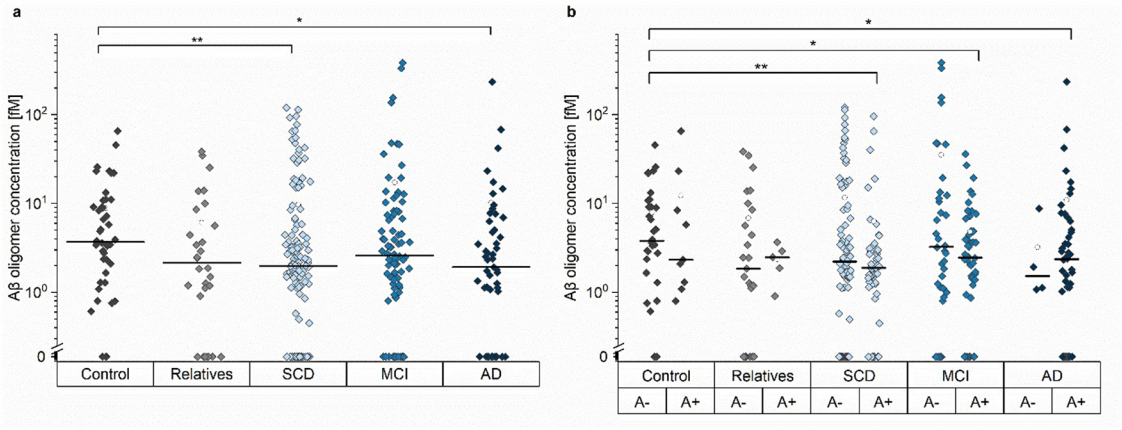


Fig. 3 Concentrations of Aβ oligomers in plasma samples. a Aβ oligomer concentrations in plasma decreased significantly in SCD and AD patients compared to the Control group. **b** After subdivision by amyloid pathology (A), SCD, MCI and AD patients positive for amyloid pathology (A+) showed significantly decreased Aβ oligomer concentrations in plasma compared to the amyloid negative (A-) Control group. Please note the logarithmic scale. Samples that fell below LOD were set to zero. SCD: subjective cognitive decline; MCI: mild cognitive impairment; AD: Alzheimer's disease; open circle: mean; line: median, * *p*-value of Mann-Whitney-U test 0.01 - 0.05; ** *p*-value of Mann-Whitney-U test 0.001 - 0.01.

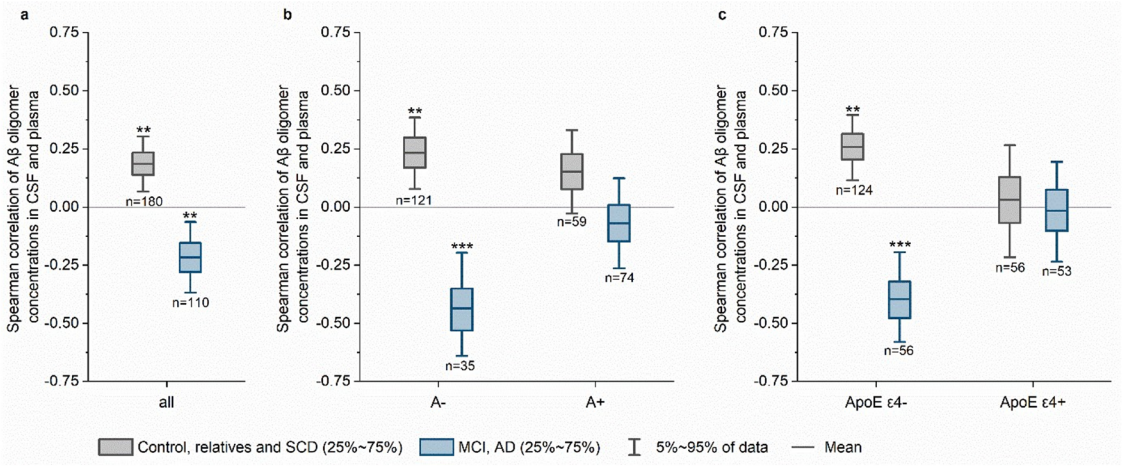


Fig. 4 Box plots for the bootstrap distribution of the Spearman coefficient of correlation r between Aβ oligomer levels in CSF and plasma. a The combined group of Controls, relatives and SCD patients (grey) showed a weak, but significant direct correlation of Aβ oligomer levels in CSF and plasma (Spearman r = 0.164), whereas MCI and AD patients (blue) showed an inverse correlation (blue, Spearman r = -0.157). **b** The groups were sub-divided by the presence of CSF amyloid pathology (A-/A+) based on the ratio of $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$. **c** The groups were sub-divided based on their ApoE ε4 status where carrying at least one ApoE ε4 allele defines positivity (ApoE ε4+). Only for amyloid negative (A-) or ApoE ε4 negative patients, significant correlations between oligomers in CSF and plasma were observed with the Control, relatives and SCD patients showing a direct correlation and MCI and AD patients an inverse correlation. *p*-value of Spearman *r* distribution: * *p*-value 0.01 – 0.05, ** *p*-value 0.001 – 0.01, *** *p*-value <0.001

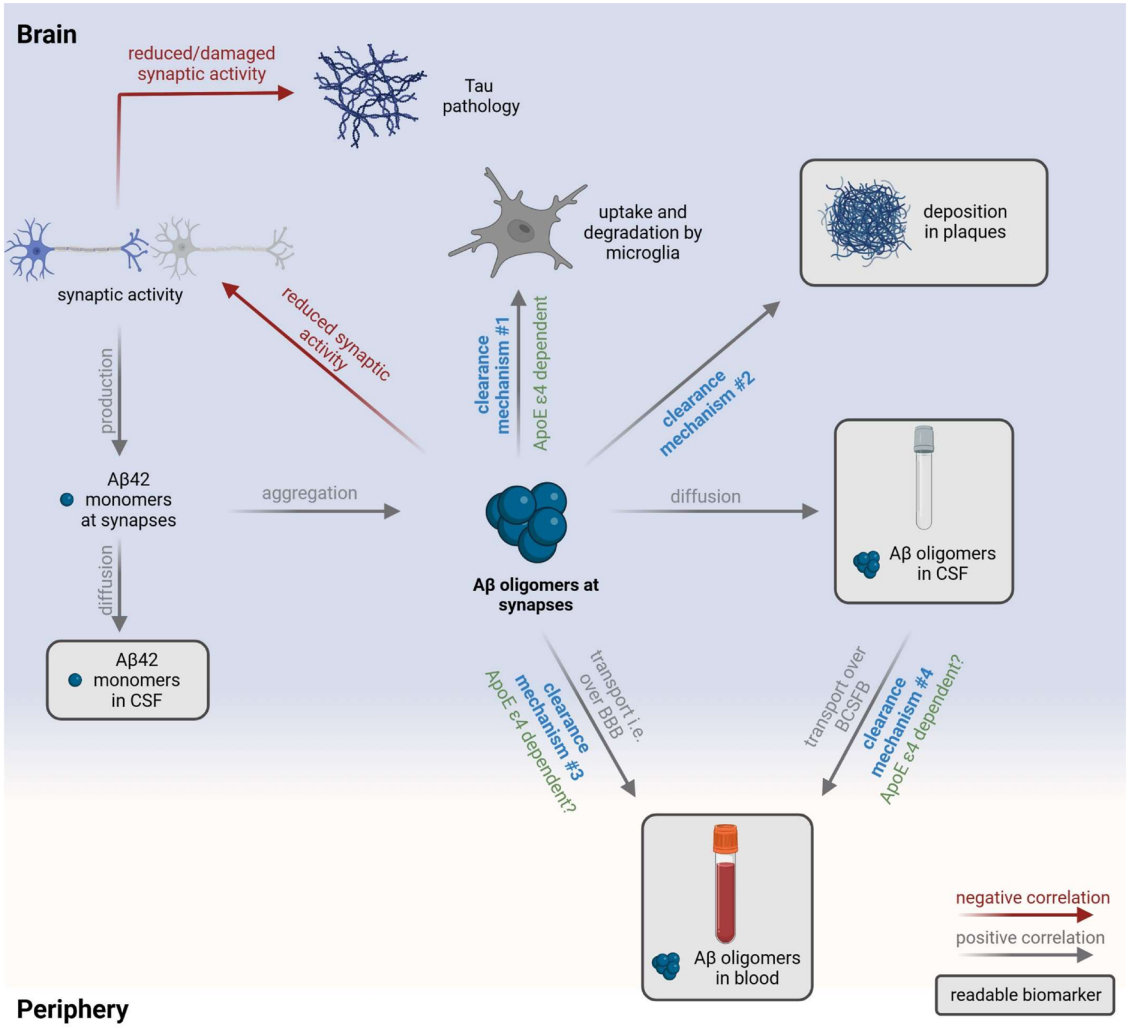


Fig. 5 Model of the clearance mechanisms for Aβ oligomers and the influence on the use of Aβ oligomers as biomarker. Aβ monomer production at synapses is dependent on synaptic activity [47,48]. At a certain time point, aggregation of Aβ monomers leads to the formation of toxic Aβ oligomers that can be cleared by different mechanisms: Aβ oligomers can be degraded by microglia (clearance mechanism #1), diffuse into CSF or deposited into plaques (clearance mechanism #2). Moreover, Aβ oligomers may be transported to blood either directly across the BBB via glymphatic clearance or interstitial flow (clearance mechanism #3), or after diffusion into CSF and reaching blood via BCSFB (clearance mechanism #4). Formation of plaques in patients with amyloid pathology allows oligomers to be deposited (clearance mechanism #2), which may become the preferred fate of Aβ oligomers. This may lead to reduced clearance to blood and reduced Aβ oligomer concentrations in plasma. Additionally, transport of Aβ oligomers from the brain and CSF to plasma may be inefficient in ApoE ε4 carriers influencing correlation analysis. *Created with BioRender.com*

4.4 Quantifizierung von fäkalen Aβ-Aggregaten

Elevated Aβ aggregates in feces from Alzheimer's disease patients: a proof-of-concept study

Autoren	**Marlene Pils**, Alexandra Dybala, Anja Schaffrath, Fabian Rehn, Janine Kutzsche, Lara Blömeke, Markus Tusche, Pelin Özdüzenciler, Tuyen Bujnicki, Victoria Kraemer-Schulien, Hannes Gramespacher, Maximilan H.T. Schmieschek, Michael T.Barbe, Oezguer A. Onur, Gereon R. Fink, Gültekin Tamgüney, Oliver Bannach & Dieter Willbold
In Revision bei	**Alzheimer's Research & Therapy (2023)** Impact-Faktor: 9,2 (2022)
Beitrag	**Eigener Anteil 80%** ▪ Weiterentwicklung und Validierung der sFIDA-Technologie für den Nachweis von Aβ-Oligomeren in humanen Stuhlproben ▪ Koordinierung der Probensammlung, Transport und Biobanking ▪ Etablierung des Homogenisierungspuffers und des Homogenisierungsprotokolls ▪ Planung, Durchführung und Auswertung der Validierungs-studien und der Probenmessungen ▪ Anfertigung der Abbildungen ▪ Statistische Auswertung ▪ Diskussion der Ergebnisse ▪ Hauptverfasserin des Manuskripts

Elevated Aβ aggregates in feces from Alzheimer's disease patients: a proof-of-concept study

Marlene Pils [1,2], Alexandra Dybala [3], Anja Schaffrath [1], Fabian Rehn [1,2], Janine Kutzsche [1], Lara Blömeke [1], Markus Tusche [1], Pelin Özdüzenciler [1], Tuyen Bujnicki [1], Victoria Kraemer-Schulien [1], Hannes Gramespacher[4], Maximilian H.T. Schmieschek[4], Michael T. Barbe[4], Oezguer A. Onur[4,5], Gereon R. Fink[4,5], Gültekin Tamgüney[1,3], Oliver Bannach[1,2] and Dieter Willbold[1,2,3*]

Affiliations

[1] Institute of Biological Information Processing, Structural Biochemistry (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, Jülich, 52428, Germany
[2] attyloid GmbH, Düsseldorf, 40225, Germany
[3] Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, 40225, Germany
[4] Department of Neurology, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, Köln, 50923, Germany
[5] Cognitive Neuroscience, Institute of Neuroscience and Medicine (INM-3), Jülich Research Centre, Jülich, 52428, Germany

***Correspondence:**
Prof. Dr. Dieter Willbold
Institute of Biological Information Processing (IBI-7)
Forschungszentrum Jülich,
Wilhelm-Johnen-Straße, 52428 Jülich
Germany
E-Mail: d.willbold@fz-juelich.de
Phone.: +492461612100
Fax: +492461612023

Abstract

Background

Misfolding and aggregation of amyloid β (Aβ), along with neurofibrillary tangles consisting of aggregated Tau species, are pathological hallmarks of Alzheimer's disease (AD) onset and progression. In this study, we hypothesized the clearance of Aβ aggregates from the brain and body into the gut.

Methods

To investigate this, we used surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) to determine the Aβ aggregate concentrations in feces from 26 AD patients and 31 healthy controls (HC).

Results

Aβ aggregates were detectable in human feces and their concentrations were elevated in AD patients compared to HC (specificity 90.3%, sensitivity 53.8%).

Conclusion

Thus, fecal Aβ aggregates constitute a non-invasive biomarker candidate for diagnosing AD. Whether digestion-resistant Aβ aggregates in feces are secreted via the liver and bile or directly from the enteric neuronal system remains to be elucidated.

Keywords: amyloidosis, Aβ oligomer quantitation, sFIDA, brain-gut-microbiota axis, leaky gut, fecal/stool sampes, clearance

Background

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent age-related cause of dementia, characterized by neurodegenerative processes ultimately leading to neuronal loss in the hippocampus and cerebral cortex. Due to neurodegeneration, a progressive decline of cognitive functions, especially learning and memory, is observed [1]. AD is neuropathologically characterized by the progressive accumulation of extracellular senile plaques composed of fibrillar amyloid β (Aβ) peptides and of intracellular neurofibrillary tangles composed of tau proteins [2, 3]. Furthermore, recent evidence indicates that smaller soluble Aβ protein and tau aggregates like oligomers cause and promote pathological processes due to neurotoxicity [3, 4].

Based on various aspects, including disturbances along the brain-gut-microbiota axis [5-9], liver-mediated Aβ clearance and elimination by bile [10-12], and the consequences of a disturbed blood-brain barrier and a permeable intestinal barrier [6, 7, 13, 14], the presence of Aβ aggregates in feces can be assumed. Initial studies have confirmed an association between AD and increased intestinal or fecal Aβ concentrations, irrespectively of conformational structure [15-18]. Protein aggregation occurs in various neurodegenerative disorders, and it often precedes the appearance of clinical symptoms for several years or even decades [19]. Therefore, we hypothesized that clearance mechanisms must exist that reduce the aggregate load in the brain and body by disposing Aβ aggregates via gut. Consequently, fecal Aβ aggregates may also serve as a biomarker candidate for non-invasive AD diagnosis.

We previously developed surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA), a platform technology for quantitating single protein aggregates [20]. While the biochemical setup of the sFIDA assay is similar to a sandwich ELISA (Figure 1), the readout is microscopy-based featuring sub-femtomolar sensitivity [20, 21]. To avoid monomer interference, sFIDA uses capture and detection antibodies directed against the same or overlapping epitopes. After probing, the glass surface is imaged by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM), illuminating fluorescence-labeled detection antibodies bound to the captured aggregates. Individual particles are counted by image-data analysis of pixels with fluorescence intensities above background noise. Our previous work established the technical concept of sFIDA [21-23] and demonstrated that sFIDA is useful for diagnosing neurodegenerative diseases [24-26] and drug development [27].

The present study aimed to investigate the fecal concentrations of Aβ aggregates in AD patients and healthy controls (HC). Therefore, we developed and analytically validated the sFIDA assay to detect and quantify Aβ aggregates in human fecal samples. We also assessed its applicability as an explorative biomarker for non-invasive AD diagnosis in a small proof-of-concept study including samples from 26 AD patients and 31 HC.

Methods

Human fecal samples

The Ethics Commission of the Faculty of Medicine of the University of Cologne approved patient recruitment (19-1644). In total, 26 AD patients (amyloid positivity as part of the clinical workup by cerebrospinal fluid (CSF) or Amyloid positron emission tomography and impaired cognitive function, 48−84 years of age at sample collection), i.e., 22 patients with mild cognitive impairment (MCI), and four patients with dementia were enrolled between October 2019 and June 2022. HC (n = 31, 26−78 years of age at sample collection) were recruited by advertisement. For ethical reasons, fecal sample tubes of HC were handled anonymously, thus we could not match the sample with the respective donor. HC had no known neurological disease and were not subjectively cognitively impaired. Informed consent was obtained from each participant.

Sample collection

Fecal samples were collected using polypropylene sample tubes with a screwcap-integrated spoon (megro, Wesel, Germany) and a paper-based collection aid (Med Auxil analysis aids, Seesen, Germany) to avoid

contamination. In order not to endanger sample stability, samples were stored and transported on ice. After receiving the fecal samples, samples were classified according to their consistency and shape using the Bristol scale [28] and were aliquoted into polypropylene protein low-binding tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Samples were stored at −80 °C until further use.

Homogenization of fecal samples for sFIDA analysis

In this study, we used Tris buffer (20 mM Tris and 250 mM NaCl, both AppliChem, Darmstadt, Germany, pH 8.3), which was previously applied to quantify Aβ aggregates in homogenized brain tissue using sFIDA technology [27]. To reduce non-specific binding of Aβ aggregates to the homogenization tubes, we added 1% bovine serum albumin (BSA, AppliChem). Furthermore, the properties of glycerol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) were used to further stabilize the analyte, especially during repeated freezing and thawing [29], using a concentration of 5%. As during homogenization release of proteases and phosphatases cannot be excluded, we added cOmplete EDTA-free protease inhibitor and PhosStop phosphatase inhibitor (both Roche, Basel, Switzerland). Because about a quarter of the solid fecal components comprises bacteria and other microorganisms that may still be viable [30, 31], we added NaN_3 (AppliChem) at a concentration of 0.05%.

Various feces homogenization methods are described in the literature, with the required sample quantity being determined either by weighing or using tubes with an integral dosing system [32-36]. We decided to use such a dosing system, i.e., Simplix tubes (polypropylene, Gaudlitz, Coburg, Germany), allowing for simple, clean, and fast sample handling and accurate dosing. The homogenization procedure used in this study was adapted by combining already established instructions of *in-vitro* diagnostics (IVDs) using feces as sample matrix for the quantification of other biomarkers, e.g., fecal IgA, hemoglobin, or calprotectin [32, 33, 35, 36]. Briefly, Simplix tubes were prefilled with cold 1300 µL homogenization buffer. Afterward, thawed fecal samples were applied on a sample stick, whereby the integrated dosing system ensured a sample weight of approximately 17 mg. Due to the liquid consistency, fecal samples with Bristol scale seven were weighted into Simplix tubes. Samples were homogenized completely using a vortex mixer, incubated for 10 min at RT, and transferred into 2 mL polypropylene low-binding tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany). However, since dead bacteria can also show autofluorescence, these and solid components, e.g., undigested food residues, were mechanically separated from the liquid phase by centrifugation (5 min, 3000× *g*, 4 °C). Finally, the supernatants were transferred into fresh 1.5 mL polypropylene low-binding tubes and stored at −80 °C before sFIDA analysis.

sFIDA Assay

Synthesis of Aβ1−15 coated silica nanoparticles

For assay calibration, we have previously introduced silica nanoparticle (SiNaP) standards coated with multiple Aβ-derived epitopes to mimic Aβ aggregates [22]. To this end, bare SiNaPs were synthesized via the Stöber process, functionalized, and activated as described previously by Blömeke et al. [24]. Briefly, synthesized SiNaPs were silanized with 3-aminopropyl(triethoxysilane) (APTES, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to functionalize the surface with primary amino groups. Afterward, crosslinking of Aβ1−15 peptides to aminated SiNaPs surface was enabled using maleimido hexanoic acid (MIHA, abcr GmbH, Karlsruhe, Germany), preactivated with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC, Sigma-Aldrich) and N-hydroxysuccinimid (NHS, Sigma-Aldrich). Using C-terminal functionalized Aβ1−15 peptides with cysteamine, crosslinking between Aβ and maleimide groups was enabled. Finally, molar concentration of Aβ-coated SiNaPs was calculated based on silicon concentration determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry, density of SiNaPs and size and shape of the particles, as determined by transmission electron microscopy.

Aβ1−42 oligomer-based IQC sample

We have previously introduced synthetic Aβ1−42 oligomers as internal quality control (IQC) sample [23]. To this end, 5 µg of monomeric Aβ1−42 (Bachem, Bubendorf, Switzerland) was dissolved in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-

propanol (HFIP, Sigma-Aldrich) and evaporated. Afterward, the Aβ pellet was resolved with 5 µL dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich), agitated for 10 min at 650 rpm at RT and diluted with 1× PBS containing 0.04% NaN_3 to a final stock concentration of 10 µM. Following an overnight incubation on a shaker at 650 rpm and RT, the IQC sample was sonicated for 20 min in an ultrasonic bath before dilution and use in sFIDA assay.

Labeling of antibody

For detection of captured Aβ aggregates, fluorescence-labeled anti-Aβ antibody IC16 (directed against epitope amino acid 2−8, kindly provided by Carsten Korth, Universitätsklinikum Düsseldorf, Germany) [37] was applied on the assay surface. To this end, the antibody was labeled according to the manufacturer's protocol using CF633 dye (Biotium, Freemont, CA, USA). In carbonate buffer, the succinimidyl ester groups of the preactivated dye bind covalently to the amines of the IC16 antibody. Purification was performed using a polyacrylamide bead suspension (Bio-Gel P-30 Gel, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA), and afterward, concentration and degree of labeling of the probe were calculated as described in manufacturer's protocol. Finally, the detection probe was stored at 4 °C, diluted, and centrifuged for 1 h at 4 °C and 100,000× *g* just before usage.

Assay protocol

The biochemical principle of sFIDA was reported previously [21, 22, 24]. In this study, 384-well-plates (SensoPlate plus, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) were functionalized with 40 µL of Nab228 monoclonal anti-Aβ antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 2.5 µg/mL in 0.1 M $NaHCO_3$. After overnight incubation at 4 °C, the wells were washed five times with TBST (1× Tris-buffered saline, TBS (Serva, Duisburg, Germany), 0.05% Tween20 (AppliChem, Darmstadt, Germany)) and five times with TBS. Non-coated glass area was blocked with 0.5% BSA (AppliChem) in TBS-ProClin (TBS with 0.03% ProClin (Sigma-Aldrich)) for 1.5 h at RT. After washing five times with TBST and TBS, 20 µL samples were applied in 4-fold determination and incubated for 2 h at RT. For this, Aβ-coated SiNaPs as calibration standard and synthetic Aβ1−42 oligomers as IQC were diluted in sample buffer (1× phosphate-buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich), 0.05% Tween, 0.095% NaN_3 (AppliChem) and 0.5% BSA). For fecal samples, an assay-specific 1:5 dilution in sample buffer was performed. After washing five times with TBS, 20 µL of IC16-CF633 (0.625 µg/mL in TBST + 0.1% BSA) were applied and incubated for 1 h at RT. Finally, wells were washed five times with TBS, and buffer was changed against TBS-ProClin.

Image data acquisition

Using TIRFM (Leica DMI6000B, Leica microsystems, Wetzlar, Germany), 3.15% of the well surface were imaged at 25 different positions (14-bit grayscale, excitation: 635 nm, emission filter: 705/72 nm, exposure time: 1000 ms, gain: 1000). Each image consists of 1000 × 1000 pixels and represents an area of 113.76 × 113.76 µm.

Quantification and statistical analysis

Analysis of image data

Image data analysis was performed using the in-house developed software sFIDAta [21, 24]. All images containing artifacts or images that were out of focus were excluded from analysis. For the exclusion of background signal, an intensity cutoff was determined at which 0.001% of all pixels remain positive in the blank control (unspiked sample buffer, BC). The number of pixels above the respective cutoff is referred to as pixel count. sFIDAta calculated the mean value, standard deviation, and coefficient of variation (CV%) for each sample based on the four replicates. Statistical analyses were performed using OriginPro (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) and matlab2019b (The MathWorks, Natick, MA, USA) were used for calculations and graphs.

Calibration

To convert pixel counts into femtomolar particle concentration, we used readouts of Aβ-coated SiNaPs to calculate the calibration curve. To this end, only those Aβ-coated SiNaPs concentrations which significantly differed from BC and were within linear range were included in the calculation. A one-sided Mann−Whitney U test with a

confidence interval of 5% was performed to investigate significant differences. Linear regression was executed with matlab2019b software, where pixel counts were weighted with 1/readout.

Preanalytics

Reproducibility of preanalytical procedures

Due to the complex and individually varying composition of feces, we tested the reproducibility of homogenization and sample dilution using three fecal samples with an initial low, intermediate, and high readout. To this end, six homogenates of each of the three samples were prepared, whereby the weight of the sample was additionally calculated based on the previously recorded empty weight (homogenization tube with buffer). Based on these data, the sample dosage's precision and trueness were calculated. Each homogenate was subjected to sFIDA assay in quadruplicates. In addition, the reproducibility of sample dilution was investigated by preparing four dilutions from one homogenate of each sample and assaying them also in quadruplicate within sFIDA. Afterward, pixel counts of individual replicates of each sample were normalized based on Eq.1. Values within the tolerance range of ± 25% indicated sufficient reproducibility.

(1) $$\text{Normalized pixel count } [\%] = \frac{\text{pixel count}_{\text{replicate x}}}{\text{pixel count}_{\text{mean all replicates}}} \times 100\ \%$$

Dilution linearity

In this study, the dilution linearity of Aβ-coated SiNaPs and IQC in dilution buffer was investigated. Before calculating the dilution linearity of both targets, background correction was performed by subtracting the BC value from each value. Subsequently, the percent dilution linearity of each calibration or IQC sample was calculated using Eq.2. Dilution linearity was accepted when the mean percent dilution linearity was between 80−120%.

(2) $$\text{Dilution linearity or parallelism } [\%] = \frac{\text{observed concentration}}{(\text{previous observed value}/\text{dilution factor})} \times 100\ \%$$

For investigating parallelism, two fecal samples with high endogenous concentrations of Aβ aggregates were homogenized and diluted 1:5 with sample dilution buffer. Subsequently, these samples were serially diluted four times by a factor of two, and all prepared dilutions were applied on sFIDA surface. Because parallelism and dilution linearity are conceptually similar [38], the percent parallelism of each dilution step was also calculated using Eq.2. In the case of fecal samples, acceptance criteria for the mean dilution linearity were increased up to ± 25%.

Sample stability

To assess thermostability, three crude fecal samples with low, intermediate, and high readouts were stored at −20 °C, 4 °C, or 20 °C for 3, 6, or 18 h to simulate sample transport and bench top conditions, respectively. To this end, nine Simplix tubes were prefilled with the respective fecal sample, and the individual homogenization tubes were stored according to the storage condition mentioned above. At the end of each storage period, the aliquots were frozen at −80 °C. As a reference, another Simplix tube was prefilled with the corresponding sample and stored directly at −80 °C. On the day of the sFIDA experiment, all Simplix tubes were thawed simultaneously, the homogenization tubes were filled with homogenization buffer, and the samples were homogenized and diluted 1:5 with sample dilution buffer. Finally, all samples were measured by sFIDA, and the normalized pixel counts were calculated (Eq.1), where values within a tolerance range of ± 25% were accepted. Values outside the tolerance range indicated that sample stability was compromised.

For CSF samples, it is known that repeated thawing and refreezing can drastically reduce the measurable concentration of Aβ [39]. In order to test whether similar effects can be observed in crude and already homogenized fecal samples, the effect of multiple freeze-thaw cycles (none, one, two, three, five, or seven) on the stability of the three samples was investigated according to Andreasson et al. [38]. To this end, six Simplix tubes each were prefilled with the respective crude sample and then stored at −80 °C. In contrast, for the investigation of fecal

homogenates, homogenates of three samples were prepared at the beginning of the stability study, whereby the supernatant obtained after centrifugation was divided into six aliquots of 100 µL each. For this purpose, 1.5 mL polypropylene low-binding Eppendorf reaction tubes were used as containers, and all aliquots were frozen at −80 °C. Subsequently, the individual Simplix tubes and the fecal homogenates were thawed successively, while the reference aliquots did not undergo a thaw-freezing process during the study. After an incubation time of 2 h at RT, samples were frozen again for at least 12 h at −80 °C. At the end of the study period, all aliquots were thawed simultaneously and diluted 1:5 with sample buffer, while the crude fecal samples were first homogenized. The data acquisition and analysis of the image data were carried out analogously to the thermostability study.

Analytical validation

Assay selectivity – investigation of assay controls

To determine the selectivity of the sFIDA assay, Aβ-coated SiNaPs (molar particle concentration of 10.26 pM), IQC sample (100 nM, Aβ monomer subunit concentration), and three fecal samples were applied on different sFIDA setups. To exclude unspecific binding of Aβ to the blocking agent, a capture control (CC) was performed in which no capture antibody was added to the surface. The assay was performed without adding any fluorescent probes to exclude autofluorescence (AF) events from assay components or samples. In addition, we also tested the cross-reactivity of anti-α-synuclein antibodies (detection antibody 211) against the immobilized Aβ species. For each assay control setup, the ratio of observed and expected (standard assay setup) values and the percentage amount of reduced signal were calculated according to Eq.3. Values between 80−120% were accepted for Aβ-coated SiNaPs and IQC sample. In comparison, the tolerance range for fecal samples was increased up to ± 25%.

(3) $$\text{Signal reduction } [\%] = \left(1 - \frac{\text{observed readout assay control}}{\text{readout reference}} \times 100\%\right)$$

Assay selectivity – immunodepletion

Immunodepletion was performed to demonstrate that the observed pixel counts by sFIDA can be specifically attributed to Aβ aggregates. To this end, the Nab228 antibody was covalently coated on the surface of carboxylated magnetic dynabeads (Invitrogen, Waltham, USA), as previously described by Blömeke et al. [24]. Briefly, the dynabeads were washed twice with 2.5 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES, pH 5.0, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) before being applied to a magnet to remove the supernatant. Afterward, carboxy groups of the dynabeads were activated for 30 min at RT using 50 µg/mL EDC and 50 µg/mL NHS in MES, and the dynabeads were rewashed with MES and coated with Nab228 antibody to a concentration of 20 µg/mL dynabeads. The control dynabeads were coated with an α-synuclein-specific antibody 211 to investigate Aβ specificity of the depletion protocol. After antibody incubation for 1 h at RT, coated dynabeads were rewashed, and still activated carboxy groups were quenched with 50 mM ethanolamine in MES for 1 h at RT, followed by a final washing step. We applied 0.5 mg of antibody-coated dynabeads to the magnet for immunodepletion and removed the supernatant. 100 µL sample (10.26 pM Aβ-coated SiNaPs, 100 nM synthetic Aβ1−42 oligomers, and three fecal samples, which were diluted 1:5 in sample buffer before depletion) were added and incubated for 1 h at RT while rotating. After incubation, dynabeads were applied to the magnet again and the supernatant was transferred into a fresh tube and stored at −80 °C until sFIDA analyses. To assess assay selectivity, the efficiency of the immunodepletion was calculated according to Eq.3. The acceptance criteria were the same as for the assay control setup described above.

Assay selectivity – detection of Aβ using ELISA

For the qualitative detection of Aβ species in feces, two samples were analyzed using a human amyloid β (1−42) ELISA Assay kit (IBL international, Hamburg, Germany) according to the manufactures protocol. For sample preparation, 15 mg of each sample were transferred into a low binding Eppendorf tube, which was prefilled with 20 µL ddH_2O containing protease inhibitor. After homogenization using vortex mixer, homogenates were incubated

for 10 min at 95 °C at 600 rpm. To separate insoluble digestive residues, homogenates were centrifuged for 5 min at 3000× *g*, 4 °C, and supernatants were used for ELISA analysis. To enrich Aβ from the sample matrix, samples were subjected to immunoprecipitation. To this end, protein-G magnetic dynabeads (Invitrogen, Waltham, USA) were functionalized with IC16 antibody and samples were precipitated according to manufactures protocol. Afterward, Aβ was eluted using 10 mM acetic acid, resuspended in ddH_2O containing protease inhibitor and supernatants were used for ELISA analysis. We also attempted to increase signal by seeding by spiking 100 pg/µL synthetic Aβ1−42 to the homogenates prior to immunoprecipitation. Afterward, the supernatants were also analyzed in ELISA. Finally, ELISA readouts were translated into pg/mL concentration based on the calibration curve ($y = 0.0228x$, $R^2 = 0.994$).

Influence of Bristol scale

Recent studies have demonstrated that microbiome composition and species richness change during AD progression and might impact cognition [9, 40-42]. Microbiome composition and species richness also affect feces consistency. Therefore, changes in both water content and pH value are directly reflected in the Bristol scale [28, 43]. The latter may also act as a non-analyte-specific interfering factor [44], altering the quantification of the analyte through dilution or pH-dependent changes in assay kinetics. At sample receipt, all samples were assessed according to their consistency and shape using the Bristol scale. We performed a Mann−Whitney U test and a Spearman correlation analysis to determine whether the Bristol scale influences the fecal Aβ aggregate concentration or whether a cognition-based influence is present.

Influence of matrix components

The presence of interfering endogenous substances in fecal samples may falsely alter assay results, either false positive or negative [45, 46]. Because disturbances of the brain-gut-microbiota axis, including gut inflammation and increased permeability of the intestinal barrier, may contribute to AD pathology [7], levels of fecal biomarkers indicating pathological processes of the gut, i.e., fecal albumin, hemoglobin, α-1-antitrypsin, calprotectin, IgA, lipids, and bile acid were determined for a set of 15 fecal samples (AD n = 7, HC n = 8). Biomarker analyses were performed by the Medizinisches Versorgungszentrum Limbach (Heidelberg, Germany). Afterward, Spearman correlation was conducted to investigate possible interfering effects of those biomarkers on fecal Aβ aggregate concentrations. In addition, Mann−Whitney U tests were used to determine whether levels of all seven biomarkers differ in AD patients and HC.

Intra- and inter-assay variability

In this study, we determined CV% values to measure intra-assay variability. For synthetic Aβ species such as Aβ-coated SiNaPs and IQC sample, values below 20% were accepted, while for naturally occurring Aβ species from fecal samples, the tolerance range was increased up to ± 25%. The Spearman coefficient of correlation was calculated for two independent measurements to determine inter-assay variability.

Calculation of LoD

In order to describe the smallest concentration of Aβ aggregates that can be measured reliably with the sFIDA assay, the limit of detection (LoD) was estimated for each experiment by measuring 24 replicates of BC. First, LoD was calculated according to Armbruster et al. using Eq.4 [47] and then calibrated into femtomolar concentrations using the determined calibration line.

(4) $$\text{Limit of detection (LoD)} = \text{pixel count}_{\text{BC}} + 2\sigma$$

Proof-of-concept study

For the proof-of-concept, the whole set of 57 fecal samples was subjected to sFIDA. At the time of measurements, all patient-related data and samples were anonymized, and researchers were aware of the clinical data at the time

of the sFIDA measurements. Pixel counts were generated and calibrated. Data of fecal samples were subsequently tested for normal distribution using Shapiro−Wilk, Lilliefors, Kolmogorov Smirnov, and Anderson−Darling tests. In the case of non-normally distributed data, non-parametric tests, e.g., the Mann−Whitney U test or Spearman correlation, were conducted for further analyses. A receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed to evaluate the effectiveness of fecal Aβ aggregates as diagnostic biomarker to differentiate between AD patients and HC. Using maximized Youden's index, the optimal combination of sensitivity and specificity and the area under the curve (AUC) were calculated.

Results

Homogenization and sample dilution of fecal samples are reproducible

Because fecal samples must be homogenized before they are subjected to sFIDA, we first established a suitable homogenization buffer and protocol. Due to the complex and individually varying composition of feces, we tested the reproducibility of homogenization and sample dilution (1:5 in sample buffer) using normalized pixel counts of three fecal samples (initial low, intermediate, high readout) to calculate percentage reproducibility. Figure S1 demonstrates that the homogenization and sample dilution resulted in a high degree of reproducibility, as most of the normalized pixel counts fell within the predefined tolerance range of ± 25%. Only two of the observed values have exceeded the tolerance range with a slight deviation of ± 0.8% (Figure S1A).

sFIDA features dilution linearity of Aβ-coated SiNaPs, IQC Samples, and fecal samples

Next, we analyzed dilution linearity by subjecting an Aβ-coated SiNaPs and IQC dilution series to sFIDA analysis, ranging from 0.32 fM−10 pM (molar particle concentration) and 3.2 pM−31 nM (total Aβ concentration), respectively. The percent dilution linearity was determined using blank-corrected pixel counts and was accepted within a tolerance range of 80−120%. The results showed high dilution linearity for both targets, with an average linearity of 107% for Aβ-coated SiNaPs and 97.6% for IQC samples. Furthermore, for two fecal samples possessing high endogenous Aβ aggregate concentrations, high parallelism of 99.9% and 85.2%, respectively, as depicted in Figure S2.

Repeated freeze-thaw cycles do not affect stability of homogenized fecal samples

In order not to compromise the sample stability during transport or assay preparation, we first performed a thermostability study. The results indicated that a temperature of 4 °C or lower did not compromise sample stability for up to 18 h, as depicted in Figure S3. In addition, we investigated the influence of freeze/thawing on crude and homogenized fecal samples since repeated freezing and thawing of clinical samples is known to compromise sample stability [38, 39, 48]. To this end, we subjected three fecal samples to repeated freeze-thaw cycles and determined the level of Aβ aggregates. As shown in Figure 2, the stability of the crude fecal samples was indeed affected by multiple thawing and freezing but remained intact in the homogenized fecal samples. In detail, for the crude control sample (sample 1, low readout), neither a signal reduction due to decreased sample stability nor a signal increase was observed. In contrast, a decreasing effect of the number of freeze-thaw cycles on the signal was determined for samples 2 and 3. In particular, repetitive freeze-thaw cycles dramatically reduced the stability of high-readout sample 3. Compared to the reference (no freeze-thaw cycle), a signal loss of 57% was recorded for this sample after thawing and freezing seven times. Considering crude sample 2, an out-of-tolerance value was also recorded at the seventh freeze-thaw cycle, with the measured signal dropping by 31% compared to the reference. In contrast to the crude fecal samples, no signal decrease was observed for the homogenized samples over all freeze-thaw cycles indicating high sample stability after homogenization.

sFIDA is selective for aggregated Aβ species

To evaluate the selectivity of the sFIDA assay in detecting Aβ-coated SiNaPs, IQC samples, and three fecal samples with intermediate to high readouts, we measured the percent signal reduction of capture,

autofluorescence, and cross-reactivity control, and compared it to a standard assay setup (Figure 3A). In this analysis, the sFIDA assay showed a selectivity of about 100% for both Aβ-coated SiNaPs and IQC samples. Thus, unspecific interference with the used blocking agent, autofluorescent components, and cross-reactivity can be excluded for both targets. In contrast, a selectivity of about 77% was determined for fecal Aβ aggregates. Both capture and cross-reactivity control showed about 19.2% and 24.8% remaining pixel counts, respectively. However, since the absence of the detection probe from the fecal samples also led to a comparable result (24.3% of remaining pixels), higher background intensities of the matrix and no interference with assay surface or cross-reactivity with α-synuclein directed antibodies can be assumed. Despite this increased background noise, the signal reduction down to 25% remaining pixels in the fecal samples was still sufficient.

Assay readouts are specifically attributed to Aβ

Immunodepletion was performed on three fecal samples with intermediate to high readouts, Aβ-coated SiNaPs, and IQC samples to determine if the observed pixel counts were specifically attributed to Aβ aggregates and not to interfering fecal matrix components. Following Aβ immunodepletion, supernatants were subjected to sFIDA analysis, and depletion effectivity was calculated by the percent signal reduction compared to non-depleted sample (reference). Nab228-depleted Aβ-coated SiNaPs and IQC showed depletion-dependent signal reduction close to 100% (Figure 3B), whereas, for Nab228-depleted fecal samples, a mean signal reduction of 72.6% was determined. As a control, α-synuclein immunodepletion with 211-coated magnetic beads was performed, resulting in only negligible signal reduction of IQC (0%) and fecal samples (6.5%). However, for Aβ-coated SiNaPs a signal reduction of 28.9% was observed, suggesting some non-specific adherence of Aβ-coated SiNaPs to bead surface since cross-reactivity between 211 and Aβ-coated SiNaPs was previously excluded (Figure 3A). To qualitatively confirm the presence of Aβ in human fecal samples, we detected Aβ species in two fecal samples (HC and AD) using a commercial ELISA kit (Figure S4). However, differentiation of fecal Aβ levels between the two subjects was only achievable after complex and sample-consuming pretreatment including homogenization, immunoprecipitation, and spiking.

Independent measurements yield comparable results

We investigated the inter-assay variability of Aβ-coated SiNaPs, IQC samples, and 13 fecal samples in two different assays (Figure 4). All three targets showed high comparability, indicated by Spearman's coefficient of correlations (r-value: 1.0 for Aβ-coated SiNaPs and IQC samples and r-value: 0.929 (p-value: 8.63×10^{-4}) for fecal samples).

Aβ aggregates are present in fecal samples and are elevated in AD patients

After completion of preanalytical and selectivity studies, a proof-of-concept study was performed using dilution series of Aβ-coated SiNaPs for calibration and LoD calculation, a dilution series of IQC samples and 57 fecal samples comprising two diagnostic groups (Table 1). In detail, we quantified fecal Aβ aggregate concentrations of HC subjects having no subjective cognitive decline (n = 31) and patients diagnosed with clinical AD (n = 26). Because the data mainly did not show normal distribution (Table S1), we performed statistical analysis using non-parametric tests like the Mann−Whitney U test or Spearman correlation.

Due to the high number of assay points, the measurements were performed on two 384-well microtiter plates (experiment 1: 48 samples, experiment 2: 9 samples), each carrying both a dilution series of Aβ-coated SiNaPs for calibration and LoD calculation and a dilution series of IQC samples, respectively. We determined a femtomolar mean LoD of 1.68 fM for Aβ-coated SiNaPs, indicating high analytical sensitivity. The mean CV% for Aβ-coated SiNaPs was 13.4% and 11.1% for IQC samples. A mean intra-assay variability of 18.7% was observed for fecal samples (for individual results of each experiment see Table S2). Representative TIRFM images of Aβ-coated SiNaPs, IQC sample, patient sample and the sample buffer control are shown in Figure 5A.

Using Aβ-coated SiNaPs standards, pixel counts of fecal samples were calibrated into molar particle concentrations (Table S3). We determined Aβ aggregate concentrations ranging from 1.3 fM−3.4 pM (Figure 5B). Despite a substantial overlap between both groups, Aβ aggregate levels of AD patients were significantly elevated (*p*-value: 0.009). ROC curve were determined to evaluate the use of fecal Aβ aggregates as a diagnostic biomarker (Figure 5C). Discrimination of AD patients versus HC showed a specificity of 90.3% and a sensitivity of 53.8% with an AUC of 0.703.

Since HC samples were collected anonymously, we could not match the sample with the demographic information of the respective donor. Thus, only the mean age and proportion of female donors was calculated. Therefore, a direct correlation to the determined fecal Aβ aggregate concentration could only be established for the AD cohort. Since we are aware that the samples used from HC do not match with samples of AD patients (Table 1), we investigated for the AD cohort whether fecal Aβ aggregate concentrations might be influenced by age or sex. However, no correlation between AD patients' age and Aβ aggregate concentration was found using Spearman correlation (*r*-value: 0.163, *p*-value: 0.426). In addition, no difference was found in Aβ aggregate concentrations in fecal samples from male and female AD patients using a two-sided Mann−Whitney U test with a confidence interval of 5% (*p*-value: 0.959).

Aβ aggregate quantification is not affected by sample consistency or endogenous substances

To investigate whether the feces consistency, indicated by Bristol scale, affects the measured fecal Aβ aggregate concentrations, we performed a Spearman correlation for all 57 samples. Here, we did not find a significant correlation, indicating that the quantification was not affected by feces consistency (*r*-value: −0.176, *p*-value: 0.191). Since we found significant differences in feces consistency between AD patients and HC (*p*-value: 0.003, Table 1), we performed additional Spearman correlation for HC and AD patient groups separately. Here, we also did not find any correlation between the Bristol scale and the signals of fecal Aβ-aggregate (AD patients: *r*-value: −0.087, *p*-value: 0.672; HC: *r*-value: 0.073, *p*-value: 0.696). Spearman correlation between fecal albumin, hemoglobin, calprotectin, IgA, bile acid, α-1-antitrypsin, lipids, and fecal Aβ aggregate concentrations were investigated to assess interfering effects. As shown in Table S4, Spearman correlation coefficients between −0.38 and +0.36 were observed. However, since they were not significant, only minute interfering effects of endogenous substances on quantification can be assumed. In addition, we investigated whether the levels of all seven biomarkers could be attributed to AD patients or HC. As shown in Table S5, no significant differences between both cohorts were observed.

Discussion

AD is the most common age-related cause of dementia and among the most critical public health problems in industrialized countries due to increasing life expectancy [49]. In AD pathology, small soluble Aβ oligomers are the most toxic Aβ species that damage neurons and compromise synaptic function. Aβ oligomers form probably decades before clinical symptoms of AD manifest in humans. We hypothesized that clearance mechanisms are likely to exist to protect the brain from toxic effects. The deposition of Aβ oligomers into amyloid plaques is likely just one clearance mechanism, while the sequestration of Aβ oligomers out of the brain could be another mechanism [10, 11, 14]. Given that the liver plays a crucial role in detoxifying the blood, it is reasonable to assume that Aβ oligomers are sequestered from the bloodstream by the liver and then transported to the gut via bile. We and others have provided compelling evidence indicating that disturbances along the brain-gut-microbiota axis may substantially contribute to the pathogenesis of neurodegenerative diseases such as AD because gastrointestinal metabolic, endocrine, neuronal, and immunological pathways are critical for the maintenance of brain homeostasis [5-9]. Although the bidirectional communication between the brain and gut and its microbiome is not yet fully understood, it is clear that changes in the gut microbiome can induce an immune activation resulting in a systematic inflammation, which in turn may compromise the intestinal barrier (leaky gut) and the blood-brain

barrier [6-9, 13]. Combined with a dysregulated Aβ homeostasis, brain-derived Aβ aggregates could thus directly enter the enteric nervous system by crossing the blood-brain barrier or by neuron-to-neuron, distal neuron spreading, or other cells like astrocytes, fibroblasts, microglia and immune system cells [7]. Conversely, Aβ species produced by enteric neurons [16] may also enter the brain. Moreover, due to the permeability of the intestinal barrier caused by systematic inflammation, it can be assumed that Aβ aggregates in blood or originating in enteric neurons enter the intestinal lumen and are excreted with feces, as we have observed for α-synuclein aggregates in patients with isolated rapid eye movement sleep behavior disorder, a prodromal form of parkinsonism [26]. Besides, circulating Aβ is predominantly cleared by degradation in hepatocytes and secreted into the gut in bile [10-12, 14], which in turn could increase intestinal and fecal Aβ concentrations. Initial studies have confirmed this association between AD and increased intestinal or fecal Aβ concentrations, irrespective of Aβ conformation [15-18]. One may assume, however, that only Aβ species that are resistant to proteases in the gut may become observable in feces.

The clinical assessment of AD is supported by neurological evaluation, imaging, and biomarkers in patients' CSF [1, 4]. Due to the invasiveness and burden of a lumbar puncture on patients, CSF is not routinely collected [50, 51]. Identifying non-invasive biomarkers that can be used for sensitive detection of AD years or even decades before clinical onset is of utmost importance [20, 52]. Therefore, we used sFIDA technology to verify whether Aβ aggregates exist in feces and, more importantly, whether Aβ aggregate concentrations in fecal samples of HC and AD differ.

As this was a pilot project to use sFIDA for the quantification of fecal Aβ aggregates, we first had to overcome several preanalytical hurdles due to a complex sample matrix in addition to already existing challenges of oligomer-based diagnostics. Because the fecal samples must be processed before they are subjected to sFIDA, we first established a reproducible homogenization procedure. Various homogenization methods for fecal samples are described in the literature, with the required sample quantity being determined either by weighing or using tubes with an integral dosing system [32-36]. For our study, we opted to use Simplix tubes, which facilitated simple, clean, and efficient sample handling, and accurate dosing, as confirmed by our results.

The easiest way to overcome matrix effects in immunoassays is to dilute samples in a dilution buffer that ensures high discrimination between negative and positive samples [53]. In this study, a 1:5 dilution of the fecal homogenates was found optimal (data not shown) and reproducible in sFIDA assay development. Furthermore, as dilution linearity or parallelism, respectively, were observed for Aβ-coated SiNaPs, IQC sample, and fecal samples, we can exclude strong interferences due to, e.g., heterophilic antibodies as these are typically reflected in insufficient dilution linearity [46]. Therefore, samples containing high levels of endogenous fecal Aβ can be diluted within a linear range, and still yield reliable outcomes.

Chemical, microbial, and physical factors influence an analyte's stability and measurable concentration in a complex sample and can significantly falsify a measurement [38, 48]. Because our thermostability study showed that incubation at temperatures above 4 °C did affect sample stability, we adjusted the sFIDA procedure for fecal analysis accordingly. In addition, we have developed a homogenization buffer, which combined with the homogenization process, leads to stable Aβ aggregates in feces, even when they are exposed to several freeze-thaw cycles. In contrast, crude samples reacted to freeze-thaw cycles with a signal reduction. These results are similar to those reported for CSF, where the stability of Aβ42 was analyzed, and a signal loss of 20% was observed after three freeze-thaw cycles [39, 54]. Especially, the signal of Aβ aggregates was further reduced with increasing cycle numbers, which is in accordance with our study in the case of crude fecal samples.

Despite complex matrix, using a suitable homogenization and sample dilution buffer ensured a high consistency within the sample replicates implicated by low intra-assay variability. Furthermore, Aβ-coated SiNaPs, IQC sample

and fecal samples demonstrated low inter-assay variability, indicating a highly precise assay. In particular, the comparability of both sample measurements of the inter-assay study should be emphasized since the homogenates used for the second measurement were stored at −80 °C for nine months. Thus, besides sufficient stability against freeze-thaw cycles, the homogenization buffer also allows aggregate stability over an extended period. Additionally, the sFIDA assay displayed a high level of selectivity for fecal Aβ aggregates.

After preanalytical and analytical validation, we determined the Aβ aggregate concentrations in the feces of AD patients and HC. All feces contained Aβ aggregates in the femtomolar range, a few samples even above. Although it is not clear whether the Aβ aggregates found in feces have been secreted by the liver/bile system or have been directly secreted into the gut, e.g., from neurons of the enteric system, this study supports the presence of clearance mechanisms that reduce Aβ oligomer concentration in the body. Here, we demonstrated that sFIDA is suitable to measure low femtomolar (1.3 fM) to low picomolar (3.4 pM) concentrations of Aβ aggregates in fecal samples, which is slightly higher than the previously reported concentration range of Aβ aggregates in CSF (aM-fM) [55, 56]. We also demonstrated that fecal samples of AD patients with proven amyloid-positivity in the CSF or brain showed significantly elevated levels of Aβ aggregates compared to HC, which has been previously shown for Aβ aggregate concentrations in CSF [25, 55-59]. Due to a high specificity for aggregated Aβ species, the sFIDA assay developed in the present study could discriminate between fecal samples from HC and AD patients with a specificity of 90.3%. Because potential clearance mechanisms can be expected to yield increased Aβ aggregate concentrations also in (still) HC, not surprisingly, we observed an overlap between both cohorts, resulting in an assay sensitivity of only 54%, which limits the clinical use at the current stage of development. In this context, longitudinal samples may help to determine possible changes in the fecal Aβ aggregate concentration before and during disease. The correlation between fecal Aβ aggregate concentration and clinical symptoms within the AD cohort could not be thoroughly evaluated in this study, as it only involved four patients with dementia and 22 with MCI. However, if future studies indeed confirm a correlation between fecal Aβ aggregate concentrations and cognitive abilities, it will represent a significant advancement toward non-invasive early detection of AD.

Since this is a proof-of-concept study, there are certain limitations to our findings, primarily due to the restricted availability of samples, resulting in small sample sizes. While we could demonstrate statistically significant ($p < 0.01$) elevation of fecal Aβ aggregates in AD vs. HC, it is crucial to replicate this result in larger validation studies employing independent cohorts. While in this study we did not observe any correlation the age and Aβ aggregate concentration, we acknowledge that the samples obtained from HC were not matched in age with those from AD patients, which should be addressed in future work. Additionally, it would be intriguing to explore the link of fecal Aβ aggregates with additional biomarkers related to AD pathology, gut microbiota, and liver function (Figure 6). Additional data on these biomarkers in combination with a larger cohort of patients across the AD continuum have the potential to enhance our comprehension of the fundamental disease pathology and enable early diagnosis at a stage when clearance mechanisms may be starting to malfunction.

Conclusion

In conclusion, we developed a sFIDA assay for the quantitation of fecal Aβ aggregates, showing high reproducibility of preanalytical procedures, high analytical sensitivity, and specificity. In this work we delivered a proof-of-concept study, that Aβ aggregate are present in human feces and that AD patients exhibited elevated levels of fecal Aβ aggregate compared to HC. Future studies will need to confirm our results with more extensive cohort of participants, encompassing various AD stages, along with longitudinal samples and more comprehensive biomarker analysis. Finally, this work underscores the promising potential of fecal Aβ aggregates as a non-invasive biomarker for AD from which clinical routine and the development of therapeutic interventions might benefit in the future.

Abbreviations

Aβ	amyloid β
AD	Alzheimer's disease
AF	autofluorescence control
APTES	3-aminopropyl(triethoxysilane)
AUC	area under the curve
BC	blank control
BSA	bovine serum albumin
CC	capture control
CSF	cerebrospinal fluid
CV%	coefficient of variation
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
HC	healthy controls
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
IQC	internal quality control
IVDs	*in-vitro* diagnostics
LoD	limit of detection
MCI	mild cognitive impairment
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MIHA	maleimido hexanoic acid
NHS	N-hydroxysuccinimid
PBS 1	× phosphate-buffered saline
ROC	receiver operating characteristic
SD	standard deviation
sFIDA	surface-based fluorescence intensity distribution analysis
SiNaP	silica nanoparticle
TBS	1× Tris-buffered saline
TBST	1× Tris-buffered saline containing 0.05% Tween20
TIRFM	total internal reflection fluorescence microscopy

Additional file 1: Supplementary Information

Figure S1. Evaluation of the reproducibility of sample homogenization and dilution for three different fecal samples, related to Results. **Figure S2.** Parallelism of endogenous Aβ aggregates in fecal sample 1 and sample 2, related to Results. **Figure S3.** Evaluation of thermostability during transport or bench-top handling, related to Results and Figure 2. **Figure S4.** Schematic illustration of sample treatment and confirming the presence of fecal Aβ species in those samples using ELISA, related to Results. **Table S1.** Results of normal distribution tests for molar Aβ aggregate concentrations in fecal samples, related to Results. **Table S2.** The coefficient of variation, calculated calibration curve, coefficient of determination and the limit of detection of each experiment for Aβ-coated SiNaPs, IQC samples, and fecal samples, related to Results. **Table S3.** Clinical information, Bristol scale scores, and mean Aβ-aggregate concentrations with the standard deviation of the individual subjects, related to Results, Figure 5B and Figure 5C. **Table S4.** Spearman coefficient of correlation values for the analyses between fecal Aβ aggregate levels and seven fecal biomarkers indicating gut inflammation and increased permeability of intestinal membranes (bile acid, lipids, calprotectin, IgA, α-1-antitrypsin, hemoglobin, and albumin), related to Results. **Table S5.** p-values of two-sided Mann−Whitney U test for pairwise comparisons of measured fecal biomarker concentrations, related to Results.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The Ethics Commission of the Faculty of Medicine of the University of Cologne approved patient recruitment (19-1644).

Consent for publication

Not applicable

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article and its Supplementary Information. For image data analysis, we used the sFIDAta software application, which can be made available upon request.

Competing Interests

D.W. and O.B. are cofounders and shareholders of attyloid GmbH. D.W. is member of attyloid's supervisory board. M.P., O.B., G.T. and D.W. are inventors of patent DE102020114278A1 (determination of disease-specific protein aggregates in fecal samples). These factors did not influence the interpretation of the data. Remaining authors declare no conflicts of interest.

Funding

sFIDA was supported by the programs "Biomarkers Across Neurodegenerative Diseases I + II" of The Alzheimer's Association, Alzheimer's Research UK, and the Weston Brain Institute [11084, BAND-19-614337]. We are also grateful for support from The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research [14977, 009889], the ALS Association, and the Packard Center [19-SI-476]. We received further funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft [INST 208/616-1 FUGG, INST 208/794-1 FUGG], Helmholtz Association [HVF0079], Förderstiftung Dierichs, and Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. Selbsthilfe Demenz (DalzG). G.R.F. and O.A.O. were supported by the Marga and Walter Boll-Foundation. H.G. was supported by the Cologne Clinician Scientist Program (CCSP) / Faculty of Medicine / University of Cologne and received funding from Deutsche Forschungsgemeinschaft [DFG, FI 773/15-1].

Author contribution

Conceptualization, M.P., O.B., D.W. and G.T.; Methodology, M.P.; Validation, M.P.; L.B., T.B. and V.K.; Formal Analysis, M.P., L.B. and F.R.; Investigation, M.P. and M.T.; Resources, i.e., coordination of sample collection, transport, and biobanking M.P., A.S., G.T., M.HT.S., H.G., G.R.F., M.T.B., and O.A.O.; Writing – Original Draft, M.P.; Writing – Review & Editing, O.B., D.W., O.A.O, M.T.B., G.R.F. and G.T; Visualization, M.P.; Supervision, O.B., G.T., J.K. and D.W.; Project Administration, O.B., D.W. and G.T.; Funding Acquisition, O.B., G.T., D.W., G.R.F and O.A.O. All authors participated in the discussion of the data, provided critical feedback, and contributed to the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Carsten Korth (Institute of Neuropathology, Universitätsklinikum Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany) for providing the IC16 antibody. The authors Volker Nischwitz (Central Institute for Engineering, Electronics and Analytics, Analytics (ZEA-3), Forschungszentrum Jülich, 52428, Jülich, Germany) for determining the silicon concentration of the used Aβ-coated SiNaPs using inductively coupled plasma mass spectrometry. The authors confirm that these results have not currently been presented at any conference or reviewed or published in any other journal.

References

[1] Jack, C.R., Jr., et al., NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 2018. **14**(4): p. 535-562.

[2] Brown, M.R., S.E. Radford, and E.W. Hewitt, Modulation of β-Amyloid Fibril Formation in Alzheimer's Disease by Microglia and Infection. *Front Mol Neurosci*, 2020. **13**: p. 609073.

[3] Hampel, H., et al., The Amyloid-β Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry*, 2021. **26**(10): p. 5481-5503.

[4] Kulenkampff, K., et al., Quantifying misfolded protein oligomers as drug targets and biomarkers in Alzheimer and Parkinson diseases. *Nature Reviews Chemistry*, 2021. **5**(4): p. 277-294.

[5] Sun, M., et al., A Review of the Brain-Gut-Microbiome Axis and the Potential Role of Microbiota in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 2020. **73**(3): p. 849-865.

[6] Leblhuber, F., et al., Elevated fecal calprotectin in patients with Alzheimer's dementia indicates leaky gut. *J Neural Transm* 2015. **122**(9): p. 1319-22.

[7] Kowalski, K. and A. Mulak, Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease. *J Neurogastroenterol Motil*, 2019. **25**(1): p. 48-60.

[8] Fink, A., G. Doblhammer, and G. Tamgüney, Recurring Gastrointestinal Infections Increase the Risk of Dementia. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2021. **84**: p. 797-806.

[9] Ferreiro, A.L., et al., Gut microbiome composition may be an indicator of preclinical Alzheimer's disease. *Sci Transl Med*, 2023. **15**(700): p. eabo2984.

[10] Cheng, Y., D.Y. Tian, and Y.J. Wang, Peripheral clearance of brain-derived Aβ in Alzheimer's disease: pathophysiology and therapeutic perspectives. *Transl Neurodegener*, 2020. **9**(1): p. 16.

[11] Wang, J., et al., A systemic view of Alzheimer disease - insights from amyloid-β metabolism beyond the brain. *Nat Rev Neurol*, 2017. **13**(10): p. 612-623.

[12] Ullah, R., et al., Abnormal amyloid beta metabolism in systemic abnormalities and Alzheimer's pathology: Insights and therapeutic approaches from periphery. *Ageing Res Rev*, 2021. **71**: p. 101451.

[13] Jiang, C., et al., The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 2017. **58**(1): p. 1-15.

[14] Wu, S., et al., Excretion of Amyloid-β in the Gastrointestinal Tract and Regulation by the Gut Microbiota. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2022. **90**: p. 1153-1162.

[15] Pellegrini, C., et al., Prodromal Intestinal Events in Alzheimer's Disease (AD): Colonic Dysmotility and Inflammation Are Associated with Enteric AD-Related Protein Deposition. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(10).

[16] Manocha, G.D., et al., Temporal progression of Alzheimer's disease in brains and intestines of transgenic mice. *Neurobiol Aging*, 2019. **81**: p. 166-176.

[17] Puig, K.L., G.D. Manocha, and C.K. Combs, Amyloid precursor protein mediated changes in intestinal epithelial phenotype in vitro. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0119534.

[18] Joachim, C.L., H. Mori, and D.J. Selkoe, Amyloid beta-protein deposition in tissues other than brain in Alzheimer's disease. *Nature*, 1989. **341**(6239): p. 226-30.

[19] Willbold, D., et al., Amyloid-type Protein Aggregation and Prion-like Properties of Amyloids. *Chem Rev*, 2021. **121**(13): p. 8285-8307.

[20] Kulawik, A., et al., Advancements of the sFIDA method for oligomer-based diagnostics of neurodegenerative diseases. *FEBS Lett*, 2018. **592**(4): p. 516-534.

[21] Herrmann, Y., et al., sFIDA automation yields sub-femtomolar limit of detection for Aβ aggregates in body fluids. *Clin Biochem*, 2017. **50**(4-5): p. 244-247.

[22] Hülsemann, M., et al., Biofunctionalized Silica Nanoparticles: Standards in Amyloid-β Oligomer-Based Diagnosis of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 2016. **54**(1): p. 79-88.

[23] Pils, M., et al., Development and Implementation of an Internal Quality Control Sample to Standardize Oligomer-Based Diagnostics of Alzheimer’s Disease. *Diagnostics*, 2023. **13**(10): p. 1702.

[24] Blömeke, L., et al., Quantitative detection of α-Synuclein and Tau oligomers and other aggregates by digital single particle counting. *NPJ Parkinsons Dis*, 2022. **8**(1): p. 68.

[25] Wang-Dietrich, L., et al., The amyloid-β oligomer count in cerebrospinal fluid is a biomarker for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2013. **34**(4): p. 985-94.

[26] Schaffrath, A., et al., Patients with isolated REM-sleep behavior disorder have elevated levels of alpha-synuclein aggregates in stool. *NPJ Parkinsons Dis*, 2023. **9**(1): p. 14.

[27] Kass, B., et al., Aβ oligomer concentration in mouse and human brain and its drug-induced reduction ex vivo. *Cell Rep Med*, 2022. **3**(5): p. 100630.

[28] Lewis, S.J. and K.W. Heaton, Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol*, 1997. **32**(9): p. 920-4.

[29] Vagenende, V., M.G. Yap, and B.L. Trout, Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*, 2009. **48**(46): p. 11084-96.

[30] Rose, C., et al., The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 2015. **45**(17): p. 1827-1879.

[31] Stephen, A.M. and J.H. Cummings, The microbial contribution to human faecal mass. *J Med Microbiol*, 1980. **13**(1): p. 45-56.

[32] Phadia-AB. Stool Extraction Kit plus / Stool Extraction Buffer plus, instruction for use: 200/250/2500/5000-6665-020 / UK, version 2021-09-14. . 2021; Available on https://dfu.phadia.com/Data/Pdf/6130cb9570eec660e274806b.pdf [Accessed 23 January 2023].].

[33] ORGENTEC-Diagnostika-GmbH. Calprotectin, instruction for use: ORG 580_4, version ORG 580_IFU_EN_QM140866_2022-03-08_4. 2022; Available on https://products.orgentec.com/pdfs/ifu/ORG%20580_IFU_EN_QM140866_2022-03-08_4.pdf [Accessed 23 January 2023].].

[34] Bühlmann-Laboratories. Bühlmann Smart-Prep - Faecal sample preparation kit, Instruction for use: B-CAL-RD, version 2010-11-10. 2010; Available on https://www.buhlmannlabs.ch/wp-content/uploads/2015/01/B-CAL-RD_101110.pdf [Accessed 23 January 2023].].

[35] Immundiagnostik-AG. IDK Hemoglobin ELISA: For the in vitro determination of hemoglobin in stool, instruction for use: K 7816D, K7816D.20, version 2022-02-22. 2022; Available on https://www.immundiagnostik.com/media/pages/testkits/k-7816d/9a63870b70-1663639307/k7816d_2022-02-22_haemoglobin.pdf [Accessed 23 January 2023].].

[36] Demeditec-Diagnostics-GmbH. Calprotectin ELISA, instruction for use: DE849 V211014/DLB, version 2021-11-25. . 2021; Available on https://www.demeditec.de/de/produkte/calprotectin-elisa-de849/ifu-de849-calprotectin-elisa-211125-e.pdf [Accessed 23 January 2023].].

[37] Dornieden, S., et al., Characterization of a single-chain variable fragment recognizing a linear epitope of aβ: a biotechnical tool for studies on Alzheimer's disease? *PLoS One*, 2013. **8**(3): p. e59820.

[38] Andreasson, U., et al., A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. *Front Neurol*, 2015. **6**: p. 179.

[39] Vanderstichele, H.M., et al., Optimized Standard Operating Procedures for the Analysis of Cerebrospinal Fluid Aβ42 and the Ratios of Aβ Isoforms Using Low Protein Binding Tubes. *J Alzheimers Dis*, 2016. **53**(3): p. 1121-32.

[40] Varesi, A., et al., The Potential Role of Gut Microbiota in Alzheimer's Disease: From Diagnosis to Treatment. *Nutrients*, 2022. **14**(3).

[41] Qian, X.H., et al., Mechanisms of Short-Chain Fatty Acids Derived from Gut Microbiota in Alzheimer's Disease. *Aging Dis*, 2022. **13**(4): p. 1252-1266.

[42] Vogt, N.M., et al., Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 13537.

[43] Vandeputte, D., et al., Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut*, 2016. **65**(1): p. 57-62.

[44] Vanderstichele, H., et al., Potential sources of interference on Abeta immunoassays in biological samples. *Alzheimers Res Ther*, 2012. **4**(5): p. 39.

[45] Dimeski, G., Interference testing. *Clin Biochem Rev*, 2008. **29 Suppl 1**(Suppl 1): p. S43-8.

[46] Park, J.Y. and L.J. Kricka, *Chapter 5.3 - Interferences in Immunoassay*, in The Immunoassay Handbook (Fourth Edition), D. Wild, Editor. 2013, *Elsevier*: Oxford. p. 403-416.

[47] Armbruster, D.A. and T. Pry, Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev*, 2008. **29 Suppl 1**(Suppl 1): p. S49-52.

[48] van de Merbel, N., et al., Stability: recommendation for best practices and harmonization from the Global Bioanalysis Consortium Harmonization Team. *Aaps j*, 2014. **16**(3): p. 392-9.

[49] Salvadores, N., et al., Detection of misfolded Aβ oligomers for sensitive biochemical diagnosis of Alzheimer's disease. *Cell Rep*, 2014. **7**(1): p. 261-8.

[50] Teunissen, C.E., et al., Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease: towards clinical implementation. *Lancet Neurol*, 2022. **21**(1): p. 66-77.

[51] Paraskevaidi, M., et al., Diagnostic Biomarkers for Alzheimer's Disease Using Non-Invasive Specimens. *J Clin Med*, 2020. **9**(6).

[52] Lewczuk, P., et al., Clinical significance of fluid biomarkers in Alzheimer's Disease. *Pharmacol Rep*, 2020. **72**(3): p. 528-542.

[53] Minic, R. and I. Zivkovic, *Optimization, Validation and Standardization of ELISA*. 2020.

[54] Schoonenboom, N.S., et al., Effects of processing and storage conditions on amyloid beta (1-42) and tau concentrations in cerebrospinal fluid: implications for use in clinical practice. *Clin Chem*, 2005. **51**(1): p. 189-95.

[55] Yang, T., et al., A highly sensitive novel immunoassay specifically detects low levels of soluble Aβ oligomers in human cerebrospinal fluid. *Alzheimers Res Ther*, 2015. **7**(1): p. 14.

[56] Savage, M.J., et al., A sensitive aβ oligomer assay discriminates Alzheimer's and aged control cerebrospinal fluid. *J Neurosci*, 2014. **34**(8): p. 2884-97.

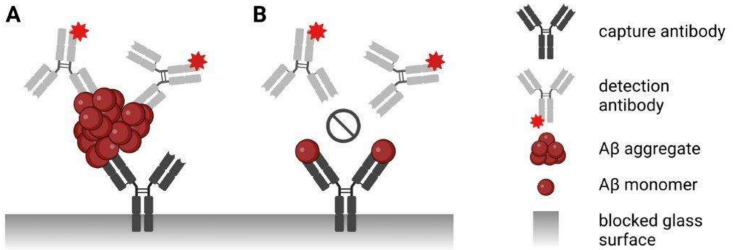
[57] Herskovits, A.Z., et al., A Luminex assay detects amyloid β oligomers in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e67898.

[58] Fukumoto, H., et al., High-molecular-weight beta-amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *Faseb j*, 2010. **24**(8): p. 2716-26.

[59] Hölttä, M., et al., Evaluating amyloid-β oligomers in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease. *PLoS One*, 2013. **8**(6): p. e66381.

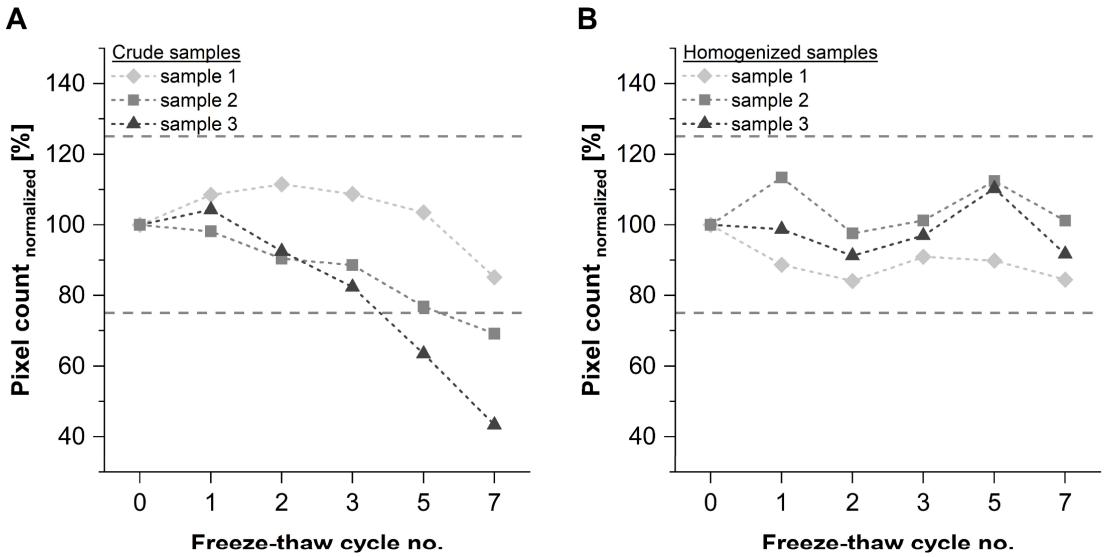
Main Figures and legends

Figure 1. Scheme of sFIDA principle.



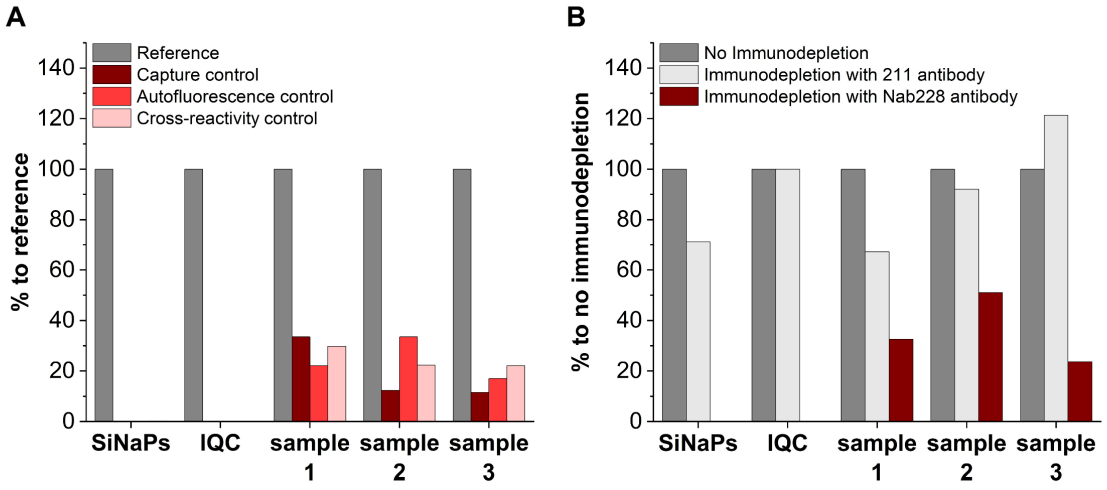
In sFIDA, capture antibodies directed against a linear epitope on Aβ (Nab228, directed against epitope amino acids 1−11) are immobilized on a glass surface, and unoccupied surface area is blocked with bovine serum albumin to reduce unspecific binding events. During sample incubation, monomeric and aggregated Aβ species are bound to the capture antibody. (A) Because sFIDA uses the same or overlapping epitopes for capture and detection, only Aβ aggregates are subsequently detected with fluorescence-labeled antibodies (IC16-CF633, directed against epitope amino acids 2−8). (B) For monomeric Aβ, this epitope is already masked by the capture antibody and cannot be bound by the detection antibody. Afterward, the assay surface is imaged by fluorescence microscopy, and pixels above a defined cutoff threshold are counted by image-data analysis (called pixel count). Finally, pixel-based readouts are calibrated into molar particle concentrations using silica nanoparticles (SiNaPs) coated with Aβ as calibration standards. Created with BioRender.com.

Figure 2. Influence of repeated freeze-thaw cycles on the stability of Aβ aggregates.



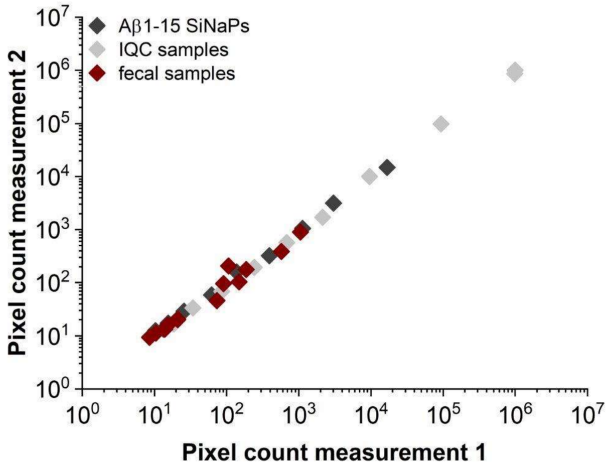
Normalized pixel counts of three crude (A) or homogenized (B) fecal samples (sample 1 = diamonds, low readout; sample 2 = square, intermediate readout; sample 3 = triangle, high readout) were plotted against freeze-thaw cycles. The tolerance range of ± 25% is depicted as dashed gray lines.

Figure 3. Percent signal reduction of different assay controls for the assessment of assay selectivity.



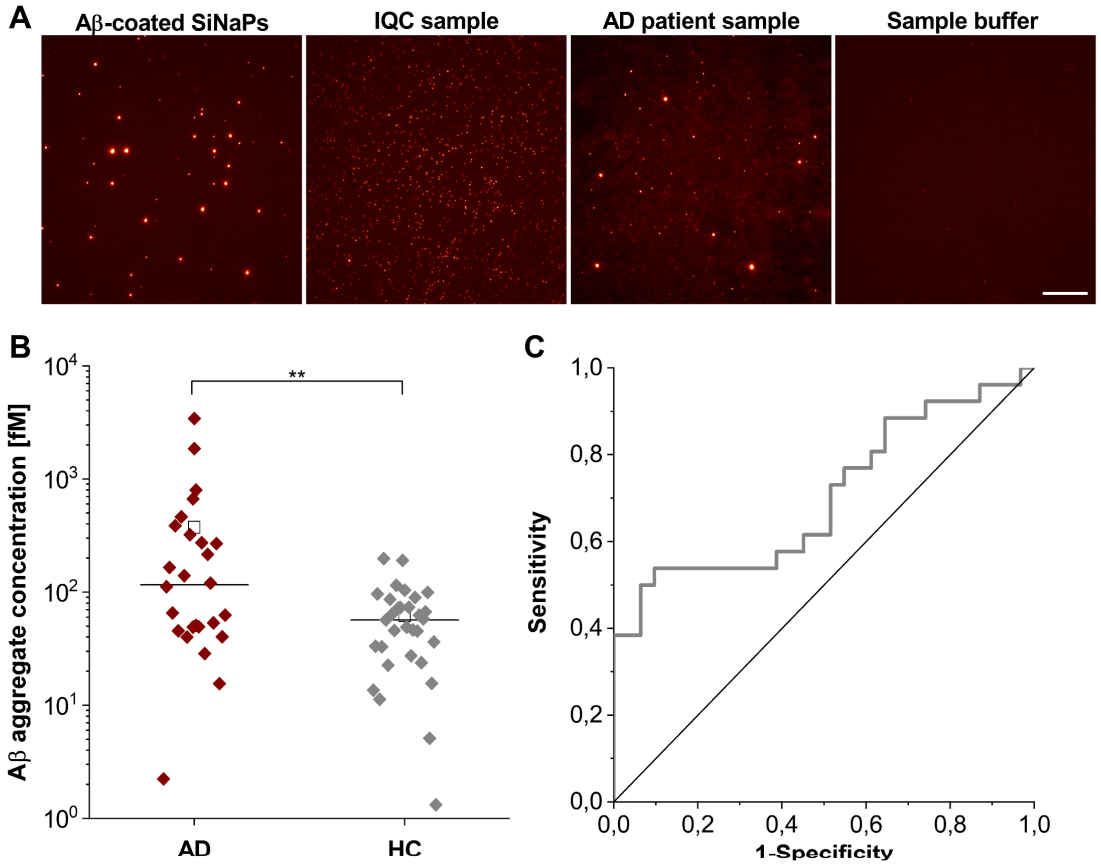
(**A**) Aβ-coated SiNaPs, IQC, and Aβ aggregates in three fecal samples were analyzed by sFIDA. Based on the observed pixel counts, the percent signal reduction of each assay control (no capture antibody: capture control, dark red; no detection probe: autofluorescence control, light red; detection probe against α-synuclein: cross-reactivity control, rose) in comparison to reference (standard assay setup) were calculated. (**B**) All samples were subjected to immunodepletion using magnetic beads linked to Aβ-specific antibody (Nab228) and control beads linked to α-synuclein-specific antibody (211). Based on the observed pixel counts of non-depleted (dark gray), 211-depleted (light gray), and Nab228-depleted (red) samples, percent signal reduction was calculated.

Figure 4. Independent measurements of Aβ yield high comparability.



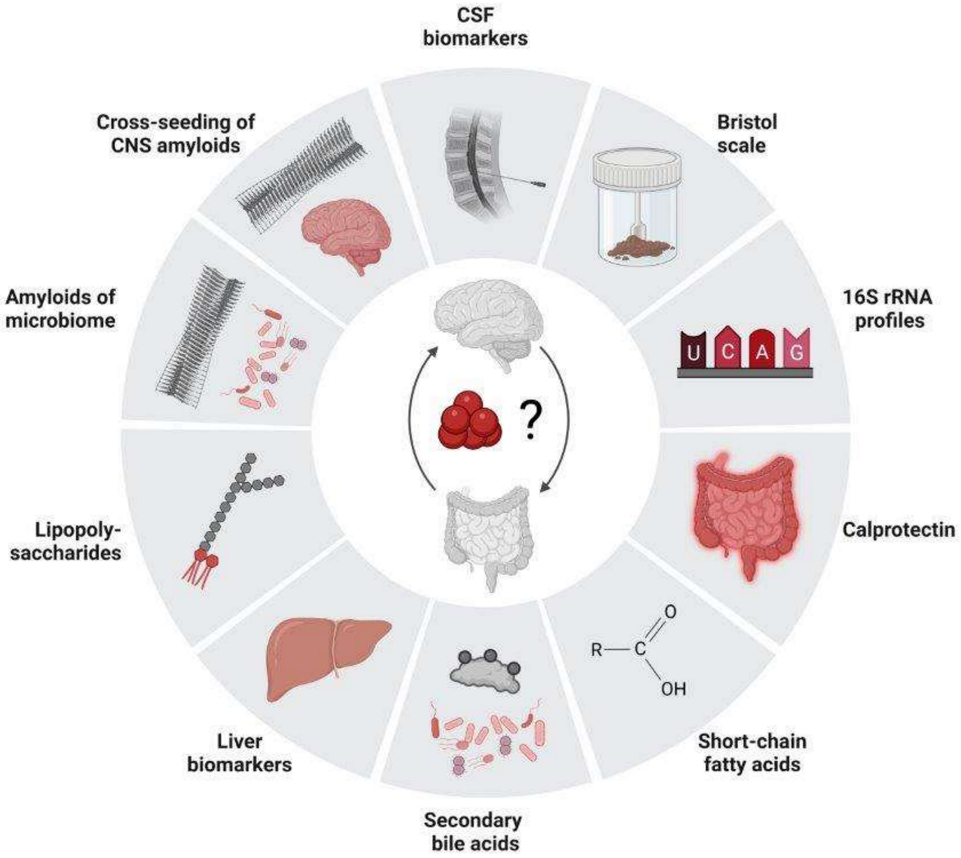
For Aβ-coated SiNaPs (dark grey), IQC sample (light gray), and 13 fecal samples (red), pixel counts of the second measurement were plotted against pixel counts of the first measurement. Because the second measurement was carried out months later, there were minor changes in used reagent lots, e.g., manufacturing date of washing buffers, and the used homogenized fecal samples were subjected to an additional freeze-thaw cycle. NOTE. The logarithmic scaling.

Figure 5. Representative TIRFM images, molar particle concentration of fecal Aβ aggregates and receiver operating characteristic.



(**A**) Representative TIRFM images for the red channel (IC16-CF633, excitation 635 nm, emission 705 nm, exposure time 1000 ms, gain 1000) of 1 pM Aβ-coated SiNaPs, 100 pM synthetic Aβ1−42 oligomers (based on total Aβ concentration), fecal sample (AD patient) and sample buffer control. For better illustration of 14-bit images, color and contrast were adjusted using ImageJ software (colormap: red hot, contrast: maximum grayscale value 8000). Scale bar: 20 µm. (**B**) Concentrations of fecal Aβ aggregates of AD patients were significantly elevated with a *p*-value of 0.009 compared to HC. Significant differences between both cohorts were calculated with a Mann−Whitney U test (**p: ≤ 0.01). NOTE. The logarithmic scaling (line = median, square = mean). (**C**) In receiver operating characteristic (ROC) analysis, discrimination of AD patients versus HC showed a specificity of 90.3% and a sensitivity of 53.8% with an AUC of 0.703.

775 **Figure 6. Association of fecal Aβ aggregates with additional biomarkers affecting AD pathology.**



776

777 The combination of fecal Aβ aggregates with further biomarkers may provide new insights into mechanism of brain-gut-
778 microbiota axis and AD pathogenesis. Therefore, in addition to CSF biomarkers (Aβ40, Aβ42, phosphorylated and total
779 Tau) and Bristol scale, 16S rRNA profiles fecal calprotectin, short-chain fatty acids, and secondary bile acids, liver
780 biomarkers, and lipopolysaccharides should be determined in the future. Because amyloids produced by gut microbiome
781 share similarities in tertiary structure with CNS amyloids, they may act in a prion-like manner and induce misfolding,
782 aggregation, and deposition of Aβ and may cross-seed with neuronal amyloids once they have entered the brain due to
783 increased permeability of the blood-brain barrier. Created with BioRender.com.

784

785

786 ## Main Table and legend

787 **Table 1. Demographic and clinical information on AD patients and HC that donated fecal samples.**

Characteristics	AD	HC
Number	26	31
Female	42.3%	64.5%
Age [years ± SD]	71.1 ± 8.6	49.2 ± 16.4
Bristol scale [score ± SD]	4.4 ± 0.9	5.1 ± 0.8

788 [a]Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; HC, healthy controls; SD, standard deviation.

4.5 Quantifizierung von fäkalen α-Synuclein-Aggregaten

Patients with isolated REM-sleep behavior disorder have elevated levels of alpha-synuclein aggregates in stool

Autoren	Anja Schaffrath, Sophia Schleyken, Aline Seger, Hannah Jergas, Pelin Özdüzenciler, **Marlene Pils**, Lara Blömeke, Anneliese Cousin, Johannes Willbold, Tuyen Bujnicki, Oliver Bannach, Gereon R. Fink, Dieter Willbold, Michael Sommerauer, Michael T. Barbe und Gültekin Tamgüney
Publiziert in	**npj Parkinson's Disease (2023) 9:14 (Februar 2023)** Impact-Faktor: 9,705 (2021) DOI: 10.1038/s41531-023-00458-4
Beitrag	**Eigener Anteil 20%** ▪ Weiterentwicklung der sFIDA-Technologie für den Nachweis von α-Synuclein Aggregaten in humanen Stuhlproben ▪ Etablierung Homogenisierungsprotokoll ▪ Beteiligung bei der Auswertung und Analyse der sFIDA-Daten ▪ Diskussion der Ergebnisse ▪ Beteiligung beim Verfassen und Korrigieren des Manuskripts
Druckgenehmigung	siehe Anhang 24

npj | parkinson's disease

www.nature.com/npjparkd

ARTICLE OPEN

Check for updates

Patients with isolated REM-sleep behavior disorder have elevated levels of alpha-synuclein aggregates in stool

Anja Schaffrath[1], Sophia Schleyken[2], Aline Seger[2], Hannah Jergas[2], Pelin Özdüzenciler[1], Marlene Pils[1,3], Lara Blömeke[1,3], Anneliese Cousin[1], Johannes Willbold[1], Tuyen Bujnicki[1], Oliver Bannach[1,3,4], Gereon R. Fink[2,5], Dieter Willbold[1,4], Michael Sommerauer[2,5], Michael T. Barbe[2] and Gültekin Tamgüney[1,4]✉

Misfolded and aggregated α-synuclein is a neuropathological hallmark of Parkinson's disease (PD). Thus, α-synuclein aggregates are regarded as a biomarker for the development of diagnostic assays. Quantification of α-synuclein aggregates in body fluids is challenging, and requires highly sensitive and specific assays. Recent studies suggest that α-synuclein aggregates may be shed into stool. We used surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) to detect and quantify single particles of α-synuclein aggregates in stool of 94 PD patients, 72 isolated rapid eye movement sleep behavior disorder (iRBD) patients, and 51 healthy controls. We measured significantly elevated concentrations of α-synuclein aggregates in stool of iRBD patients versus those of controls ($p = 0.024$) or PD patients ($p < 0.001$). Our results show that α-synuclein aggregates are excreted in stool and can be measured using the sFIDA assay, which could support the diagnosis of prodromal synucleinopathies.

npj Parkinson's Disease (2023)9:14 ; https://doi.org/10.1038/s41531-023-00458-4

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies (DLB), and multiple system atrophy (MSA) are synucleinopathies characterized by the oligomerization and aggregation of α-synuclein into assemblies rich in cross-beta structure, which is a critical event in the pathogenesis of these diseases[1–6]. Because α-synuclein fibrils deposit in Lewy bodies and Lewy neurites in neurons in PD and DLB or in neuronal and glial cytoplasmic inclusions in MSA, small oligomeric intermediates of α-synuclein that are still soluble are thought to be the most toxic to neurons[7–9]. The diagnosis of synucleinopathies primarily relies on clinical assessment and brain imaging, which are either imprecise or costly, especially during early disease stages, highlighting the urgent need for a biomarker for early and reliable disease detection[10,11]. Also, for potential therapies to be most effective, detecting synucleinopathies at early stages may be advantageous when the burden of pathologic α-synuclein and neuronal loss are minimal. In the prodromal stage of synucleinopathies, non-motor symptoms, such as hyposmia and gastrointestinal dysfunction, can appear as early symptoms up to 20 years before cardinal motor symptoms manifest[10,12]. Also, most patients with isolated rapid eye movement (REM) sleep behavior disorder (iRBD), a parasomnia characterized by REM sleep without atonia and vivid dream enactment, convert to PD, DLB, or MSA within 10–20 years of diagnosis[13,14]. IRBD patients display many non-motor symptoms seen in PD patients including hyposmia, orthostatic hypotension, and gastrointestinal dysfunction[15]. Importantly, iRBD patients also accumulate pathologic α-synuclein assemblies in the central and peripheral nervous system[16,17]. Besides the nervous system and cerebrospinal fluid (CSF), α-synuclein aggregates have been detected in skin, olfactory mucosa, saliva, tears, urine, and blood of PD patients, which may all serve as potential sources for diagnosing synucleinopathies[18–26]. Histological findings also show that enteric neurons in the gastrointestinal submucosa of PD patients contain pathologic α-synuclein, even at prodromal stages[27–29]. Together with findings of pathological α-synuclein in the enteric nervous system (ENS) and the dorsal motor nucleus of the vagus nerve and the anterior olfactory bulb as the earliest lesion sites in PD, Braak and colleagues postulated the dual-hit hypothesis suggesting that α-synuclein pathology spreads from the olfactory bulb to the temporal lobes, and from the ENS via the vagus nerve to the CNS[30,31]. Further, several studies suggest that pathologic α-synuclein assemblies have prion-like properties, allowing them to multiply and propagate between neurons in the nervous system and to spread across large distances in the brain and body, including from the ENS to the CNS and vice versa[32–35].

Earlier findings in transgenic TgM83$^{+/-}$ mice expressing human α-synuclein demonstrated that α-synuclein fibrils used for an oral challenge could cross the mucosal barrier of the gastrointestinal tract after which they invaded the nervous system and triggered a synucleinopathy in these mice[36]. Here, we hypothesized that human pathologic α-synuclein assemblies released from, e.g., affected enteric neurons may traverse the mucosal lining of the gastrointestinal tract and be excreted in stool. This would involve a mechanism similar to the environmental shedding of prions in feces of deer and elk infected with chronic wasting disease or that of sheep and goats infected with scrapie[37,38].

It remains challenging to specifically detect protein aggregates in body fluids as the expected concentrations are very low, requiring a high sensitivity that standard techniques such as ELISA do not provide[39]. Moreover, monomers are present in great excess, necessitating that assays have a high selectivity for oligomers. To overcome these challenges in detecting aggregated α-synuclein assemblies, we used the sFIDA (surface-based fluorescence intensity distribution analysis) assay, which uses antibodies targeting overlapping or identical epitopes, enabling it to specifically detect

[1]Institute of Biological Information Processing (Structural Biochemistry: IBI-7), Forschungszentrum Jülich, 52428 Jülich, Germany. [2]Department of Neurology, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, 50923 Köln, Germany. [3]attyloid GmbH, 40225 Düsseldorf, Germany. [4]Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany. [5]Cognitive Neuroscience, Institute of Neuroscience and Medicine (INM-3), Forschungszentrum Jülich, 52428 Jülich, Germany. ✉email: erdem@fz-juelich.de

Published in partnership with the Parkinson's Foundation

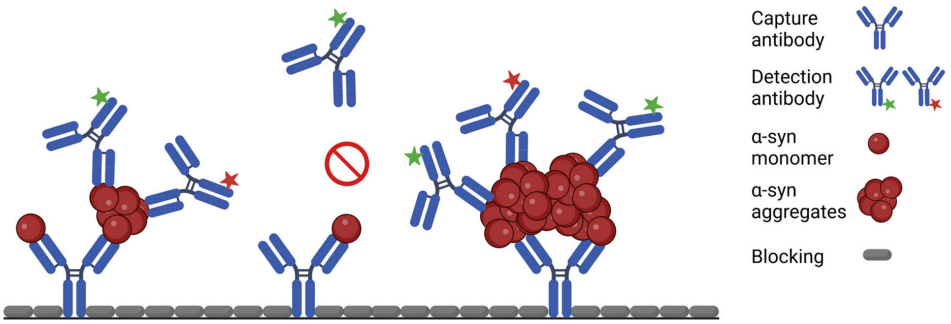


Fig. 1 Schematic figure of the sFIDA assay principle. The glass surface of a microtiter plate is coated with a capture antibody (Syn211) against amino acid residues 121–125 of α-synuclein. The capture antibody binds both α-synuclein monomers and aggregates in the sample. The detection antibody (Syn211), a 1:1 mixture of this antibody labeled with fluorescent dye CF633 or CF488A, can only detect aggregates since it is directed against the same epitope as the capture antibody. The epitope on the monomer bound to the capture antibody is masked by the capture antibody and can, thus, not be bound by the detection antibody. The microtiter plate wells are imaged by two-channel confocal fluorescence microscopy to detect single particles. Only particles decorated with at least two different detection antibodies (colocalized signal) contribute to the sFIDA readout signal. The image was created with BioRender.com.

Table 1. Demographic and clinical information on patients and controls that donated stool samples.

	PD	iRBD	HC	*p* (PD vs. HC)	*p* (PD vs. iRBD)	*p* (iRBD vs. HC)
Number	94	72	51	N/A	N/A	N/A
Female [number (percentage)]	29 (30.9)	10 (13.9)	31 (60.8)	0.001	n.s.	$p < 0.001$
Age [years ± SD]	64.5 ± 9.9	66.3 ± 6.4	56.4 ± 17.1	n.s.	n.s.	$p < 0.05$
Education [years ± SD]	15.4 ± 4.1	15.9 ± 4.0	16.0 ± 3.3	n.s.	n.s.	n.s.
Disease duration [years ± SD]	9.0 ± 5.8	7.4 ± 5.5	N/A	N/A	n.s.	N/A
DemTect [score ± SD]	13.8 ± 3.3	14.8 ± 2.3	15.9 ± 2.3	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.05$
MDS-UPDRS III [score ± SD]	24.1 ± 14.9	4.0 ± 2.7	N/A	N/A	$p < 0.001$	N/A
Non-Motor Symptoms Scale [score ± SD]	30.6 ± 23.1	16.2 ± 18.0	12.5 ± 14.4	$p < 0.001$	$p < 0.001$	n.s.
CCCSS [score ± SD]	4.1 ± 4.0	2.8 ± 2.7	2.5 ± 2.5	$p < 0.05$	$p < 0.05$	n.s.
Scent [score ± SD]	5.3 ± 2.6	6.6 ± 2.7	10.4 ± 1.7	$p < 0.001$	$p < 0.05$	$p < 0.001$
Screening questionnaire for parkinsonism [score ± SD]	5.6 ± 2.2	0.3 ± 0.8	0.3 ± 0.8	$p < 0.001$	$p < 0.001$	n.s.
IRBD screening questionnaire [score ± SD]	4.9 ± 3.0	9.0 ± 2.7	1.7 ± 1.6	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
Hoehn and Yahr [score ± SD]	3.0 ± 0.9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Levodopa challenge test [% ± SD]	40 ± 20	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

PD Parkinson's disease, *iRBD* isolated rapid eye movement sleep behavior disorder, *HC* healthy control, *SD* standard deviation, *MDS-UPDRS III* Movement Disorder Society's Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part III, *CCCSS* Cleveland Clinic Constipation Scoring System, *N/A* not available, *n.s.* not significant.

aggregates in the presence of monomers[40–43]. Here, the Syn211 antibody that recognizes amino acids 121–125 on α-synuclein is attached to a glass surface and captures α-synuclein species in stool homogenates[44]. Next, the captured α-synuclein species are detected with a blend of two Syn211 antibodies, each labeled with a different fluorescent dye, one green and one red (Fig. 1). The surface is then scanned by two-channel fluorescent confocal microscopy, yielding single particle sensitivity. Because the Syn211 antibody only recognizes a single linear epitope on α-synuclein, using the same Syn211 antibody to capture and detect α-synuclein species guarantees specific quantitation of only aggregated α-synuclein species. Monomers with a single linear epitope are captured but cannot be detected and are thus disregarded. Since the sFIDA assay in its current version does not differentiate between α-synuclein species from small oligomers to large fibrils, we refer to analytes measured in sFIDA as aggregates.

We recently used sFIDA to quantitate α-synuclein and tau aggregates in CSF of patients with PD, DLB, and other neurodegenerative diseases, showing that sFIDA is a reliable, highly sensitive, and robust assay for the diagnosis of neurodegenerative diseases and drug development[40]. The aim of this study was to detect and quantify α-synuclein aggregates in human stool and, more importantly, to demonstrate its possible use in a clinical setting and potentially for drug development. We adapted the sFIDA assay to quantify α-synuclein aggregates in stool samples of 217 subjects. We technically validated this assay by assessing parameters like the limit of detection (LOD), coefficient of variation (CV%), inter-assay correlation, and cross-reactivity to other aggregates.

RESULTS

Descriptive analysis of the patient and control groups

We collected stool samples of PD ($n = 94$) and iRBD patients ($n = 72$) and healthy controls (HC) without past or present neurological disorder ($n = 51$) to determine if and how much α-synuclein aggregates they contain. Demographic and clinical information for these three cohorts on sex, age, education, disease duration, memory, motor, non-motor, olfactory, constipation, and further information are available in Table 1, and for individual

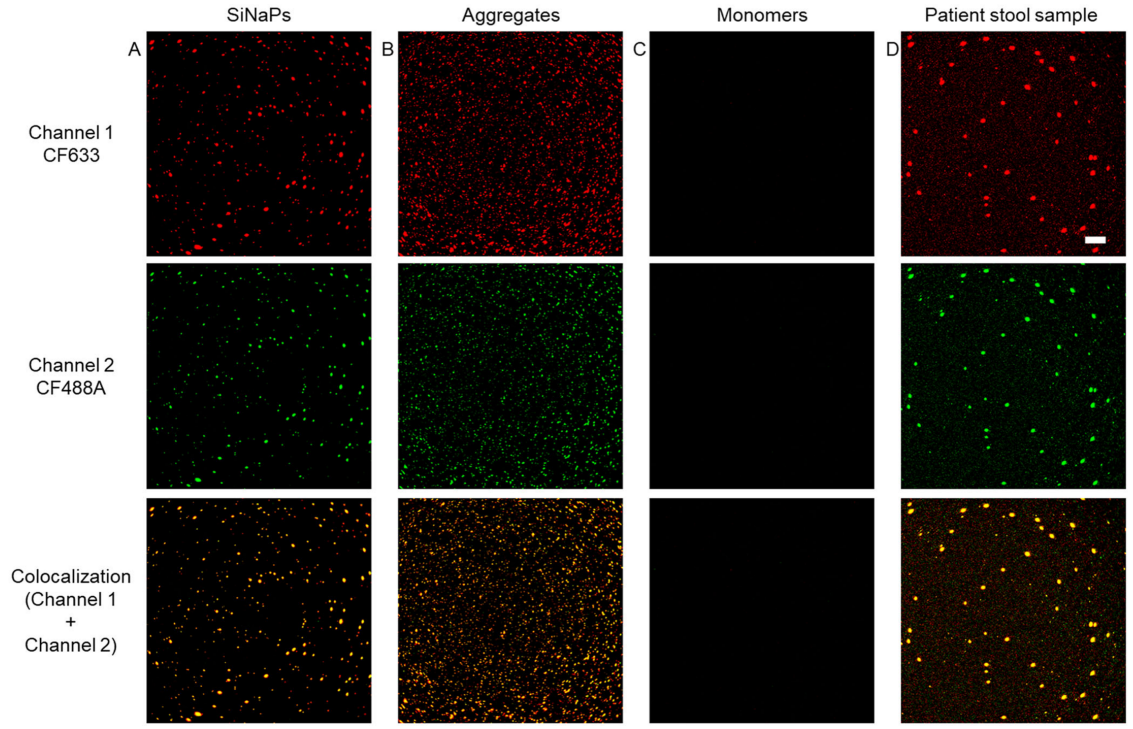


Fig. 2 Fluorescence images of α-synuclein SiNaPs, synthetic α-synuclein aggregates, monomers, and a PD stool sample. Shown are exemplary fluorescence images taken in the red fluorescence channel (channel 1, CF633), green fluorescence channel (channel 2, CF488A), and the colocalized fluorescence signal of both channels of **a** 0.32 pM α-synuclein SiNaPs in buffer **b** 1581 pM synthetic α-synuclein aggregates in buffer (concentration based on the deployed monomer concentration), **c** 1000 pM α-synuclein monomers in buffer, and **d** a stool sample of a PD patient. To better visualize the 16-bit images, the contrast and minimum/maximum values were adjusted. Scale bar: 30 µm.

patients and healthy controls in Supplementary Table 1. There was a gender bias towards men in the PD (69.1%) and more so in the iRBD (86.1%) cohort. In the control group, gender bias was slightly more towards women (60.8%). The age of PD (64.5 ± 9.9 years) and iRBD patients (66.3 ± 6.4 years) did not significantly differ, while healthy controls were on average 8–10 years younger (56.4 ± 17.1 years). We did not observe significant differences in the duration of education between the three groups. Disease duration in PD patients was 9.0 ± 5.8 years and in iRBD patients 7.4 ± 5.5 years. The cognitive performance (DemTect score) of healthy controls (15.9 ± 2.3) was significantly higher than that of PD (13.8 ± 3.3) and iRBD patients (14.8 ± 2.3, Supplementary Fig. 1a)[45]. PD patients (24.1 ± 14.9) scored significantly higher than iRBD patients (4.0 ± 2.7) on the Movement Disorder Society's Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part III (MDS-UPDRS III)[46]. Equally, PD patients (30.6 ± 23.1) scored significantly higher on the Non-Motor Symptoms Scale (NMSS) for PD than iRBD patients (16.2 ± 18.0) or healthy controls (12.5 ± 14.4, Supplementary Fig. 1b)[47]. Also, PD patients (4.1 ± 4.0) were significantly more constipated than iRBD patients (2.8 ± 2.7) and healthy controls (2.5 ± 2.5), based on the Cleveland Clinic Constipation Scoring System (Supplementary Fig. 1c)[48]. PD patients (5.3 ± 2.6) also suffered more from hyposmia (Supplementary Fig. 1d), reflected in a significantly lower scent score, than iRBD patients (6.6 ± 2.7) or healthy controls (10.4 ± 1.7). In addition, PD patients (5.6 ± 2.2) scored significantly higher in the screening questionnaire for parkinsonism compared to iRBD patients (0.3 ± 0.8) and healthy controls (0.3 ± 0.8, Supplementary Fig. 1e)[49]. The results of the RBD screening questionnaire (RBDSQ, Supplementary Fig. 1f) also showed significant differences between iRBD (9.0 ± 2.7) and PD patients (4.9 ± 3.0) or healthy controls (1.7 ± 1.6), as well as between PD patients and healthy controls[50]. On average, PD patients scored 3.0 ± 0.9 on the Hoehn and Yahr scale and 40 ± 20% on the levodopa challenge test[51].

sFIDA measurements of α-synuclein silica nanoparticles (SiNaPs) and stool samples show a low intra-assay variance

As a standard for signal calibration and LOD calculation, we used silica nanoparticles (SiNaPs), each carrying multiple monomers of α-synuclein[42]. Figure 2 shows exemplary images of the α-synuclein SiNaPs standard, synthetic α-synuclein aggregates, the buffer control, and a PD stool sample for the red fluorescence channel (channel one), the green fluorescence channel (channel two), and the colocalized signal of both channels. For analysis, only colocalized pixels (sFIDA readout) were utilized. Because of the high number of samples, the measurements had to be performed on nine 384-well microtiter plates. For all experiments, the mean intra-assay coefficient of variation (CV%) was calculated from the sFIDA readout of the four replicates of each sample to be 28.4% for the α-synuclein SiNaPs standard and 26.3% for the stool samples (Supplementary Table 2).

Repeated sFIDA measurements of α-synuclein aggregates in stool samples show a low inter-assay variance

To assess the inter-assay variance between independent sFIDA assays, we repeatedly measured 50 randomly selected stool

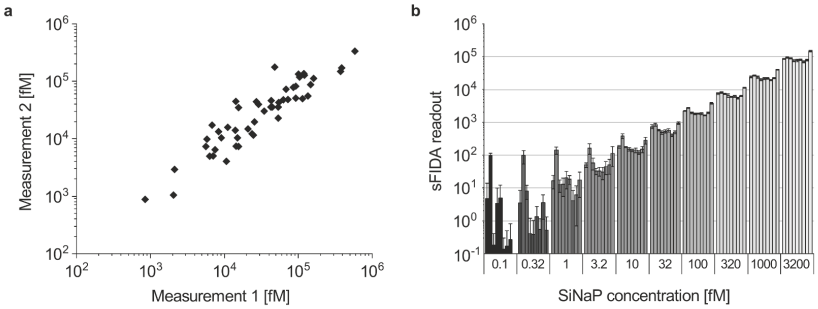


Fig. 3 Repeated measurements of α-synuclein aggregates in stool and of α-synuclein SiNaPs yield highly replicable results. We tested the inter-assay variance of the sFIDA assay for α-synuclein aggregates. **a** Repeated measurements of 50 randomly selected stool samples by the same operator in the same laboratory on different days were highly reproducible with a Spearman coefficient of correlation of $r = 0.916$ ($p = 0.2 \times 10^{-6}$). **b** Nine independent measurements of a dilution series of the α-synuclein SiNaPs used for calibration of the stool sample data set also showed highly replicable results for all concentrations with a Spearman coefficient of correlation of $r = 0.979$ ($p = 3.85 \times 10^{-62}$). Error bars indicate standard deviation.

samples on two different days. Both measurements showed a significant correlation with a Spearman correlation coefficient of $r = 0.916$ ($p = 0.2 \times 10^{-6}$) (Fig. 3a). Next, we confirmed the reproducibility of the assay by repeatedly measuring the α-synuclein SiNaPs standard used for calibrating all stool samples in nine independent assays (Fig. 3b). The repeated measurements yielded highly reproducible results with a Spearman correlation coefficient of $r = 0.979$ ($p = 3.85 \times 10^{-62}$).

sFIDA measurements of α-synuclein aggregates are highly selective

To further evaluate the sFIDA assay, we examined the ability of unspecific binding of synthetic α-synuclein aggregates or α-synuclein SiNaPs to the surface of the 384-well microtiter plate by comparing the readout in the presence and absence of a capture antibody. Relative to the readouts of α-synuclein aggregates and SiNaPs measured with a capture antibody, readouts without a capture antibody were reduced by 97% and 96%, respectively (Fig. 4a). We also measured samples in the absence of detection antibodies. This reduced the readout for synthetic α-synuclein aggregates fully (100%), which became indistinguishable from the generally low buffer control (BC) and for α-synuclein SiNaPs by 98%. Additionally, we tested the ability of the sFIDA assay to detect monomeric α-synuclein. As shown in Fig. 4b, the readout for α-synuclein monomers was as negligible as the BC readout and much lower than the readout of the positive control, which consisted of synthetic α-synuclein aggregates made from the same monomer concentration. Our results show that the potential presence of monomeric α-synuclein in stool, which most probably is degraded in this particular environment, did not influence the sFIDA readout. To determine the cross-reactivity of the sFIDA assay, we used the NAB228 antibody against amyloid-beta (Aβ) as a capture antibody and synthetic α-synuclein aggregates or SiNaPs as samples. This reduced the sFIDA readout for synthetic α-synuclein aggregates by 98% and that for α-synuclein SiNaPs by almost 100% (Fig. 4b).

At last, to determine the selectivity of the sFIDA assay, we measured synthetic Aβ aggregates and Aβ SiNaPs using the Syn211 antibody against α-synuclein for capture and detection. As a positive control for detecting Aβ aggregates and SiNaPs, we used NAB228 as a capture antibody and 6E10 and IC16 as detection antibodies. In contrast to this antibody combination specific for Aβ, antibodies specific for α-synuclein did not detect Aβ aggregates or Aβ SiNaPs (Fig. 4c).

Immunodepletion removes α-synuclein aggregates in samples

To prove that sFIDA measurements are selective for α-synuclein aggregates, we performed an immunodepletion. Samples were incubated with dynabeads coupled to the Syn211 antibody specific for α-synuclein to remove α-synuclein aggregates in stool or α-synuclein SiNaPs. As a further control, samples were also incubated with blank dynabeads not coupled to antibodies for mock immunodepletions. After immunodepletion, supernatants were analyzed with sFIDA. The sFIDA readout for immunodepleted stool samples was on average decreased by 73%, and for immunodepleted α-synuclein SiNaPs by 100% (Fig. 5a, b). Mock immunodepletion of the same samples resulted in a reduction of only about 7% compared to readouts without immunodepletion (Fig. 5b). This minimal reduction could have been caused by proteolytic digestion or disassembly of aggregates, or unspecific adhesion of aggregates to beads during incubation at room temperature.

sFIDA detects attomolar concentrations of α-synuclein SiNaPs

The sensitivity of the sFIDA assay was determined using the α-synuclein SiNaPs standard. To achieve this, a one-sided Mann-Whitney U test was applied to determine the lowest concentration significantly different from the buffer control for each SiNaPs standard to standardize the calibration range and determine the LOD. Based on these results, the lower limit of the calibration curve was set to 0.32 fM and the upper limit to 3200 fM. In all experiments, we observed a correlation between the sFIDA readout and the corresponding SiNaPs concentration with a Spearman correlation coefficient of $r = 0.979$ ($p = 3.85 \times 10^{-62}$). After calibration, the mean LOD was 0.3 fM for all experiments (for individual LOD values see Supplementary Table 3). For all measured samples, aggregate concentrations were above the LOD of the associated experiment (Supplementary Table 4).

α-Synuclein aggregate concentrations are elevated in stool of iRBD patients

We finally used the sFIDA assay to measure α-synuclein aggregate concentrations in stool of PD and iRBD patients, and healthy controls. Using the α-synuclein SiNaPs standard, we calibrated the sFIDA readout of all samples and calculated α-synuclein aggregate concentrations (Supplementary Table 1). Statistical analyses were performed using non-parametric tests because none of the three groups showed a normal distribution (p-value < 0.05, Supplementary Table 5). The median concentration of α-synuclein aggregates in stool samples of iRBD patients (9.2 fM) was significantly elevated compared to those of the control group (5.2 fM, $p = 0.024$) as well as

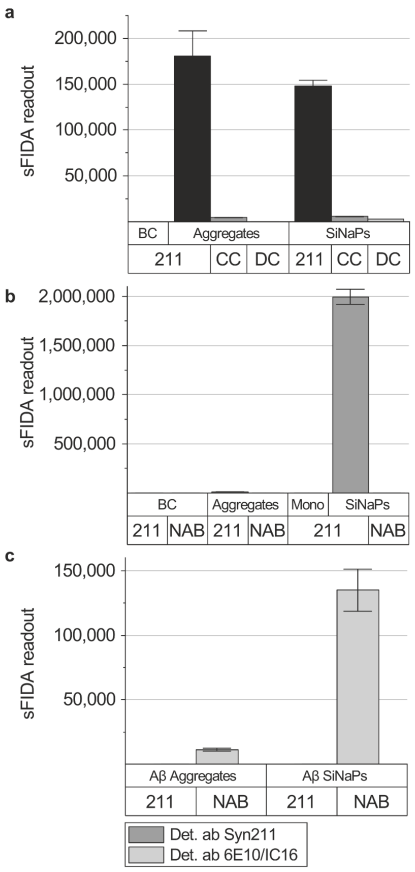


Fig. 4 sFIDA with antibodies against α-synuclein specifically detects α-synuclein aggregates and α-synuclein SiNaPs but not α-synuclein monomers, Aβ aggregates, or Aβ SiNaPs. a When either the capture antibody or the detection antibodies were omitted (capture control (CC), detection control (DC)), the sFIDA readout for the CC was reduced by 96% for α-synuclein SiNaPs and 97% for α-synuclein aggregates of the respective readout with a capture antibody. For the DC, the sFIDA readout was reduced by 98% for α-synuclein SiNaPs, and entirely for α-synuclein aggregates (100%), where the sFIDA readout was indistinguishable from the buffer control (BC). **b** The sFIDA readout of α-synuclein SiNaPs and α-synuclein aggregates, when captured with the NAB228 antibody against beta-amyloid (Aβ), was reduced by almost 100% for α-synuclein SiNaPs and 98% for synthetic α-synuclein aggregates compared to the signal with Syn211 capture antibody. The sFIDA readout of α-synuclein monomers (Mono) was reduced to the level of the BC compared to the same concentration of monomers in aggregated α-synuclein. **c** Additionally, Aβ aggregates and Aβ SiNaPs were captured and detected with the Syn211 antibody against α-synuclein. As a positive control, the same Aβ aggregates and Aβ SiNaPs were captured with antibodies specific to Aβ (capture antibody: NAB228, detection antibodies: 6E10/IC16). The graph shows that the Syn211 antibody does not detect Aβ aggregates or Aβ SiNaPs. Error bars indicate standard deviation.

those of PD patients (3.8 fM, $p < 0.001$) when using the Kruskal–Wallis H test (Fig. 6a). Our findings for the iRBD cohort remained significant when the two highest outliers in this cohort were ignored or when adjusted for sex ($p < 0.001$). No difference was detected between PD patients and the control group. Receiver operating characteristic (ROC) curves (Fig. 6b) revealed a high sensitivity (>75%) of the sFIDA assay in detecting α-synuclein aggregates in stool of iRBD patients versus healthy controls or PD patients but a lower specificity (iRBD vs. PD: 52.1%; iRBD vs. HC: 49.0%; Table 2). In contrast, the sFIDA assay was highly specific (96.1%) but much less sensitive (6.4%) in detecting α-synuclein aggregates in stool samples of PD patients versus healthy controls. We also observed a weak positive correlation with a Spearman coefficient between the DemTect score and α-synuclein aggregate concentrations ($r = 0.221$, $p < 0.05$), and between the RBDSQ score and α-synuclein aggregate concentrations ($r = 0.223$, $p < 0.05$), but no other correlations in stool of PD patients, iRBD patients or healthy controls (Supplementary Table 6).

DISCUSSION

We demonstrated that α-synuclein aggregates can be detected and quantified in stool, proving that not only α-synuclein aggregates are secreted from the body into the lumen of the gastrointestinal tract and excreted in stool, but also that the sFIDA assay can be applied to stool samples to reveal the existence of α-synuclein aggregates in a subgroup of humans. To investigate the origin and fate of α-synuclein aggregates in the gastrointestinal tract is essential in the future. Also, this provides opportunities to explore the concentration of α-synuclein aggregates in stool for the diagnosis of neurodegenerative diseases. By omitting the Syn211 capture or detection antibodies, changing the Syn211 capture antibody to one specific for Aβ, or changing the substrate to α-synuclein monomers, Aβ aggregates, or Aβ SiNaPs, we showed that the stool-adapted sFIDA assay measures α-synuclein aggregate and α-synuclein SiNaP concentrations very specifically and sensitively over a wide range of concentrations. We observed an overlap between patients and healthy controls, resulting in a specificity of 49.0% and a sensitivity of 76.4% for discriminating iRBD patients from healthy controls, and a specificity of 52.1% and a sensitivity of 80.6% for discriminating iRBD and PD patients. We were unable to discriminate PD patients from healthy controls. Our results are less specific but almost as sensitive as other studies aiming to discriminate α-synuclein aggregate concentrations in CSF samples of different synucleinopathies from healthy controls[40,52,53]. We are not aware of any other studies that have attempted to quantify α-synuclein aggregate concentrations in stool, making a comparison of our results with previous ones, e.g., in CSF is not straightforward. All measured stool samples showed concentrations above the determined LOD with values between 0.1 M and 100 pM, with the majority of the samples (87%) showing concentrations between 1 fM and 300 fM. Surprisingly, stool of iRBD patients showed significantly elevated levels of α-synuclein aggregates compared to healthy controls. In contrast to this, stool of PD patients not only showed significantly lower levels of α-synuclein aggregates than those of iRBD patients but also showed no difference to healthy controls (Fig. 6a). For CSF, it has previously been shown that α-synuclein aggregate concentrations are significantly elevated in PD and iRBD patients compared to healthy controls[24,40,52,54]. Further, several longitudinal studies in PD patients showed an increase of aggregated α-synuclein in CSF with disease progression[55,56]. One explanation of why we did not observe an increase of α-synuclein aggregate concentrations in stool of PD patients or a correlation with age or disease duration may be the recently proposed "brain-first" and "body-first" PD subtypes with different affection of the ENS, making it harder to observe a difference to healthy controls[57–59]. Still, separation of potential brain-first and body-first PD is most reliable in de novo PD using polysomnography to detect RBD. As we had mid-stage PD samples and only a questionnaire-based evaluation of RBD symptoms, we could not reliably separate our PD patient cohort in brain-first and body-first PD subtypes. Another explanation might be that levels of α-synuclein aggregates in stool of PD patients do not behave like those in CSF. More α-synuclein aggregates could be excreted in stool during prodromal and early phases of PD and

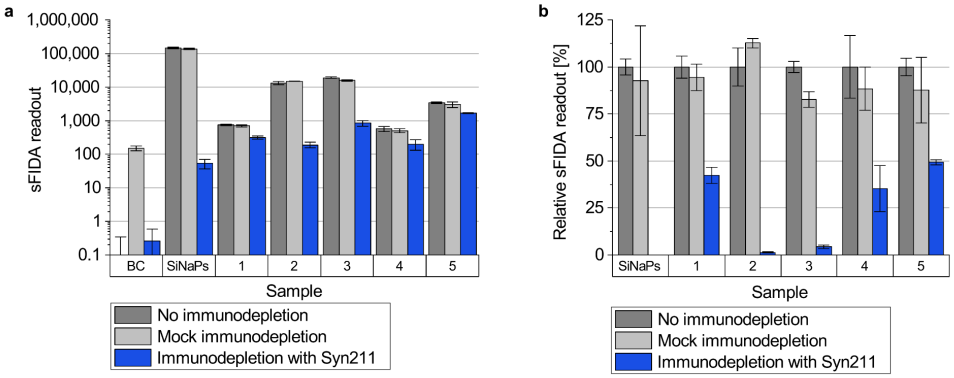


Fig. 5 Immunodepletion of α-synuclein SiNaPs and α-synuclein aggregates in stool samples. a The α-synuclein SiNaPs standard and five stool samples were immunodepleted with magnetic beads coupled to Syn211 antibodies and, as a mock immunodepletion, without coupled antibodies. Immunodepletion entirely eliminated the sFIDA readout for α-synuclein SiNaPs (100%) and reduced that for α-synuclein aggregates in stool samples on average by 73%, ranging from 51% to 99% for different samples. Mock immunodepletion did not significantly affect the sFIDA readout with a reduction of about 7% for stool samples and α-synuclein SiNaPs. **b** The relative sFIDA readout [%] value represents the percent ratio of the sFIDA readouts of (mock) depleted to non-depleted samples.

less in advanced stages, similar to decreases in CSF concentrations of $A\beta_{42}$ during the course of Alzheimer's disease[60]. One could also speculate that the α-synuclein aggregates in stool during very early disease stages may not exclusively be shed into the gastrointestinal tract by affected submucosal neurons but also by a systemic disposal mechanism for α-synuclein aggregates via liver and bile that becomes less efficient during later disease stages. This may explain why α-synuclein aggregate concentrations in stool and CSF correlate well during early disease stages but less in later stages. To better understand the dynamics of α-synuclein aggregate shedding or release into stool, concentrations in longitudinally collected stool samples of iRBD and PD patients need to be assessed.

Our data show that iRBD patients with a high risk of developing synucleinopathies have significantly higher levels of α-synuclein aggregates in stool compared to healthy controls, stressing the value of the sFIDA assay in early disease detection[13]. Stool, next to CSF, skin, and nasal mucosa, where α-synuclein aggregates accumulate in iRBD patients, is now an additional valuable and easily accessible resource with a potential for diagnostic purposes[52,61–63]. Whether iRBD patients with high concentrations of α-synuclein aggregates in stool are more likely to convert faster to PD, DLB, or MSA, or are more likely to develop a particular type of synucleinopathy remains to be determined. Interestingly, we also measured high α-synuclein aggregate concentrations in stool of some control subjects. This could be either due to prodromal iRBD/PD pathology or other factors in the gastrointestinal tract that may cause a disease-independent aggregation of α-synuclein. According to the presumption mentioned above, it could also mean that these subjects still do have a very efficient disposal system for α-synuclein aggregates into the stool. It will be essential to assess whether these individuals are showing other prodromal signs of PD and to monitor them longitudinally.

This study has several limitations. Due to the specificity of the Syn211 antibody, which recognizes epitopes 121–125 of α-synuclein, this sFIDA assay cannot detect aggregates that are solely composed of fragments missing the C-terminus with this epitope, or have this epitope masked due to posttranslational nitration or phosphorylation of tyrosine 125[44,64]. However, the abundance of α-synuclein aggregates where all α-synuclein molecules within one aggregate may be missing this particular epitope or have it masked is likely to be very small. Furthermore, more recent studies suggest that tyrosine 125 of α-synuclein may not be phosphorylated in PD and DLB[65]. Also, sFIDA does not distinguish between α-synuclein aggregates that are seeding-incompetent or harmless to neurons (off-pathway) and those that may be harmful to neurons (on-pathway)[66,67].

The sensitivity and specificity of this assay may be improved, for example, by combining measurements of aggregated α-synuclein with those of other potential biomarkers like phosphorylated α-synuclein, tau, glial fibrillary acidic protein, or neurofilament light chain that are expressed in the ENS and may be altered early in disease[68–71]. Another approach to improve this assay could be to extract and concentrate α-synuclein aggregates from stool samples, e.g., by immunoprecipitation, prior to their quantitation. Diet and the gut microbiome may likely affect the detection of α-synuclein aggregates in stool[72]. Stool has a complex matrix containing water, proteins, fatty acids, polysaccharides, bacterial biomass, undigested food residues, and bile that may inhibit antibody binding and mask α-synuclein aggregates from detection. Stool also contains proteases that may still be active during the preparation of the stool homogenates, which would mean that the measured values must be regarded as lower limits of the present α-synuclein aggregates. Also, using additional tissue and body fluid sources in combination with stool may further enhance the sensitivity and specificity of the sFIDA assay and improve diagnostic accuracy in discriminating between different patient cohorts and controls[52,61–63]. In summary, our results show that α-synuclein aggregates are excreted in stool and can be measured using the sFIDA assay, which may facilitate the diagnosis of prodromal synucleinopathies. This could be of value for developing therapies targeting early disease stages, which may result in better efficacy.

METHODS

Synthesis of protein-coated silica nanoparticles (SiNaPs)

SiNaPs were used for calibration and to test selectivity[40]. The body of the SiNaPs was synthesized via the Stöber process and the surface aminated with (3-aminopropyl)triethoxysilane. Functionalized α-synuclein peptide fragments (amino acids 115–130, Peptides and Elephants, Henningsdorf, Germany) or Aβ peptide fragments (amino acids 1–15, Peptides and Elephants, Henningsdorf, Germany) containing a cysteamine at the C-terminus were cross-linked to the surface of aminated SiNaPs functionalized with maleimidohexanoic acid, which was previously activated with 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and N-hydroxysuccinimide (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) to enable reaction of the cysteamine with the maleimide

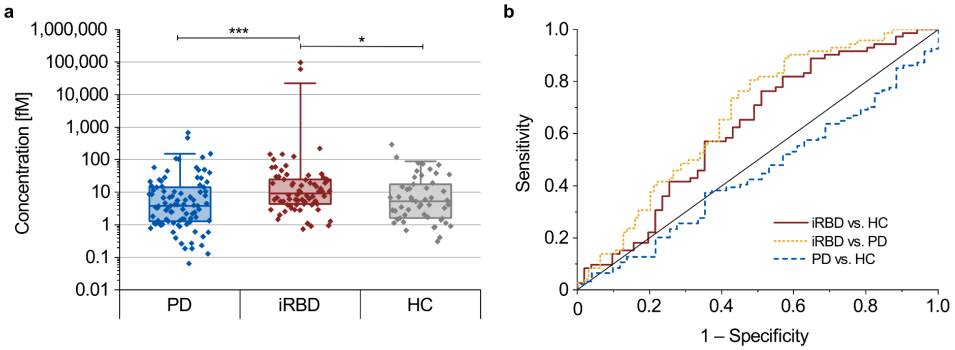


Fig. 6 Calibrated sFIDA results and receiver operating characteristic (ROC) analyses for detecting α-synuclein aggregates in stool samples. Median concentrations of α-synuclein aggregates in stool samples of iRBD patients (9.2 fM) were significantly elevated compared to those of healthy controls (HC, 5.2 fM, $p = 0.024$) or PD patients (3.8 fM, $p < 0.001$). PD patients did not significantly differ from healthy controls. Box plots indicate the lower (Q1) and upper (Q3) quartiles as boxes. Horizontal lines within boxes indicate medians. Whiskers indicate 1.5 times the interquartile range (Q3–Q1) above Q3 and below Q1. Data falling outside this range are plotted as outliers. Significant differences between groups were calculated using the Kruskal–Wallis H test. ***$p < 0.001$, **$0.001 \le p < 0.01$, *$0.01 \le p < 0.05$. Error bars indicate standard deviation. **b** In the ROC analyses, discrimination of PD patients versus healthy controls showed a specificity of 96.1% and a sensitivity of 6.4%, with an area under the curve (AUC) of 0.447. In comparison, discrimination of iRBD patients versus healthy controls showed a specificity of 49.0% and a sensitivity of 76.4% with an AUC of 0.622 (see Table 2 for other specificity and sensitivity values and significances).

Table 2. Results of the ROC analyses for specificity, sensitivity, and area under the curve with the respective p-value for α-synuclein aggregates in stool.

	Specificity [%]	Sensitivity [%]	AUC	p
iRBD vs. HC	49.0	76.4	0.622	0.021
iRBD vs. PD	52.1	80.6	0.670	1.81×10^{-4}
PD vs. HC	96.1	6.4	0.447	0.291

Parkinson's disease (PD), isolated rapid eye movement sleep behavior disorder (iRBD), healthy control (HC), area under the curve (AUC).

group. For synthesis of protein-conjugated SiNaPs, 10% of the possible binding sites were functionalized by adding protein to dispersed SiNaPs. Protein-coupled SiNaPs were subjected to ultrasonication for 10 min prior to each use. The same batches of α-synuclein or Aβ SiNaPs were used for all experiments. To serve as a calibration standard, the stock solution of α-synuclein SiNaPs was diluted in extraction buffer (EliA Calprotectin 2 Extraction Buffer (Phadia, Uppsala, Sweden) with 1× protease inhibitor cocktail (cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Basel, Switzerland)) in a half-logarithmic dilution series from 3200 to 0.1 fM.

Characterization of SiNaPs

The size and shape of the aminated SiNaPs were analyzed using transmission electron microscopy[73]. For the aminated silica core, a mean particle size of 18.5 nm was determined. Inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP-MS) was used to determine the silicon concentration. The molar concentration of the SiNaPs was calculated using the silicon concentration and the known size, density, and shape[40].

Labeling of antibodies

Fluorescent antibodies were used for microscopy-based detection of aggregates. The mouse monoclonal anti-α-synuclein Syn211 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA) was labeled with CF633 and CF488A (Biotium, Freemont, USA) and the anti-Aβ IC16 (Heinrich-Heine University, Düsseldorf, Germany) antibody was labeled with CF633 (Biotium, Freemont, USA)[40,44]. The labeling process was performed according to the manufacturer's protocol. The dyes with activated succinimidyl esters were mixed with the antibody in carbonate buffer to react covalently with the amines of the antibody. The labeled antibody was purified using a polyacrylamide bead suspension (Bio-Gel P 30 Gel, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA). The concentration and degree of labeling were determined according to the manufacturer's protocol.

Patients and healthy controls

This study was approved by the Ethics Commission of the Faculty of Medicine of the University of Cologne (19–1644). PD and iRBD patients and healthy controls were enrolled at the Department of Neurology of the University Hospital Cologne. Informed consent was obtained from all human participants. All enrolled subjects completed a basic characteristics questionnaire providing information on items, such as age, sex, handedness, years of education, and medical history. All subjects completed the validated German version of the screening questionnaire for parkinsonism originally developed by Tanner and colleagues[49], the REM sleep behavior disorder screening questionnaire (RBDSQ)[50], for which a score of six was determined as a cut-off value for detecting iRBD[74], the Cleveland Clinics Constipation Scoring System (CCCSS)[48], the Ocular Surface Disease Index (OSDI)[75], the revised Beck Depression Inventory (BDI-II)[76], the Memory Assessment Clinic Questionnaire (MAC-Q)[77], and the Functional Activities Questionnaire (FAQ)[78].

PD patients were recruited from patient charts of our outpatient clinic or the ward when patients were admitted to the hospital. Patients were diagnosed with PD ($n = 94$) according to the Movement Disorder Society Clinical Diagnostic Criteria for Parkinson's disease[79]. Clinical and demographic information, including disease duration, were acquired based on an investigator's medical reports and careful anamnesis. In addition to the basic characteristics questionnaire, PD and iRBD patients were asked to complete the Non-Motor Symptoms Scale (NMSS) questionnaire for PD[46], and the Movement Disorder Society's (MDS) Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part II (MDS-UPDRS II)[46]. Cognitive performance was assessed using DemTect[45]. Motor function was assessed with the MDS-UPDRS Part III[46]. The Hoehn and Yahr scale[51], and MDS-UPDRS Parts I and IV were rated by an investigator for each patient[46]. A smell test was performed for each subject according to a standardized procedure. Some but

not all PD patients received a DaTSCAN and a levodopa challenge test (LCT) outside of this study.

IRBD patients were part of an ongoing study ($n = 72$) recruiting a local prodromal PD cohort in Cologne through newspaper advertisements from the community. Following a structured telephone interview, subjects with a high likelihood of having iRBD were invited to undergo polysomnography (PSG). We used a mobile SOMNOscreenTM plus device for overnight PSG[80]. Visual PSG scoring was performed on 30 s epochs as well as diagnosis of iRBD according to the American Academy of Sleep Medicine's manual for the scoring of sleep and associated events, version 2.6[46].

Healthy controls ($n = 51$) were recruited by advertisement, and, in many cases, the caregivers of the PD patients agreed to participate in the study. Healthy controls were free of any neurological disease. In addition to the basic characteristics questionnaire (see above), healthy controls completed the NMSS questionnaire for PD, the RBDSQ, and a smell test. Healthy controls with an RBDSQ score greater than five were excluded from the analysis[74].

Stool samples from all subjects were collected between July 2020 and September 2021 using beakers with a screw cap and a removal spoon. Additionally, a paper towel stool catcher was used to avoid contamination. Stool samples were collected at various locations. If a stool sample was collected at home, in most cases, it was not older than two hours and stored in a plastic bag in a refrigerator until it was further processed. Pseudonymized samples were stored at −80 °C.

All patient-related data and samples were anonymized, and researchers were aware of the clinical data at the time of the sFIDA measurement. Data were subsequently tested for normal distribution (Shapiro Wilk, Lilliefors, Kolmogorov–Smirnov, Anderson Darling). A Kruskal–Wallis *H* test was used to identify differences between cohorts. If significant differences were determined, a pairwise comparison using a two-sided Mann–Whitney *U* test was conducted.

Sample preparation

Stool samples were collected at various time points using beakers with a screw cap and a removal spoon. Stool samples were thawed at room temperature (RT) for 15 min and homogenized according to the manufacturer's protocol of the EliA Stool Extraction Kit with minor changes (Phadia, Uppsala, Sweden). Using Simplix extraction tubes (Gaudlitz, Coburg, Germany), 17 mg stool were sampled and homogenized in 1300 µL cold extraction buffer through vortexing. The homogenate was centrifuged at 3000 × *g* for 5 min at 4 °C to pellet non-soluble components. The supernatant was aliquoted and stored at −80 °C until further use.

Assay protocol

In the present study, we used SensoPlate Plus 384-well glass bottom microtiter plates (Greiner Bio-One I, Frickenhausen, Germany). The glass surface was incubated with the Syn211 antibody as capture at 7.5 µg/mL in 1x PBS buffer overnight at 4 °C. After washing five times with 80 µL TBS-T (TBS and 0.05% Tween20) and afterwards five times with TBS, the wells were blocked with 0.5% nonfat, dried milk powder in TBS-ProClin (TBS containing 0.03% ProClin) for 3 h at RT. The plate was washed again with TBS-T and TBS and 20 µL protein-conjugated SiNaPs diluted in extraction buffer, and 20 µL of the samples, thawed at RT for 15 min, were incubated for 1 h at RT. After washing five times with TBS, the wells were incubated for 1 h with the fluorescent detection antibodies Syn211-CF633 and Syn211-CF488A (each 0.625 µg/mL) in TBS-T containing 0.1% BSA, after which the wells were washed again with TBS. For measurement, the buffer in the wells was changed to TBS-ProClin. Each standard and sample were pipetted as four replicates. For detection of Aβ aggregates and Aβ SiNaPs, the NAB288 antibody (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) was used at 2.5 µg/mL in PBS buffer for capture, and the fluorescent detection antibodies IC16-CF633 and 6E10-AF488 (Biolegend, San Diego, USA) each at 0.625 µg/mL for detection. All washing steps were carried out with an automated microplate washer (405 LS Microplate Washer, BioTek, VT, USA).

Inter-assay measurements

For inter-assay measurements of the calibration curve and samples, the same assay was repeated by the same person with the same antibodies and materials. Repeatedly assayed samples were subjected to an additional freeze–thaw cycle.

Immunodepletion

Immunodepletion was performed with magnetic Dynabeads Protein G (Invitrogen, Waltham, USA) to which the Syn211 antibody was bound via the Fc region according to the manufacturer's protocol. Shortly, dynabeads were washed twice with PBS-T (PBS and 0.05% Tween20) and applied to a magnet to remove the supernatant. After washing, the beads were incubated with 0.1 mg/mL Syn211 antibody (to reach a target load of 8 µg/mL beads), shaking at 650 rpm for 100 min at RT. After two more washing steps (see above), the coated beads were diluted in PBS-T to 20 µg/mL dynabeads, respectively. To ensure that a signal loss did not result from a non-specific binding of sample components to dynabeads, we also performed a synthesis without the antibody. For immunodepletion and mock immunodepletion, we applied 0.5 mg of antibody-coated and non-coated dynabeads to a magnet and removed the supernatant. Then, 100 µL sample was added and incubated for 1 h at RT while rotating. After incubation, the dynabeads were pelleted with a magnet and the supernatant was transferred to a fresh tube. All samples were analyzed using sFIDA as described above.

Image-data acquisition and analysis

Images were taken with an IRIS confocal fluorescence microscope (In Cell Analyzer 6500HS, GE Healthcare, Chicago, USA), using a 40× magnification objective with water immersion by two-channel imaging (channel one excitation: 642 nm, emission filter: 682.5/59 nm, exposure time: 3 s; channel two excitation: 488 nm, emission filter: 524.5/48 nm; exposure time: 4 s). A total of 16 images with 2040 × 2040 pixels each were acquired per well, covering 16% of the total well area. The acquired images were analyzed with the in-house developed sFIDAta software tool to ensure unbiased and automated image data analysis[40]. This included automatic detection and elimination of images containing artifacts and counting aggregate labeling pixels. In addition, a min-max filtering was applied, resulting in a removal of 10% of the images with the highest and lowest sFIDA readout per well. The sFIDA readout refers to the number of colocalized pixels of both channels. To reduce the background signal and compensate for fluctuations of the absolute fluorescence intensities, intensity cutoffs were determined for each experiment based on the buffer control. The cutoff is referred to as the gray-scale value of an image at which the rate of positive versus the total number of pixels in the buffer control equals a preset value[40,81]. By choosing a cutoff value, only pixels exceeding the cutoff value were considered for analysis. Additionally, we included a calibration in each measurement and converted the sFIDA readout to a SiNaP calibration-based concentration [fM] to ensure that differences in fluorescence intensity did not influence assay results. For inter-assay measurements, a cutoff value of 0.001% and, for the analysis of the stool samples, a cutoff value of 0.0003% were chosen.

Statistics

General statistics. Statistical analyses were performed using SigmaPlot 11.0, IBM SPSS Statistics 28.0.1.1 (15), OriginPro 2020 SR1, or JASP 0.14.1. Mean and standard deviation were calculated based on the

sFIDA readout of four replicates. The intra-assay variation is described by the coefficient of variation (CV%). To determine inter-assay variation, the Spearman coefficient of correlation was calculated for the replicate measurements of the samples.

Calibration. For calculating the calibration line, only concentrations of the SiNaPs standard were included that significantly differed from the blank control and were above the LOD. To this end, a one-sided Mann-Whitney U test was carried out. After calculating the calibration range for each experiment, a universal calibration range for all experiments was established. The LOD is defined based on Eq. (1):

$$LOD\ [pixel] = sFIDA\ readout\ (blank\ control) + 3\sigma \quad (1)$$

For linear regression, the sFIDA readouts were weighted with 1/readout. The buffer control was used as a negative control for the calibration and for calculating the LOD.

ROC analysis. A receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed on the acquired dataset. The optimal combination of sensitivity and specificity for a ROC curve was calculated with a maximized Youden's index.

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

DATA AVAILABILITY

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary materials.

CODE AVAILABILITY

For image data analysis, we used the sFIDAta software application, which can be made available upon request.

Received: 2 November 2022; Accepted: 16 January 2023;
Published online: 02 February 2023

REFERENCES

1. Schweighauser, M. et al. Structures of alpha-synuclein filaments from multiple system atrophy. *Nature* **585**, 464–469 (2020).
2. Yang, Y. et al. Structures of alpha-synuclein filaments from human brains with Lewy pathology. *Nature* **610**, 791–795 (2022).
3. Spillantini, M. G. et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839–840 (1997).
4. Spillantini, M. G. et al. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci. Lett.* **251**, 205–208 (1998).
5. Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 6469–6473 (1998).
6. Wakabayashi, K., Yoshimoto, M., Tsuji, S. & Takahashi, H. Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci. Lett.* **249**, 180–182 (1998).
7. Fusco, G. et al. Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by alpha-synuclein oligomers. *Science* **358**, 1440–1443 (2017).
8. Cremades, N. et al. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of alpha-synuclein. *Cell* **149**, 1048–1059 (2012).
9. Wong, Y. C. & Krainc, D. alpha-synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. *Nat. Med* **23**, 1–13 (2017).
10. Heinzel, S. et al. Update of the MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **34**, 1464–1470 (2019).
11. Magalhaes, P. & Lashuel, H. A. Opportunities and challenges of alpha-synuclein as a potential biomarker for Parkinson's disease and other synucleinopathies. *NPJ Parkinsons Dis.* **8**, 93 (2022).
12. Schapira, A. H. V., Chaudhuri, K. R. & Jenner, P. Non-motor features of Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **18**, 509 (2017).
13. Postuma, R. B. et al. Risk and predictors of dementia and parkinsonism in idiopathic REM sleep behaviour disorder: a multicentre study. *Brain* **142**, 744–759 (2019).
14. Schenck, C. H., Bundlie, S. R. & Mahowald, M. W. Delayed emergence of a parkinsonian disorder in 38% of 29 older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder. *Neurology* **46**, 388–393 (1996).
15. Fedorova, T. D. et al. Imaging progressive peripheral and central dysfunction in isolated REM sleep behaviour disorder after 3 years of follow-up. *Parkinsonism Relat. Disord.* **101**, 99–104 (2022).
16. Iranzo, A. et al. Neurodegenerative disease status and post-mortem pathology in idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: an observational cohort study. *Lancet Neurol.* **12**, 443–453 (2013).
17. Miglis, M. G. et al. Biomarkers of conversion to alpha-synucleinopathy in isolated rapid-eye-movement sleep behaviour disorder. *Lancet Neurol.* **20**, 671–684 (2021).
18. Nam, D. et al. Detection and assessment of alpha-synuclein oligomers in the urine of Parkinson's disease patients. *J. Parkinsons Dis.* **10**, 981–991 (2020).
19. Vivacqua, G. et al. Salivary alpha-synuclein in the diagnosis of Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *Parkinsonism Relat. Disord.* **63**, 143–148 (2019).
20. Luan, M. et al. Diagnostic value of salivary real-time quaking-induced conversion in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Mov. Disord.* **37**, 1059–1063 (2022).
21. Hamm-Alvarez, S. F. et al. Levels of oligomeric alpha-Synuclein in reflex tears distinguish Parkinson's disease patients from healthy controls. *Biomark. Med* **13**, 1447–1457 (2019).
22. Wang, Z. et al. Skin alpha-synuclein aggregation seeding activity as a novel biomarker for Parkinson disease. *JAMA Neurol.* **78**, 1–11 (2020).
23. De Luca, C. M. G. et al. Efficient RT-QuIC seeding activity for alpha-synuclein in olfactory mucosa samples of patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Transl. Neurodegener.* **8**, 24 (2019).
24. Tokuda, T. et al. Detection of elevated levels of alpha-synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology* **75**, 1766–1772 (2010).
25. Kluge, A. et al. Detection of neuron-derived pathological alpha-synuclein in blood. *Brain* **145**, 3058–3071 (2022).
26. Bongianni, M. et al. Olfactory swab sampling optimization for alpha-synuclein aggregate detection in patients with Parkinson's disease. *Transl. Neurodegener.* **11**, 37 (2022).
27. Shannon, K. M. et al. Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **27**, 709–715 (2012).
28. Braak, H., de Vos, R. A., Bohl, J. & Del Tredici, K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett.* **396**, 67–72 (2006).
29. Stokholm, M. G., Danielsen, E. H., Hamilton-Dutoit, S. J. & Borghammer, P. Pathological alpha-synuclein in gastrointestinal tissues from prodromal Parkinson disease patients. *Ann. Neurol.* **79**, 940–949 (2016).
30. Hawkes, C. H., Del Tredici, K. & Braak, H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **33**, 599–614 (2007).
31. Hawkes, C. H., Del Tredici, K. & Braak, H. Parkinson's Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1170**, 615–622 (2009).
32. Woerman, A. L. & Tamgüney, G. Body-first Parkinson's disease and variant Creutzfeldt-Jakob disease—similar or different? *Neurobiol. Dis.* **164**, 105625 (2022).
33. Tamgüney, G. & Korczyn, A. D. A critical review of the prion hypothesis of human synucleinopathies. *Cell Tissue Res* **373**, 213–220 (2017).
34. Van Den Berge, N. et al. Evidence for bidirectional and trans-synaptic parasympathetic and sympathetic propagation of alpha-synuclein in rats. *Acta Neuropathol.* **138**, 535–550 (2019).
35. Arotcarena, M. L. et al. Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of synucleinopathy in non-human primates. *Brain* **143**, 1462–1475 (2020).
36. Lohmann, S. et al. Oral and intravenous transmission of alpha-synuclein fibrils to mice. *Acta Neuropathol.* **138**, 515–533 (2019).
37. Tamgüney, G. et al. Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces. *Nature* **461**, 529–532 (2009).
38. Terry, L. A. et al. Detection of prions in the faeces of sheep naturally infected with classical scrapie. *Vet. Res* **42**, 65 (2011).
39. Kulenkampff, K., Wolf Perez, A.-M., Sormanni, P., Habchi, J. & Vendruscolo, M. Quantifying misfolded protein oligomers as drug targets and biomarkers in Alzheimer and Parkinson diseases. *Nat. Rev. Chem.* **5**, 277–294 (2021).
40. Blömeke, L. et al. Quantitative detection of alpha-Synuclein and Tau oligomers and other aggregates by digital single particle counting. *NPJ Parkinsons Dis.* **8**, 68 (2022).

41. Kulawik, A., Heise, H., Zafiu, C., Willbold, D. & Bannach, O. Advancements of the sFIDA method for oligomer-based diagnostics of neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* **592**, 516–534 (2018).
42. Herrmann, Y. et al. Nanoparticle standards for immuno-based quantitation of alpha-synuclein oligomers in diagnostics of Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Clin. Chim. Acta* **466**, 152–159 (2017).
43. Herrmann, Y. et al. sFIDA automation yields sub-femtomolar limit of detection for Abeta aggregates in body fluids. *Clin. Biochem.* **50**, 244–247 (2017).
44. Giasson, B. I. et al. A panel of epitope-specific antibodies detects protein domains distributed throughout human alpha-synuclein in Lewy bodies of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Res.* **59**, 528–533 (2000).
45. Kalbe, E. et al. DemTect: a new, sensitive cognitive screening test to support the diagnosis of mild cognitive impairment and early dementia. *Int J. Geriatr. Psychiatry* **19**, 136–143 (2004).
46. Goetz, C. G. et al. Movement disorder society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Process, format, and clinimetric testing plan. *Mov. Disord.* **22**, 41–47 (2007).
47. Chaudhuri, K. R. et al. The metric properties of a novel non-motor symptoms scale for Parkinson's disease: results from an international pilot study. *Mov. Disord.* **22**, 1901–1911 (2007).
48. Agachan, F., Chen, T., Pfeifer, J., Reissman, P. & Wexner, S. D. A constipation scoring system to simplify evaluation and management of constipated patients. *Dis. Colon Rectum* **39**, 681–685 (1996).
49. Pramstaller, P. P., Falk, M., Schoenhuber, R. & Poewe, W. Validation of a mail questionnaire for parkinsonism in two languages (German and Italian). *J. Neurol.* **246**, 79–86 (1999).
50. Stiasny-Kolster, K. et al. The REM sleep behavior disorder screening questionnaire–a new diagnostic instrument. *Mov. Disord.* **22**, 2386–2393 (2007).
51. Hoehn, M. M. & Yahr, M. D. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* **17**, 427–442 (1967).
52. Rossi, M. et al. Ultrasensitive RT-QuIC assay with high sensitivity and specificity for Lewy body-associated synucleinopathies. *Acta Neuropathol.* **140**, 49–62 (2020).
53. Compta, Y. et al. Correlates of cerebrospinal fluid levels of oligomeric- and total-alpha-synuclein in premotor, motor and dementia stages of Parkinson's disease. *J. Neurol.* **262**, 294–306 (2015).
54. Iranzo, A. et al. Detection of alpha-synuclein in CSF by RT-QuIC in patients with isolated rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a longitudinal observational study. *Lancet Neurol.* **20**, 203–212 (2021).
55. Hall, S. et al. Longitudinal Measurements of Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Parkinson's Disease. *Mov. Disord.* **31**, 898–905 (2016).
56. Majbour, N. K. et al. Longitudinal changes in CSF alpha-synuclein species reflect Parkinson's disease progression. *Mov. Disord.* **31**, 1535–1542 (2016).
57. Borghammer, P. & Van Den Berge, N. Brain-first versus gut-first Parkinson's disease: a hypothesis. *J. Parkinsons Dis.* **9**, S281–S295 (2019).
58. Horsager, J. et al. Brain-first versus body-first Parkinson's disease: a multimodal imaging case-control study. *Brain* **143**, 3077–3088 (2020).
59. Berg, D. et al. Prodromal Parkinson disease subtypes—key to understanding heterogeneity. *Nat. Rev. Neurol.* **17**, 349–361 (2021).
60. Mattsson, N. et al. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *J. Am. Med. Assoc.* **302**, 385–393 (2009).
61. Doppler, K. et al. Dermal phospho-alpha-synuclein deposits confirm REM sleep behaviour disorder as prodromal Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* **133**, 535–545 (2017).
62. Doppler, K. et al. Consistent skin alpha-synuclein positivity in REM sleep behavior disorder—a two center two-to-four-year follow-up study. *Parkinsonism Relat. Disord.* **86**, 108–113 (2021).
63. Stefani, A. et al. Alpha-synuclein seeds in olfactory mucosa of patients with isolated REM sleep behaviour disorder. *Brain* **144**, 1118–1126 (2021).
64. Schmid, A. W., Fauvet, B., Moniatte, M. & Lashuel, H. A. Alpha-synuclein post-translational modifications as potential biomarkers for Parkinson disease and other synucleinopathies. *Mol. Cell. Proteom.* **12**, 3543–3558 (2013).
65. Fayyad, M. et al. Investigating the presence of doubly phosphorylated alpha-synuclein at tyrosine 125 and serine 129 in idiopathic Lewy body diseases. *Brain Pathol.* **30**, 831–843 (2020).
66. Winner, B. et al. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 4194–4199 (2011).
67. Conway, K. A. et al. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 571–576 (2000).
68. Clairembault, T. et al. Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *J. Neurochem* **130**, 805–815 (2014).
69. Harapan, B. N. et al. No enhanced (p-) alpha-synuclein deposition in gastrointestinal tissue of Parkinson's disease patients. *Parkinsonism Relat. Disord.* **80**, 82–88 (2020).
70. Lionnet, A. et al. Characterisation of tau in the human and rodent enteric nervous system under physiological conditions and in tauopathy. *Acta Neuropathol. Commun.* **6**, 65 (2018).
71. Gries, M. et al. Parkinson mice show functional and molecular changes in the gut long before motoric disease onset. *Mol. Neurodegener.* **16**, 34 (2021).
72. Nerius, M., Doblhammer, G. & Tamgüney, G. GI infections are associated with an increased risk of Parkinson's disease. *Gut* **69**, 1154–1156 (2019).
73. Hulsemann, M. et al. Biofunctionalized silica nanoparticles: standards in amyloid-beta oligomer-based diagnosis of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **54**, 79–88 (2016).
74. Nomura, T., Inoue, Y., Kagimura, T., Uemura, Y. & Nakashima, K. Utility of the REM sleep behavior disorder screening questionnaire (RBDSQ) in Parkinson's disease patients. *Sleep. Med* **12**, 711–713 (2011).
75. Walt, J., Rowe, M. & Stern, K. Evaluating the functional impact of dry eye: the ocular surface disease index. *Drug Inf. J.* **31**, b5 (1997).
76. Beck, A. T., Steer, R. A., Ball, R. & Ranieri, W. Comparison of Beck Depression Inventories -IA and -II in psychiatric outpatients. *J. Pers. Assess.* **67**, 588–597 (1996).
77. Crook, T. H. 3rd, Feher, E. P. & Larrabee, G. J. Assessment of memory complaint in age-associated memory impairment: the MAC-Q. *Int. Psychogeriatr.* **4**, 165–176 (1992).
78. Pfeffer, R. I., Kurosaki, T. T., Harrah, C. H. Jr., Chance, J. M. & Filos, S. Measurement of functional activities in older adults in the community. *J. Gerontol.* **37**, 323–329 (1982).
79. Postuma, R. B. et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **30**, 1591–1601 (2015).
80. Doppler, C. E. J. et al. Microsleep disturbances are associated with noradrenergic dysfunction in Parkinson's disease. *Sleep* **44**, zsab040 (2021).
81. Kühbach, K. et al. Application of an amyloid beta oligomer standard in the sFIDA assay. *Front. Neurosci.* **10**, 8 (2016).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Carsten Korth for providing the IC16 antibody and Volker Nischwitz for characterizing SiNaPs. Parts of this study were supported by the Parkinson's Foundation (PF-IMP-2022), the Else Kröner-Fresenius-Stiftung (2019_EKES.02), and the Köln Fortune Program, Faculty of Medicine, University of Cologne (453/2018). GRF is funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation—Project-ID 431549029—SFB 1451).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.S., M.T.B., G.R.F., D.W., and G.T. supervised the project. S.S., H.J., M.T.B., and M.S. recruited and clinically assessed patients and control subjects, and collected patient samples. J.W. developed the sFIDAta software tool. A.C. expressed and purified protein. A.S. and M.P. developed the sFIDA assay for stool samples. A.S., M.P., and P.Ö. performed sFIDA experiments. A.S., M.P., L.B., T.B., O.B., D.W., and G.T. analyzed the data. A.S., M.S., M.T.B., and G.T. wrote the paper. All authors critically revised the paper.

FUNDING

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

COMPETING INTERESTS

D.W. and O.B. declare no competing non-financial interests but the following competing financial interests: D.W. and O.B. are shareholders of attyloid GmbH. A.S., S.S., A.S., H.J., P.Ö., M.P., L.B., A.C., J.W., T.B., G.R.R., M.S., M.T.B., and G.T. declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41531-023-00458-4.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Gültekin Tamgüney.

Reprints and permission information is available at http://www.nature.com/reprints

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2023

4.6 Quantifizierung von α-Synuclein- und Tau-Aggregaten in humanen Liquorproben

Quantitative detection of α-Synuclein and Tau oligomers and other aggregates by digital single particle counting

Autoren	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 & Dieter Willbold
Publiziert in	**npj Parkinsons Dis. 8, 68 (Juni, 2022)** Impact-Faktor: 9,705 (2021) DOI: 10.1038/s41531-022-00330-x
Beitrag	**Eigener Anteil: 15%** ▪ Weiterentwicklung der sFIDA-Technologie für den Nachweis von Tau- bzw. α-Synuclein-Oligomeren ▪ Diskussion der Ergebnisse ▪ Unterstützung beim Schreiben und Prüfen des Manuskripts
Druckgenehmigung	siehe Anhang 25

npj | parkinson's disease

www.nature.com/npjparkd

ARTICLE OPEN

Check for updates

Quantitative detection of α-Synuclein and Tau oligomers and other aggregates by digital single particle counting

Lara Blömeke[1,2], Marlene Pils[2,3], Victoria Kraemer-Schulien[1], Alexandra Dybala[2,3], Anja Schaffrath[1], Andreas Kulawik[1,2,3], Fabian Rehn[1], Anneliese Cousin[1], Volker Nischwitz[4], Johannes Willbold[1], Rebecca Zack[5], Thomas F. Tropea[5,6], Tuyen Bujnicki[1], Gültekin Tamgüney[1,3], Daniel Weintraub[6,7,8], David Irwin[5,6], Murray Grossman[5,6], David A. Wolk[5], John Q. Trojanowski[6,9], Oliver Bannach[1,2,3], Alice Chen-Plotkin[5,6] and Dieter Willbold[1,3]✉

The pathological hallmark of neurodegenerative diseases is the formation of toxic oligomers by proteins such as alpha-synuclein (aSyn) or microtubule-associated protein tau (Tau). Consequently, such oligomers are promising biomarker candidates for diagnostics as well as drug development. However, measuring oligomers and other aggregates in human biofluids is still challenging as extreme sensitivity and specificity are required. We previously developed surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) featuring single-particle sensitivity and absolute specificity for aggregates. In this work, we measured aSyn and Tau aggregate concentrations of 237 cerebrospinal fluid (CSF) samples from five cohorts: Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies (DLB), Alzheimer's disease (AD), progressive supranuclear palsy (PSP), and a neurologically-normal control group. aSyn aggregate concentration discriminates PD and DLB patients from normal controls (sensitivity 73%, specificity 65%, area under the receiver operating curve (AUC) 0.68). Tau aggregates were significantly elevated in PSP patients compared to all other groups (sensitivity 87%, specificity 70%, AUC 0.76). Further, we found a tight correlation between aSyn and Tau aggregate titers among all patient cohorts (Pearson coefficient of correlation $r = 0.81$). Our results demonstrate that aSyn and Tau aggregate concentrations measured by sFIDA differentiate neurodegenerative disease diagnostic groups. Moreover, sFIDA-based Tau aggregate measurements might be particularly useful in distinguishing PSP from other parkinsonisms. Finally, our findings suggest that sFIDA can improve pre-clinical and clinical studies by identifying those individuals that will most likely respond to compounds designed to eliminate specific oligomers or to prevent their formation.

npj Parkinson's Disease (2022)8:68 ; https://doi.org/10.1038/s41531-022-00330-x

INTRODUCTION

Tauopathies and synucleinopathies are characterized by abnormal aggregation of microtubule-associated protein tau (Tau) and alpha-synuclein (aSyn), respectively. From the clinical perspective there is some overlap in the phenotypic presentation of the resulting diseases, with parkinsonism characterizing multiple diseases, including Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies (DLB), and progressive supranuclear palsy (PSP)[1,2]. While protein aggregation is the pathological key event in these disorders, ultimately resulting in the formation of aSyn and Tau deposits, the neurotoxic effect is thought to be exerted by small oligomeric intermediates within the aggregation pathway[3–5]. Consequently, a number of drug candidates have been designed to interfere with the aggregation pathway aiming to eliminate existing oligomers or to prevent their formation[6]. Since aggregate formation reflects pathophysiological changes inside the brain, oligomers have also been proposed as promising biomarker candidates[7–9]. However, quantitative measurement of oligomers is technically challenging and mainly hampered by three technical issues. First, the minute amount of oligomers in human biofluids such as cerebrospinal fluid (CSF) requires extreme sensitivity. Secondly, the presence of a vast excess of monomers demands high selectivity for oligomers over monomeric species. Quantitation of oligomeric aSyn by ELISA-like techniques, which employ overlapping epitopes or antibody probes directed against structural motifs, render these assays insensitive towards monomers[10]. Our previously developed sFIDA technology (surface-based fluorescence intensity distribution analysis) employs a similar biochemical setup using the same capture and detection antibody (Fig. 1) but features single-particle sensitivity through a microscopy-based readout[11]. Thirdly, the structural diversity of aggregates renders their detection technically challenging[12]. sFIDA uses linear epitopes and therefore detects and counts all subtypes of aggregated protein irrespectively of higher-ordered structures, while assays using structural epitopes only determine a subfraction of oligomers, fibrils, or other aggregates from a heterogeneous pool of structures. Because the assay itself is not yet discriminating between small oligomers and larger, but still soluble assemblies, like protofibrils, seeding competent fibrillar oligomers or fibrils, we refer to the analytes measured by sFIDA as aggregates, irrespectively, whether they are on or off pathway to fibrils[13].

While our prior work establishes the technical concept of sFIDA[11,14,15], its utility in clinical samples from neurodegenerative

[1]Institute of Biological Information Processing (Structural Biochemistry: IBI-7), Forschungszentrum Jülich, 52428 Jülich, Germany. [2]attyloid GmbH, 40225 Düsseldorf, Germany. [3]Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany. [4]Central Institute for Engineering, Electronics and Analytics, Analytics (ZEA-3), Forschungszentrum Jülich, 52428 Jülich, Germany. [5]Department of Neurology, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA. [6]Center for Neurodegenerative Disease Research, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA. [7]Department of Psychiatry, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA. [8]Parkinson's Disease and Mental Illness Research, Education, and Clinical Centers, Philadelphia Veterans Affairs Medical Center, Philadelphia, PA, USA. [9]Department of Pathology and Laboratory Medicine, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA.
✉email: d.willbold@fz-juelich.de

Published in partnership with the Parkinson's Foundation

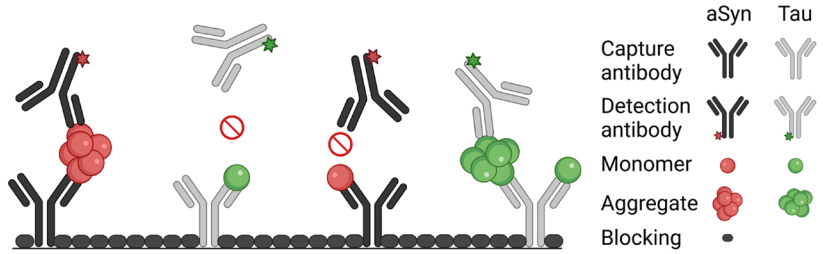


Fig. 1 Scheme of the sFIDA assay. Antibodies directed against linear epitopes of aSyn (211) or Tau (Tau5) are immobilized on the glass surface of a microtiter plate. Monomers and aggregates of the sample can bind to the capture antibodies, but only aggregates are detected with fluorescently labeled probes (211 CF633 and Tau5 CF488A) because capture and detection antibodies bind the same epitope. For monomeric protein, this epitope is masked by the capture antibody and can therefore not be bound by a probe antibody. Finally, the assay surface is imaged by dual-color fluorescence microscopy and single particles on the well surface are counted by image-data analysis. *Created with BioRender.com*.

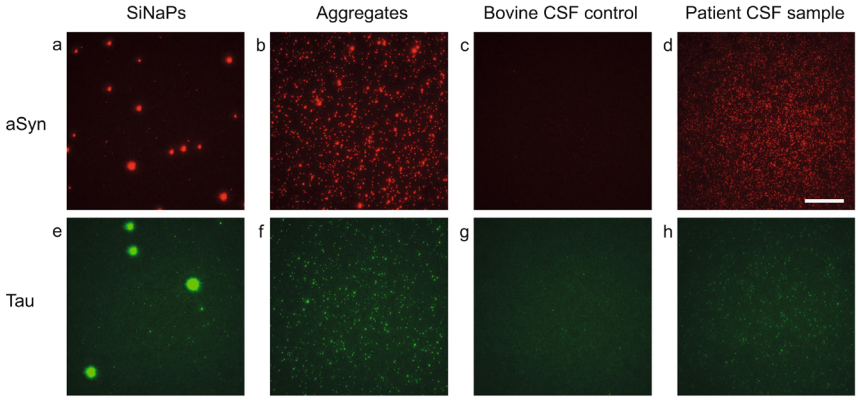


Fig. 2 TIRFM images of aSyn and Tau SiNaPs, synthetic aggregates, and samples. Shown are characteristic TIRFM images for the red fluorescence channel (211 CF633) of **a** 629 fM aSyn SiNaPs in buffer, **b** 8 nM aSyn aggregates in buffer (the concentration is based on the monomer concentration), **c** a bovine CSF control, **d** a CSF sample of a PD patient as well as for the green fluorescence channel (Tau5 CF488) of **e** 645 fM Tau SiNaPs in buffer, **f** 200 nM Tau aggregates in buffer (the concentration is based on the monomer concentration), **g** a bovine CSF control, **h** a CSF sample of a PSP patient. The scale bar is 25 µm. For illustration of the 14-bit images, the contrast was adjusted to a maximum grayscale value of 5000.

disease patients is yet to be established. In the present work, we apply sFIDA to quantitate aSyn and Tau aggregates in CSF from 237 individuals, demonstrating its applicability in clinical settings and drug development.

RESULTS

In this work, we have developed an sFIDA assay for simultaneous quantification of aSyn and Tau aggregates. Development and validation of immunoassays require determination of crucial parameters including limit of detection (LOD), coefficient of variation, inter-assay and inter-laboratory correlation and cross reactivity, which are described in the first part of the results chapter.

sFIDA displays low intra-assay variance for measurements of SiNaPs and samples

The sFIDA technology was used to determine the concentrations of aggregated aSyn and aggregated Tau in a total of 237 CSF samples. Due to the high number of assay points, the measurements were performed on a total of eight 384 well microtiter plates. For calibration of the samples and determination of the LOD, we used our previously developed silica nanoparticle (SiNaP) standard[14] (TEM image and size distribution in Supplementary Fig. 1). Exemplary images of SiNaPs, aggregates, bovine CSF and patient samples are shown in Fig. 2. The intra-assay variance among all experiments was calculated from the pixel counts of the four replicates. The intra-assay variance for the calibration standard was 15.8% for aSyn SiNaPs and 19.1% for Tau SiNaPs for the concentrations included in the calibration range. The intra-assay variance of the samples was 16.8% for aSyn aggregates and 13.0% for Tau aggregates, respectively (individual results for each experiment in Supplementary Table 1).

Independent measurements of aSyn and Tau aggregates in CSF samples yield comparable results

The inter-assay variance was studied in 20 samples on two different runs that were executed at a four-month interval. We analyzed each sample in four replicates and determined an intra-assay variation for the 20 CSF samples of 22.6% for aSyn aggregates and 20.4% for Tau aggregates. A linear correlation between the two measurements was observed for the detection of aSyn aggregates with a Pearson coefficient of correlation of $r = 0.964$. Although the concentration of Tau aggregates was less than that of aSyn aggregates and very close to the LOD, the two

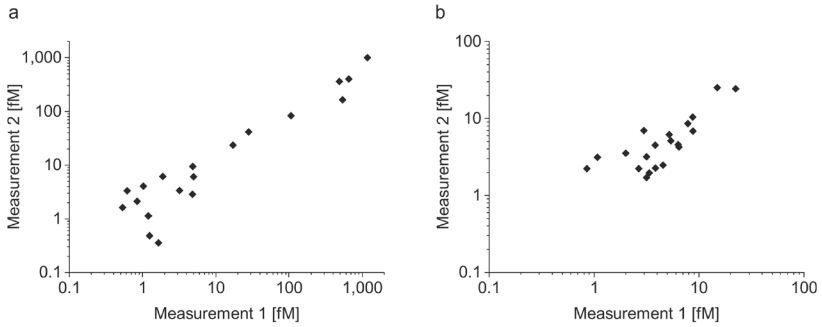


Fig. 3 Repeated measurements of aSyn and Tau aggregates in CSF yield highly reproducible results. We tested the inter-assay variance of the sFIDA assay for **a** aSyn and **b** Tau aggregates. Two independent measurements of 20 CSF samples by the same technician in the same laboratory on different days were highly reproducible with a Pearson coefficient of correlation of $r = 0.96$ for aSyn aggregates and $r = 0.92$ for Tau aggregates.

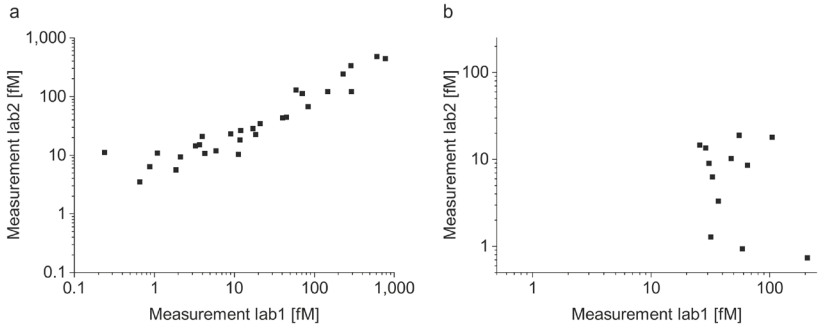


Fig. 4 Measurements of aSyn but not Tau aggregates in CSF correlated well when measured in a different laboratory. The CSF samples were measured by sFIDA by two different technicians in two different laboratories. The first sFIDA experiment was prepared and run by a technician at the Forschungszentrum Jülich, while the second sFIDA was performed by another technician at the Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. **a** Concentrations of aSyn aggregates correlated well between both experiments with a Pearson coefficient of correlation of $r = 0.95$, **b** while for Tau aggregates no correlation was observed ($r = 0.03$).

measurements showed a significant correlation with a Pearson coefficient of correlation of $r = 0.920$ (Fig. 3).

The inter-laboratory variance was studied in a laboratory at the Forschungszentrum Jülich and another laboratory at the Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf. The calibrated results for the detection of aSyn aggregates showed a high correlation with a Pearson coefficient of correlation of $r = 0.950$. In this study, no correlation for Tau aggregates was observed (Pearson coefficient of correlation of $r = 0.033$, Fig. 4).

sFIDA features femtomolar sensitivity for the detection of aSyn and Tau SiNaPs

We determined the sensitivity of the assay based on aSyn and Tau SiNaPs. After application of t-test, Mann-Whitney U test, LOD and standardization of the calibration range for all experiments, the upper limit of the calibration curve was 1.99 pM for aSyn and 2.04 pM for Tau SiNaPs, and the lower limit was set to 63 fM and 204 fM for aSyn and Tau SiNaPs, respectively. In all experiments a linear correlation between pixel count and concentration with a mean coefficient of determination of 0.98 for aSyn and 0.96 for Tau SiNaPs was observed. The calibration resulted in a mean LOD of 6.72 fM for the detection of aSyn SiNaPs and a mean LOD of 33.7 fM for the detection of Tau SiNaPs (individual LOD values for each experiment are shown in Supplementary Table 2). For aSyn aggregates, 66% of samples were above the LOD of the individual experiment and for Tau aggregates 44% (Supplementary Table 3).

sFIDA shows negligible cross reactivity for measurements of aSyn, amyloid beta, and Tau

To determine the selectivity of the sFIDA assay, amyloid beta SiNaPs with a concentration of 6 pM were used as a control. The amyloid beta SiNaPs were coated with amino acid residues 1–15 of the amyloid beta protein. We observed a very low cross reactivity with 0.1% of the signal for amyloid beta SiNaPs when compared to the signal obtained with aSyn SiNaPs and 0.2% of the signal obtained with Tau SiNaPs when used at a comparable concentration (data not shown). Detection of synthetic Tau aggregates with the 211 antibody and detection of synthetic aSyn aggregates with the Tau5 antibody resulted in a pixel count as negligible as for the buffer control (Fig. 5). The pixel count of the buffer control (BC) showed an increased background signal compared to the CSF control for aSyn (capture and detection antibody: 211) and Tau (capture and detection antibody: Tau5) (Fig. 5). Therefore, the CSF control was used as negative control for the calibration of the samples. The buffer control showed no autofluorescence signal (data not shown). The recovery of aSyn SiNaPs spiked in bovine CSF was 79%. For Tau SiNaPs the recovery in CSF was 36%. Another control was to run the assay without a capture antibody, which is an indication for unspecific binding of silica nanoparticles or proteins to the surface, and is described as the signal compared to the same concentration of silica nanoparticles/protein on an antibody surface. For aSyn, the signal originating from 6 pM silica nanoparticles without the use of a

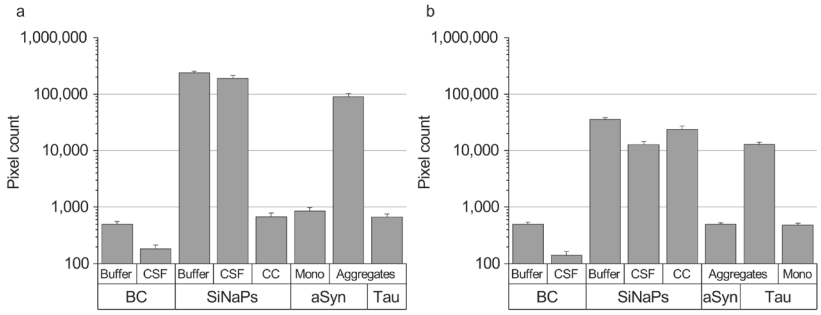


Fig. 5 Pixel counts of assay controls for the detection of aSyn and Tau aggregates. a aSyn SiNaPs showed a recovery of 79% in CSF, whereas **b** Tau SiNaPs showed a recovery of 36% in CSF. Synthetic aSyn and Tau aggregates served as positive controls. The pixel counts of the aSyn aggregates when detected with the Tau5 antibody as well as the pixel counts of the Tau aggregates when detected with the 211 antibody were as low as the blank control (BC). The pixel count of 8 nM monomeric (Mono) aSyn as well as 200 nM monomeric Tau was reduced by 99.5% compared to the same concentration of monomer units in aggregated aSyn or Tau. When the capture antibody was omitted (capture control, CC), no signal was detected for aSyn SiNaPs, whereas the signal for Tau SiNaPs was still at 67%. Standard deviation was calculated from the four replicates.

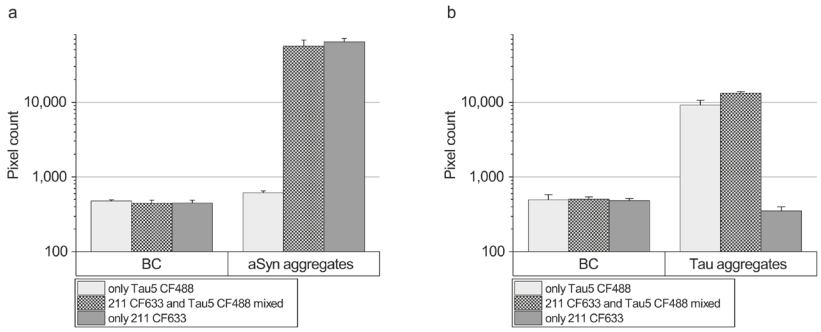


Fig. 6 Analysis of probe interference. To analyze the effect of detection probe interference on the signal, we performed an additional experiment in which we added either only one detection antibody or both detection antibodies. Using only the relevant antibody probe did not show an increased pixel count for the detection of aggregated aSyn (**a**, 211 CF633) or Tau (**b**, Tau5 CF488), respectively. Standard deviation was calculated from the four replicates.

capture antibody was below 0.1% of that when a capture antibody was used. For Tau, the signal was still at 67% without a capture antibody and, presumably, originating from large particles which non-specifically stick to the glass surface. Furthermore, we investigated the effect of monomeric aSyn and Tau on the sFIDA readout.

We found that the pixel counts of both aSyn and Tau monomers, respectively, were decreased by about 99.5% compared to the signal of aSyn or Tau aggregates indicating that endogenous monomers in the CSF samples have a neglectable effect on the sFIDA readout (Fig. 5).

To address the question whether addition of the mixture of two antibodies might impair assay sensitivity, we added just the relevant detection antibody or a mixture of both detection antibodies, and compared the correspondent sFIDA readouts. As shown in Fig. 6, applying just a single detection antibody did not increase the readout. Moreover, absence of confounding autofluorescence signals was demonstrated, because aggregated aSyn and Tau did not show any non-specific signal when the relevant antibody probe was not applied.

aSyn and Tau aggregates are removed by immunodepletion

To show that the signal measured by sFIDA is specifically attributed to aSyn and Tau aggregates and not to matrix interference, we performed immunodepletion in five CSF samples and the silica nanoparticle standard. To remove the analytes, samples were incubated in presence of magnetic beads linked to 211 antibody, Tau5 antibody or no antibody. After magnetic separation, the supernatants were subjected to sFIDA analysis. For aSyn, 211-depleted samples showed a mean decrease of the readout by 97.0% (Fig. 7b), while in the controls without 211 antibody, the readout was not reduced (−0.6%). Although the readout for Tau aggregates in the samples was comparatively low and close to that of the bovine CSF control, depletion with Tau5 decreased the readout by 38.6% (Fig. 7c, d). Incubation of the samples with magnetic beads alone led to an average decrease of the pixel count by only 19.5% (Fig. 7d). Still, the less efficient reduction in the samples compared to the standards can be attributed to a lower signal-to-noise ratio. The Tau-coated silica nanoparticle standard was depleted even without Tau5 antibody, suggesting non-specific adherence to the surface as observed in the capture control experiment (Fig. 5b).

Analysis of potential heterophilic anti-mouse antibodies (HAMAs) interference

Although one may expect absence of high antibody titers in CSF, we investigated whether HAMAs could possibly compromise the sFIDA assay result, and whether this is potentially relevant for the interpretation of the study results. HAMAs are a well-described interfering factor in immunoassays especially for blood-based

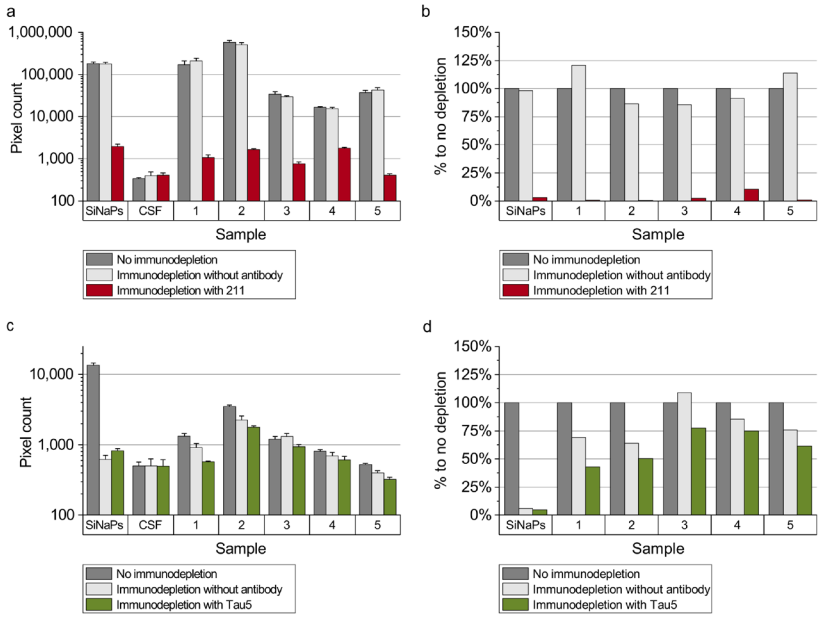


Fig. 7 Immunodepletion of aSyn and Tau in CSF samples. The SiNaP standard and five CSF samples were subjected to immunodepletion with magnetic beads with and without antibody. **a**, **b** Immunodepletion of samples with 211 antibody decreased the pixel counts for aSyn on average by 97%, while incubation with magnetic beads without antibody did not affect the signal. **c**, **d** For aggregated Tau, incubation with magnetic beads without antibody decreased the pixel count by 94% for Tau SiNaPs and on average by 19.5% for samples. Using Tau5 antibody, the decrease of the pixel count for Tau SiNaPs was 95% and for samples 38.6%, respectively. The *% to no depletion* value (Fig. 7 **b**, **d**) was calculated by the ratio the pixel counts of depleted to non-depleted samples. Standard deviation was calculated from the four replicates.

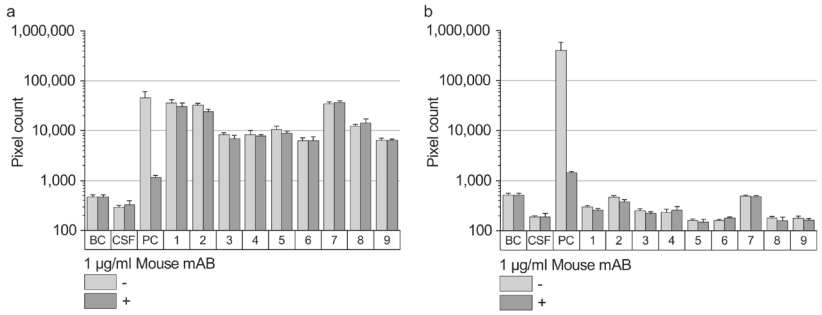


Fig. 8 Influence of heterophilic anti-mouse antibodies. To test, if the signal obtained by sFIDA was possibly caused by heterophilic anti-mouse antibodies, nine CSF samples were incubated with or without 1 µg/ml MOPC-21. As a HAMA model and positive control (PC), we used a goat anti-mouse antibody. The interference of this anti-mouse antibody was reduced by about 98.4% for aSyn (211 CF633, **a**) and 99.7% for Tau (Tau5 CF488, **b**) when adding MOPC-21 while for the CSF samples the signal remains unaffected. Standard deviation was calculated from the four replicates.

assays[16,17]. HAMAs can crosslink capture and detection mouse antibodies leading to false positive signals. Recent research indicates, that HAMAs can also interfere with measurements of CSF samples[18,19]. To analyze HAMA interference in our assay, we used an anti-mouse antibody as a HAMA model. As expected, sFIDA analysis of a blank control spiked with the anti-mouse antibody shows an increased signal in both detection channels (Fig. 8, PC). Addition of the same concentration of a competitor mouse antibody (MOPC-21) reduces the signal by 98.4% for 211 CF633 and by 99.7% for Tau5 CF488. Additionally, we tested nine CSF samples, which yielded high sFIDA readouts, for possible presence of HAMAs. Incubation of the samples with MOPC did not influence sFIDA readouts (p-value of two-sided Mann-Whitney-U for 211 CF633: 0.470, Tau5 CF488: 0.800) suggesting that the observed signal indeed originates from aggregate-bound probes and is not due to HAMA interference.

Contamination with blood did not affect the quantification of aSyn and Tau aggregates in CSF

As blood shows an increased concentration of total aSyn, the contamination of CSF even with low amounts of blood can interfere with the detection of aSyn monomers in CSF[20,21]. To investigate, whether the results in sFIDA were affected by blood contamination as well, we classified the samples into five groups according to their contamination level. Most of the samples (57%)

Table 1. Demographic information on patients and controls that donated CSF samples.

	PD	AD	DLB	PSP	*N*
Number	115	28	19	30	45
Female	41 (36%)	10 (36%)	5 (26%)	15 (50%)	20 (44%)
Age [years]	65.7 (±7.6)	68.2 (±6.3)	69.7 (±7.2)	67.5 (±6.2)	69.0 (±8.9)
Education [years]	16.3 (±2.3)	14.9 (±3.2)	15.5 (±2.8)	15.2 (±2.7)	16.6 (±3.6)
Deceased	17%	32%	32%	37%	13%

PD Parkinson's disease, *AD* Alzheimer's disease, *DLB* Dementia with Lewy bodies, *PSP* Progressive supranuclear palsy, *N* Normal control.

showed no contamination with blood (negative test result), 11% were classified to contamination level 1 (~10 Ery/µL), 7% to level 2 (~25 Ery/µL), and 8% to level 3 (~50 Ery/µl). A contamination of level 4 (> 250 Ery/µL) was observed in 18% of CSF. We further investigated, whether there is a correlation between high read-outs in sFIDA and the blood contamination level. We could not observe a significant increase of aSyn ($p = 0.776$) or Tau ($p = 0.628$) aggregate concentrations in CSF contaminated with blood using Kruskal-Wallis ANOVA (scatterplot in Supplementary Fig. 2). Therefore, no samples were excluded from analysis.

Descriptive analysis of the patient and control cohorts

The samples comprised five diagnostic groups (Table 1). Applying the Kruskal-Wallis test, no significant differences between groups was found for age and gender. For education, PD patients received longer education than AD patients, and normal controls received longer education than the AD and PSP cohorts. Individual information and results of each patient are listed in Supplementary Table 4.

aSyn and Tau aggregate levels distinguish patients with different neurodegenerative diseases

First, we tested the calibrated results of all groups for normal distribution. As the data showed non-normal distributions (p-value < 0.05, Supplementary Table 5), statistical analysis was performed using non-parametric tests like the Kruskal-Wallis or Mann-Whitney U test. The results of the Kruskal-Wallis test showed significant differences between the diagnostic groups for aggregated aSyn ($p = 6.92*10^{-3}$) as well as for aggregated Tau ($p = 2.17*10^{-6}$). The results of pairwise comparisons are shown in Table 2. Concentrations of aSyn aggregates in CSF samples of PD patients were significantly increased compared to the control group. Moreover, patients with DLB showed elevated levels of aSyn aggregates in their CSF. Interestingly, CSF samples of AD patients also showed significantly increased levels of aSyn aggregates compared to normal controls. In the scatterplot (Fig. 9a) as well as in the receiver operating characteristic (ROC) curve (Fig. 9c) we observed a great overlap between synucleinopathies like PD and DLB and the control group (sensitivity and specificity values and AUC in Table 3).

The concentrations of Tau aggregates in PSP samples were significantly elevated compared to all other groups (PD, DLB, AD and controls; Fig. 9b). ROC analysis (Fig. 9d) for this model showed a sensitivity and specificity of 87 and 70% (AUC 0.76) for distinguishing PSP from all other subjects based on Tau sFIDA alone. Moreover, patients with DLB had elevated levels of Tau aggregates compared to the control group ($p = 0.006$) and to PD patients ($p = 0.024$). Interestingly, no significant increase in Tau aggregate concentration for AD patients was observed. The performance of ROC analysis for the tauopathies PSP and AD versus non-tauopathies (DLB, PD, N) revealed a decreased sensitivity and specificity compared to PSP alone. AD alone showed no distinguishability to PD, DLB, and N (Table 2).

Table 2. *P*-values of two-sided Mann-Whitney U test for pairwise comparisons of measured aSyn and of Tau aggregate concentrations.

		PD	DLB	PSP	AD	*N*
aSyn	PD	1				
	DLB	0.992	1			
	PSP	0.292	0.326	1		
	AD	0.811	0.887	0.561	1	
	N	$3.6*10^{-4}$	0.007	0.109	0.010	1
Tau	PD	1				
	DLB	0.024	1			
	PSP	$2.0*10^{-6}$	0.022	1		
	AD	0.418	0.167	$3.4*10^{-4}$	1	
	N	0.243	0.006	$9.7*10^{-6}$	0.123	1

PD Parkinson's disease, *AD* Alzheimer's disease, *DLB* Dementia with Lewy bodies, *PSP* Progressive supranuclear palsy, *N* Normal control.

Aggregate concentrations show comparable discrimination to conventional biomarkers

In CNS biomarker research and clinical routine, total Tau protein (tTau) and phosphorylated Tau protein (pTau) are frequently used as a measure of neurodegeneration. For the present study, we received pTau and tTau concentrations of 88% of the CSF samples and compared sensitivity, specificity and AUC values for each biomarker alone and as combination of three biomarkers (for PD and DLB: pTau, tTau and aSyn aggregates, for AD and PSP: pTau, tTau and Tau aggregates). For PD vs. N, tTau, aSyn aggregates and the combination of pTau, tTau and aSyn aggregates showed nearly the same AUC but differences in specificity and sensitivity (Fig. 10 and Table 4). Due to the reduced number of samples and adaption of the method for the analysis of DLB vs. N, the AUC for aSyn aggregates was decreased compared to the first analysis with all samples (Fig. 9 and Table 3). Consequently, in this analysis, discrimination is only possible based on tTau values. Like in the first analysis, Tau aggregate levels did not discriminate AD vs. N, while AD patients showed increased concentrations of pTau and tTau and can be discriminated with an AUC of 0.78 and 0.75, respectively. For PSP vs. N, pTau and Tau aggregates separated the diseases with an AUC of 0.74 and 0.73. Here, the combination of the three biomarkers showed the largest AUC of 0.80.

aSyn and Tau aggregate concentrations significantly correlate between all patient cohorts

As a correlation between total aSyn (t-aSyn) and total Tau (tTau) has been reported in many studies[8,22–24], we investigated the correlation between aggregated forms of aSyn and Tau, respectively. A significant correlation between Tau and aSyn aggregate concentrations was observed for the whole data set (Pearson coefficient of correlation: $r = 0.81$, $p = 3.8*10^{-57}$), as well as for each individual diagnostic group (Fig. 11a). The greatest correlation was observed

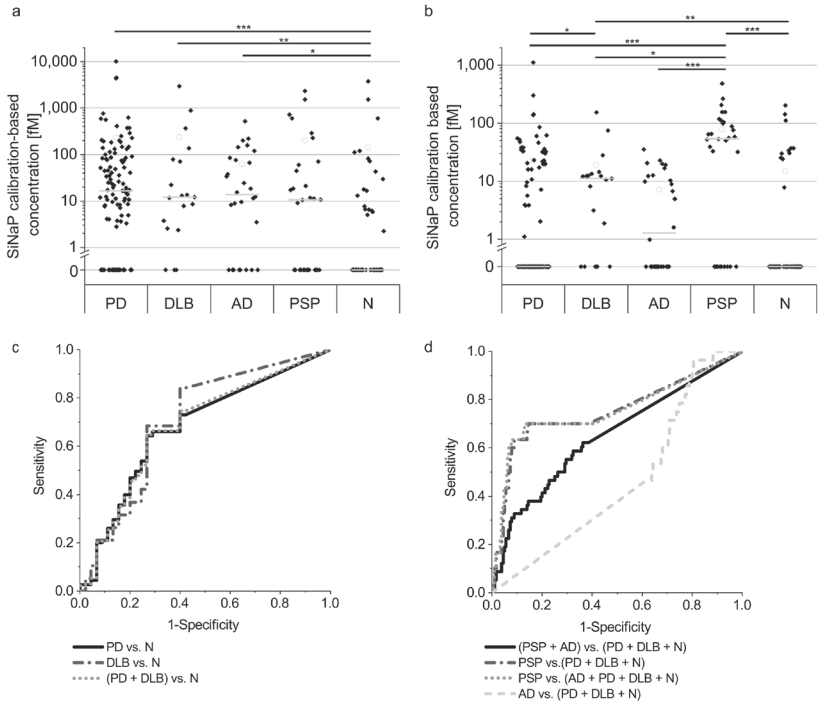


Fig. 9 Calibrated sFIDA results (a, b) and receiver operating characteristic (ROC) analysis (c, d) for the detection of aSyn and Tau aggregates in CSF samples. a For aSyn aggregates, PD, DLB, and AD samples were significantly elevated compared to normal controls (N). **c** In ROC analysis, discrimination of PD patients versus normal controls (N) showed a specificity of 73% and a sensitivity of 64% with an AUC of 0.68, while discrimination of DLB patients versus normal controls showed a specificity of 60% and a sensitivity of 84% with an AUC of 0.71. In combination, synucleinopathies (PD and DLB) can be differentiated from normal controls with a specificity of 73% and a sensitivity of 65% with an AUC of 0.68. **b**, **d** For Tau aggregates, the tauopathy PSP but not AD can be discriminated from non-tauopathies (for PSP vs. non-tauopathies: 86% specificity and 70% sensitivity with an AUC of 0.75; for other specificity and sensitivity values s. Table 3). DLB samples showed significantly increased Tau aggregate concentrations compared to normal controls and PD patients (*p*-values of Mann-Whitney U test for aSyn and Tau aggregates are shown in Table 2). Values below the LOD were set to 0. "-" indicates the median and "○" the mean. Significant differences between cohorts were calculated with Mann-Whitney U test and signed with * (*$p = 0.01–0.05$; **$p = 0.001–0.01$; ***$p < 0.001$). Please, note the logarithmic concentration scales.

Table 3. Results of ROC analysis for specificity, sensitivity and area under the curve (AUC) for aSyn and Tau aggregates in CSF.

		Specificity	Sensitivity	AUC
aSyn	PD vs. N	73.3%	64.3%	0.678
	DLB vs. N	60.0%	84.2%	0.705
	(PD + DLB) vs. N	73.3%	64.9%	0.682
Tau	(PSP + AD) vs. (PD + DLB + N)	67.6%	58.6%	0.649
	PSP vs. (PD + DLB + N)	85.5%	70.0%	0.753
	PSP vs. (AD + PD + DLB + N)	87.0%	70.0%	0.755
	AD vs. (PD + DLB + N)	19.6%	96.4%	0.462

PD Parkinson's disease, *AD* Alzheimer's disease, *DLB* Dementia with Lewy bodies, *PSP* Progressive supranuclear palsy, *N* Normal control, *AUC* Area under the curve.

for DLB samples with a Pearson coefficient of correlation of 0.98 ($p = 8.5*10^{-13}$). PD ($r = 0.87$, $p = 6.5*10^{-36}$), PSP ($r = 0.74$, $p = 3.4*10^{-6}$), and normal control ($r = 0.90$, $p = 2.5*10^{-17}$) CSF samples also showed a positive correlation. For AD patients, the correlation was weaker ($r = 0.52$, $p = 0.005$).

Age, sex and disease duration do not correlate with aggregate concentrations in CSF

As age and gender are risk factors for PD, AD, DLB and PSP[25], the correlation between the concentration of aSyn and Tau aggregates to age and sex are interesting parameters. Across all cohorts, there was no detectable significant effect specific to age, sex, or disease duration (Pearson coefficient of correlation in Supplementary Table 6). For Tau, we observed an inverse correlation between aggregate concentration and education.

DISCUSSION

Our study explored the ability of the sFIDA technology to detect and quantitate aSyn and Tau aggregates in CSF samples and its applicability for the diagnosis of neurodegenerative diseases. aSyn oligomers are thought to be the major toxic species in synucleinopathies like PD and DLB[4,26] but the detection of such oligomers in human biofluids is still challenging due to the low concentration of oligomers and the interference with monomers. The principle of sFIDA allows the sensitive detection and quantitation of oligomers and other aggregates in the presence of monomers with an LOD in the low femtomolar region. Approximately 66% of the CSF samples tested here showed concentrations above the LOD with a wide concentration range of up to 10 pM. Most samples harbored concentrations of aSyn

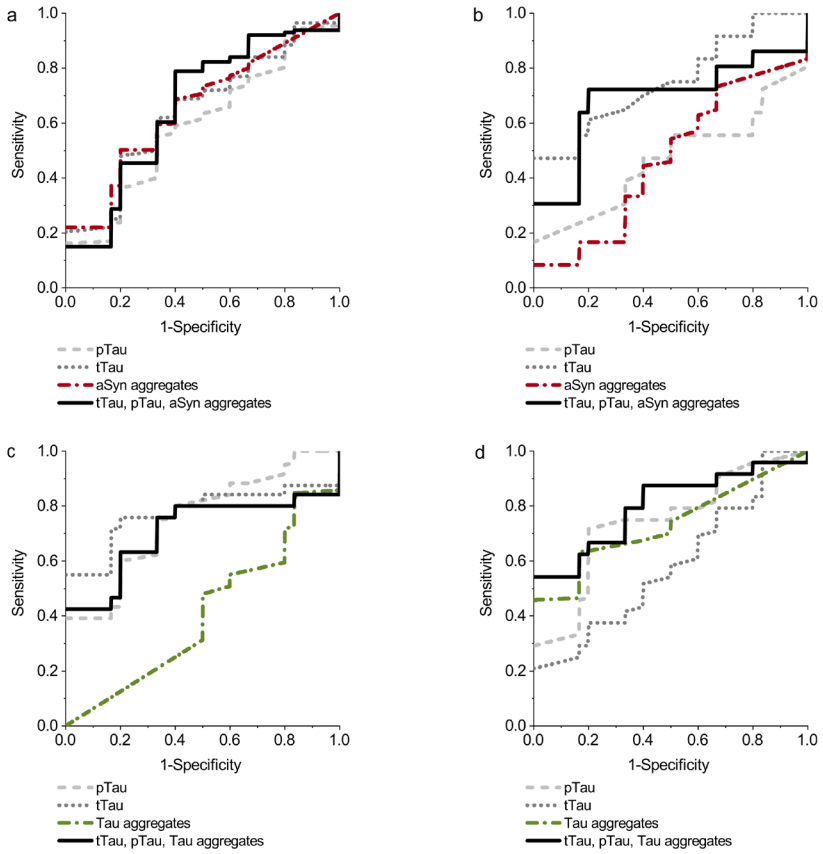


Fig. 10 ROC of pTau, tTau, aSyn and Tau aggregates and their combination. We compared the performance of different biomarkers and analyzed, if the combination of biomarkers improves the discrimination of neurodegenerative diseases compared to normal control (**a**: PD vs. N, **b**: DLB vs. N, **c**: AD vs. N, **d**: PSP vs. N). Sensitivity, Specificity and AUC values are listed in Table 4.

aggregates between 5 fM and 500 fM. For Tau aggregates, 44% of the CSF samples were above the LOD. It has to be considered that a single SiNaP led on average to more pixels with fluorescence above the cutoff value than compared to the average aggregate from real samples. This is presumably due to a higher amount of accessible binding sites for detection antibodies or due to agglomeration of our silica nanoparticle standard. Probably, both aspects influence the average apparent size distribution of our standard particles. With the term size, we therefore do not refer to the actual size, as all particles can be expected to be below the optical resolution limit, but instead to the number of pixels that are illuminated above the cutoff value. The evaluation accounts at least partially for that, because the exact fluorescence intensity of a pixel is not affecting the readout, only the digital decision, whether the fluorescence intensity of a pixel is above the cutoff threshold or not. Nevertheless, the differences in particle size may influence the calibration, so we described the calibrated concentrations as *SiNaP calibration-based concentration*. In this study, we calculated an average apparent particle size of 11.2 pixels per particle for aSyn SiNaPs (obtained from the 63 fM calibration), while for aggregated aSyn in patient samples, the apparent average particle size was 5.2 pixels. For Tau, 204 fM SiNaPs and samples yielded an average apparent particle size of 10 pixels and 2.6 pixels, respectively.

As expected, CSF samples of PD and DLB patients harbored significantly elevated levels of aSyn aggregates compared to normal controls. This is in agreement with several other studies quantifying aSyn oligomers in CSF[8,27,28]. But there is also a large overlap between synucleinopathies and normal controls, which is congruent with some previous studies aimed at discriminating both populations (Majbour: sensitivity 89%, specificity 52%[8], Tokuda: sensitivity 75%, specificity 88%[27]). The combination of aSyn aggregates with other predictive values like total aSyn (t-aSyn), phosphorylated aSyn (p-aSyn), tTau, phosphorylated Tau (pTau), or age may improve the discrimination of synucleinopathies from normal controls, as investigated in other studies[8,21,29]. In this work, we have tested the combination of aSyn aggregates as biomarker with pTau and tTau. The combination of the three biomarkers did not improve the predictive power of the analysis, but for PD vs N, aSyn aggregates alone showed the highest performance of the three biomarkers. We hypothesize that the combination with t-aSyn probably has a higher impact on the AUC, but information on total aSyn levels was not available for the samples tested in this study.

Interestingly, we found elevated levels of aSyn aggregates also in AD patients with concentrations comparable to that of PD or DLB patients. The role of aSyn in AD is still under investigation. Many studies have reported the presence of Lewy bodies in AD brains[30–33] as well as increased t-aSyn concentrations in CSF[24],

Table 4. Results of ROC analysis for specificity, sensitivity and area under the curve (AUC) for pTau, tTau, aSyn or Tau aggregates in CSF and their combination.

		Specificity	Sensitivity	AUC
PD vs. N	tTau	60.0%	68.5%	0.645
	pTau	66.6%	55.0%	0.589
	aSyn aggregates	80.0%	50.2%	0.656
	pTau + tTau + aSyn aggregates	60.0%	78.8%	0.663
DLB vs. N	tTau	100.0%	47.2%	0.752
	pTau	100.0%	16.7%	0.468
	aSyn aggregates	100.0%	8.3%	0.468
	pTau + tTau + aSyn aggregates	80.0%	72.2%	0.689
AD vs. N	tTau	80.0%	75.8%	0.775
	pTau	66.6%	74.7%	0.753
	Tau aggregates	16.6%	84.7%	0.409
	pTau + tTau + Tau aggregates	80.0%	63.3%	0.708
PSP vs. N	tTau	100.0%	20.8%	0.586
	pTau	80.0%	71.7%	0.743
	Tau aggregates	83.3%	63.2%	0.734
	pTau + tTau + Tau aggregates	100.0%	54.2%	0.800

and in an autopsy study based at UPenn, where our CSF samples were collected, more than 52% of individuals with a diagnosis of AD showed considerable Lewy body burden on neuropathology[34]. However, prior biomarker studies have also reported no difference in aSyn monomer concentrations in CSF of AD patients compared to normal controls[21], or even decreased levels of aSyn oligomers in CSF of AD and PSP compared to PD patients[27,35], which is in contrast to our results. Differences in study results might be ascribed to differences in (1) the makeup of patients recruited at different clinical sites, (2) preanalytical aspects related to sample collection or handling, or (3) quantification methods[36]. In this context, we note that all samples used in this study were single-use aliquots collected under strict standard operating procedures. For PSP, we did not measure a significant increase in aSyn aggregate concentration compared to normal controls, which agrees with other studies[21,27].

To date, limited evidence exists regarding the detectability of Tau aggregates in CSF for the diagnosis of neurodegenerative diseases. Increased Tau oligomer concentrations in postmortem PSP brain samples have been reported by Gerson et al.[37]. This is in agreement with our study, where PSP patients showed increased levels of Tau aggregates compared to all other diseases, with sensitivity and specificity of 87 and 70%, respectively. Although there is a consensus about the certainty of tTau and pTau for diagnosis of AD[38] and the presence of Tau oligomers in AD brains[9], we did not observe a statistically significant increase in the concentration of Tau aggregates in CSF samples of these patients. Up to now, most studies are focusing on the presence of tTau and pTau in neurodegenerative diseases. For PSP and AD, quite different concentrations are found in CSF: AD shows significantly increased levels of tTau and pTau[23], whereas PSP samples show no difference or even a decrease in Tau monomer concentrations[23,39]. These observations match our data showing that pTau and tTau were increased for AD, but decreased for PSP (for pTau). For PSP, Tau aggregates alone can differentiate between PSP and normal control group similar to pTau, and the combination of the biomarkers improves the specificity and AUC, which underlines the role of Tau aggregates in PSP as possible biomarker. Wagshal et al. postulate that differences between AD and PSP can probably be ascribed to differences in Tau isoforms, as PSP is known as a 4R-tauopathy, whereas AD shows equal ratios of 4 R and 3 R Tau. Different isoforms of Tau are differentially released from neuronal and glial cells and have differing affinities to antibodies[39,40]. These differences could also be relevant in interpreting our present results, which suggest that aggregated Tau species discriminate PSP vs. AD.

The importance of Tau protein in PD and DLB is still under investigation. Many studies have reported the presence of neurofibrillary tangles in PD and DLB brains[30,31,41,42] but no increase in tTau or pTau in CSF samples of PD patients[8,21]. Our study implicates no relation of increased Tau aggregate concentrations in CSF and the presence of PD. Interestingly, DLB samples showed elevated levels of Tau aggregates compared to those of normal controls and compared to PD patients, but less than those observed in PSP samples.

We also correlated aSyn and Tau aggregate concentrations in CSF samples between individual groups. For correlation of t-aSyn and tTau evidence in the literature is inconcise. Parnetti et al. reported an inverse correlation of aSyn and Tau[29], while several others have observed a positive correlation[22–24]. For aSyn and Tau aggregates, we observed a highly significant positive correlation (Fig. 11a), which is in agreement with several other studies showing the coexistence of the two proteins in Lewy bodies[30,41] and even the existence of hetero-aggregates[33]. Despite substantial overlap, median values of the individual disease groups suggest a mixed pathology ranging from rather pure aSyn pathology in PD via AD and DLB to PSP which shows decreased aSyn and increased Tau pathology (Fig. 11b). Additional correlations with other potential biomarkers, e.g. Amyloid beta and TDP43 aggregates, may further complement the view on these diseases on the molecular level. Determining whether aSyn-Tau hetero-aggregates might be detected by sFIDA in human biofluids is a promising area of future investigation that might add to our understanding on the molecular basis of phenotypic overlap among neurodegenerative diseases.

Naturally occurring oligomers and other aggregates differ in size, morphology and posttranscriptional modifications[4,43]. For detection and quantification, we used the same capture and detection antibody directed against linear epitopes that are expected to be accessible in all aggregated species, in order to quantitate all isoforms, irrespectively of their structural conformation. In future studies, we will further characterize the exact nature of the analytes by introducing size standards and structural probes. Possibly, not all aSyn assemblies in human brain are neurotoxic or disease-specific, and it was strongly discussed if aSyn physiologically occurs as a globular tetramer or as an intrinsically disordered monomer[4,44,45]. Future research will show, if the complex pathology of neurodegenerative diseases limits the diagnostic specificity of measuring the whole soluble aggregate fraction. Nevertheless, we are convinced that the possibility to finally measure aggregate concentrations is essential not only in understanding the underlying pathology, but also for developing therapeutic compounds against these species. Here we showed, that total aggregate concentrations differentiate i.e. PD or PSP from normal control, which further emphasizes the usefulness of quantifying aggregates in CSF for diagnosis of neurodegenerative diseases. For sufficient accuracy, surely, sensitivity and specificity need to be improved, i.e., by combining the concentration of aSyn or Tau aggregates with other biomarkers like t-aSyn, tTau, pTau, or Aβ1-42. Taking further into consideration that perhaps not all naturally occurring aggregates are disease-relevant, it might be interesting to compare or combine the results of total aggregates measured by sFIDA with seeding assays like the RT-QuIC or assays that measure a specific fraction of aggregates.

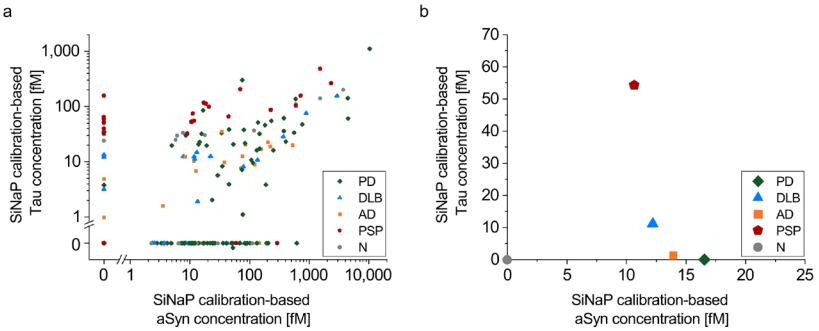


Fig. 11 Correlation of aSyn and Tau aggregate concentration. a aSyn and Tau aggregate concentrations measured by sFIDA show a highly significant correlation across all samples tested (Pearson coefficient of correlation $r = 0.81$, $p = 3.8*10^{-57}$) as well as for each individual cohort. Correlation of the median values for the disease groups is plotted in **b**.

Moreover, we note that, aside from diagnostic applications, sFIDA may be a valuable tool in clinical studies, to select, stratify, and monitor patients for therapies targeting aSyn or Tau oligomers, since sFIDA allows for direct assessment of the mechanism of action and is able to measure target engagement, irrespectively of the structural conformation. Finally, treatment success can be validated on the molecular level by monitoring aggregate titers over the course of medication.

METHODS

Synthesis of protein-coated silica nanoparticles

For assay calibration we have developed a nanoparticle calibration standard based on a silica core[14]. These silica nanoparticles (SiNaPs) were synthesized via Stöber process and afterwards modified with 3-aminopropyl(triethoxysilane) (APTES, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) to generate an aminated surface. Proteins were crosslinked to the aminated surface by maleimido hexanoic acid (MIHA, abcr GmbH, Karlsruhe, Germany). After activation with 200 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) and 50 mM N-hydroxysuccinimid (NHS, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) for 10 min at room temperature (RT), the carboxy group of MIHA was coupled covalently to the amines of the silica nanoparticles. Following incubation for 1 h at RT, the resulting SiNaPs were centrifuged (7000 x *g*, 2 min) and redispersed in PBS and 10% dimethylformamid (DMF, Sigma Aldrich, St. Louis, USA). The washing step was repeated three times, where after the pellet was redispersed in PBS containing 10% DMF and 50 mM ethylendiamintetraacetic acid disodium salt (Na_2EDTA, AppliChem, Darmstadt, Germany) in the last step. Protein fragments of aSyn (aa115-130, Peptides and Elephants, Henningsdorf, Germany) and Tau (aa 210-230, Peptides and Elephants, Henningsdorf, Germany) are functionalized with cysteamine on the C-terminus to enable reacting with the maleimide group of the SiNaPs. For synthesis of protein-conjugated silica nanoparticles, 10% of the possible binding sites were functionalized by adding protein to the redispersed SiNaPs. The dispersion was shaken at RT and 650 rpm. After 1 h, 50 µL of 1 M Tris-(2-carboxyethyl)-phosphine (TCEP, abcr GmbH, Karlsruhe, Germany) was added to prevent oxidation of the protein. The reaction was quenched by adding 20 µL of a 1 M 2-mercaptoethanol solution. The functionalized SiNaPs were washed two times by centrifugation (10,000 x *g*, 4 min) and redispersed in ddH_2O. Finally, the silicon concentration was determined using ICP-MS (inductively coupled plasma – mass spectrometry) and the resulting molar SiNaPs concentration was calculated based on size, density as well as particle shape. Prior to use, the protein-conjugated silica nanoparticles were subjected to ultra-sonification for 10 min.

Tau and aSyn monomers were isolated prior to sFIDA measurement using size exclusion chromatography (Bio SEC3, pore size 150 Å, Agilent, Santa Clara, USA) to ensure that the sample does not contain any aggregates. After SEC purification, we determined the monomer concentration using UV-Vis spectroscopy. We calculated the signal reduction of monomers versus aggregates as described in Eq. (1):

$$Signal\ reduction[\%] = \left(1 - \frac{pixel\ count_{monomer} - pixel\ count_{BC}}{pixel\ count_{aggregates} - pixel\ count_{BC}}\right) * 100\% \quad (1)$$

Characterization of silica nanoparticles

Size and particle shape of the aminated silica nanoparticles were analyzed using transmission electron microscopy (TEM) as previously described by Hülsemann et al.[14]. Mean particle size was 18.5 nm for the aminated silica core (TEM image and size distribution in Supplementary Fig. 1).

Finally, the silicon concentration was determined using inductively coupled plasma – mass spectrometry (ICP-MS). SiNaPs were diluted in 3% nitric acid and analyzed in helium collision cell mode with an Agilent 7500 (Agilent Technologies, Japan). External calibration with rhodium as the internal standard was performed using NIST traceable commercial standard solution (VWR International, PA, USA). Complete dissociation of silica nanoparticles in the plasma without the need for digestion prior to analysis was shown in earlier studies up to a particle diameter of 500 nm[46–48]. The molar SiNaPs concentration was calculated based on the silicon concentration determined by ICP-MS and the known size, density as well as shape of the particles.

Labeling of antibodies

For microscopic detection of aggregates, we used fluorescent antibodies. The mouse anti-aSyn monoclonal antibody 211 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA) was labeled with CF633 (Biotium, Freemont, USA), whereas the anti-tau Tau5 antibody (Biolegend, San Diego, USA) was labeled with CF488A (Biotium, Freemont, USA). The labeling process was performed as described in the manufacturer's protocol. The dyes were activated as succinimidyl esters to react covalently with the amines of the antibody in carbonate buffer. For purification of each labeled antibody, a polyacrylamide bead suspension (Bio-Gel P-30 Gel, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) was used. The concentration and the degree of labeling was determined according to the manufacturer's protocol.

Assay protocol

The biochemical principle of the sFIDA assay was previously described by Kravchenko et al., and Herrmann et al.[11,49]. In the present study, we used Nunc MicroWell 384-Well plates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) functionalized with 211 and Tau5 antibodies as captures, each at 5 µg/mL in 1 x PBS buffer. After washing five times with 80 µL TBS-T (1x TBS (Serva, Duisburg, Germany) and 0.05% Tween20 (AppliChem, Darmstadt, Germany)) and afterwards five times with 1 x TBS, the wells were blocked with 1% BSA (AppliChem, Darmstadt, Germany) in TBS containing 0.03% ProClin (Sigma Aldrich, Missouri, USA) for 1.5 h at RT. The plate was washed again with TBS-T and TBS (see above) and 20 µl protein-conjugated SiNaPs diluted in TBS-ProClin containing 0.5% BSA and 0.05% Tween, and 20 µl of the samples were incubated for 2 h at RT. After washing five times with TBS and changing the buffer to TBS-ProClin, the wells were incubated for 2 h

with the fluorescent detection antibodies 211-CF633 (0.4 µg/mL) and Tau5-CF488 (4 µg/mL) in TBS, after which the wells were washed with TBS again. For measurement, the buffer in the wells was changed against TBS-ProClin. Each concentration and sample were pipetted fourfold. All washing steps were carried out by an automated microplate washer (405 LS Microplate Washer, BioTek, VT, USA).

Inter-assay and inter-laboratory measurements

For inter-assay measurement of the calibration curve and the samples, the same assay was repeated four months later by the same technician with the same antibodies and materials but minor changes in washing conditions, such as the use of a different microplate washer and washing and blocking reagents with a different manufacturing date. Repeatedly assayed samples were subjected to an additional freeze-thaw cycle.

For inter-laboratory analysis, the assay was prepared and measured by a different operator in a different laboratory. The first measurement took place at the Forschungszentrum Jülich, and the second measurement at the Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf two months after the first measurement with the same changes as described above for inter-assay analysis.

Immunodepletion

For immunodepletion, 211 and Tau5 antibody were covalently coated to carboxylated magnetic dynabeads (Invitrogen, Waltham, USA) according to the manufacturer's protocol. Shortly, dynabeads were washed twice with 2.5 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES, pH 5, Roth, Karlsruhe, Germany) and applied to a magnet to remove the supernatant. Carboxy groups were activated with 50 µg/ml EDC and 50 µg/ml NHS in MES for 30 min at RT while rotating. After activation, the dynabeads were washed again with MES and coated with 211 or Tau5 antibody to a concentration of 20 µg/ml dynabeads, respectively. To ensure that signal loss is not due to unspecific binding of sample components to dynabeads, we run a third synthesis without antibody. After incubation for 1 h at RT, dynabeads were washed again and quenched with 50 mM ethanolamine in MES for 1 h at RT followed by a last washing step.

For immunodepletion, we applied 0.5 mg of antibody coated dynabeads to the magnet and removed the supernatant. 100 µl sample were added and incubated for 1 h at RT while rotating. After incubation, dynabeads were applied to the magnet again and the supernatant was transferred to a fresh tube. The immunodepleted samples were analyzed using sFIDA as described above. To consider for possible effects of magnetic beads on the pixel count, we normalized the signals by using an individual cutoff based on the CSF control. Please, note that the CSF control used for immunodepletion and HAMA interference experiments differed from the CSF control used for calibrating the results of the big data set of the study and showed an increased fluorescence signal for Tau5 CF488.

Influence of heterophilic antibodies

The potential influence of heterophilic antibodies, specifically anti-mouse antibodies (HAMAs), was analyzed using the purified mouse IgG isotype control MOPC-21 as a competitor (Biolegend, San Diego, USA). Possibly existing HAMAs in CSF can bind to MOPC instead to the assay antibodies which prevents false positive signals. A total of nine samples that yielded high sFIDA signals were spiked with 1 µg/ml MOPC-21. As positive control, we used buffer spiked with 1 µg/ml goat anti-mouse IgG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) with or without MOPC-21.

Determination of blood contamination

Contamination of CSF samples with blood was determined semi-quantitatively using Combur10-Test-Analysis (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) as described in Barkovits et al.[20]. Test stripes were incubated with 50 µL CSF for 60 s and the amount of contamination was analyzed according to the manufacture's protocol.

Image-data acquisition

Imaging was performed on a total internal reflection microscope (TIRFM, Leica DMI6000B, Wetzlar, Germany) as previously described by Kravchenko et al.[49] (excitation: 635 nm, emission filter: 705/22 nm; excitation: 488 nm, emission filter: 525/36 nm; exposure time: 1000 ms; gain: 1300). A total of 25 images per well with 1000 × 1000 pixels each were measured, which covers 3.14% of the total area per well. For unbiased and automated image-data analysis, we have used our previously developed sFIDAta software tool[15]. The analysis includes the automated detection and elimination of artefact containing images and counting of aggregate indicating pixels. The *pixel count* is referred to as the average number of pixels in an image that exceed a pre-defined cutoff value. The *cutoff* is defined as the grey-scale value at which the ratio of the positive versus the total number of pixels in the buffer control equals a pre-defined value. The cutoff is used to compensate fluctuations in the absolute fluorescence intensities among experiments and different conditions within one experiment (i.e., antibody dilutions) and is determined for each experiment based on a buffer control sample. To further ensure that differences in fluorescence intensity do not affect assay robustness, we run a calibration in each 384-microtiter plate and converted pixel counts into SiNaP calibration-based fM concentrations.

For inter-assay measurement, a cutoff of 0.001% was chosen, while the cutoff for the analysis of the whole dataset of 237 samples was 0.05%. This difference is due to a new lot of detection antibodies with a lower degree of labeling. To further ensure that all artificial images are excluded from the analysis, min-max filtering was applied, which removed 10% of the images per well with the highest and 10% of the images per well with the lowest pixel counts.

Statistics

General statistics. Statistical analysis was performed using OriginPro 2020 SR1 (OriginLab Corporation, MA, USA) and matlab2019b (The MathWorks, MA, USA) software. Mean and standard deviation was calculated based on the pixel counts of the four replicates. Intra-assay variation is described by the CV% value. To determine inter-assay and inter-laboratory variation, the Pearson coefficient of correlation was calculated for the replicate measurements of the samples.

Calibration. For calculation of the calibration curve, only the concentrations of the silica nanoparticle standard were included that significantly differed from the blank control and were above the limit of detection (LOD). To this end, a one-sided Mann-Whitney U test was carried out with a confidence interval of 5%. After calculation of the calibration range for each experiment, a universal calibration range for all of the experiments was established. The LOD is defined based on Eq. (2):

$$LOD[pixel] = pixel\,count(blank\,control) * 2\sigma \quad (2)$$

For linear regression, the pixel counts were weighted with 1/readout. The bovine CSF control was used as a negative control for the calibration as well as for calculation of the LOD.

Logistic regression and ROC analysis. Logistic regression was performed to evaluate the ability of each biomarker to classify the diagnostic groups. To this end, we used scikit-learn library (version 1.0.2). Since the use of multiple features increases the risk of overfitting, the k-fold cross-validation method was used to generate Fig. 10, in order to provide unbiased results. Deviations between Fig. 9 and Fig. 10 can be explained not only by the modified method but also by a divergent data basis. Since tTau and pTau values were not available for all samples, these were excluded for the creation of the Fig. 10. By forming the average of the k results, a single receiver operating characteristic (ROC) curve was generated. The optimal combination of sensitivity and specificity for a ROC curve was calculated with a maximized Youden's index.

Patient samples

Patients were recruited from the University of Pennsylvania (UPenn) Parkinson's Disease and Movement Disorder Center (PDMDC), Alzheimer's Disease Center (ADC), or Frontotemporal Dementia Center (FTDC). Written, informed consent was obtained from each study participant at enrollment and biofluids were collected and stored for future research as approved by the UPenn Institutional Review Board (FWA00004028). Participants were diagnosed with Parkinson's disease (PD, $n = 115$), Alzheimer's disease (AD, $n = 28$), progressive supranuclear palsy (PSP, $n = 30$), or dementia with Lewy bodies (DLB, $n = 19$) according to clinical criteria as previously described[50]. Participants with no known neurological disorder were also enrolled (normal control, N, $n = 45$). Cerebrospinal fluid (CSF) was collected by trained neurologists via lumbar puncture, and aliquots of 0.5 mL were stored at −80 °C until analysis. Demographic information was collected by trained research staff. Samples were collected between August of 2005 and November 2019, with the exception of one sample, which was

collected in March of 1999. Samples included in the analysis were matched for age across diagnosis groups. Initially, a subset of PSP ($n = 30$), PD ($n = 30$), and N ($n = 30$) samples were analyzed as an exploratory cohort. The remainder of the samples were analyzed to investigate differences between disease groups. Researchers were blinded to clinical data at the time of sFIDA measurement.

Concentrations of pTau and tTau were measured using Luminex xMAP immunoassay platform (Luminex, Austin, USA)[51,52] and provided by Integrated Neurodegenerative Disease Database (INDD).

After unblinding, the data points of each group were first tested for normal distribution (Shapiro Wilk, Lilliefors, Kolmogorov-Smirnov, Anderson Darling). Afterwards, a Kruskal-Wallis test was executed to identify differences between the groups. In case of significant differences ($p < 0.05$) a pairwise comparison using the two-sided Mann-Whitney U test with a confidence interval of 0.05 was performed.

DATA AVAILABILITY

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary materials.

CODE AVAILABILITY

For image data analysis, we used the sFIDAta software tool, which can be made available upon request from the corresponding author.

Received: 27 November 2021; Accepted: 10 May 2022;
Published online: 02 June 2022

REFERENCES

1. Dickson, D. W. Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harb. Perspect Med.* **2**, https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009258 (2012).
2. Foguem, C. & Manckoundia, P. Lewy Body Disease: Clinical and Pathological "Overlap Syndrome" Between Synucleinopathies (Parkinson Disease) and Tauopathies (Alzheimer Disease). *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **18**, 24 (2018).
3. Haass, C. & Selkoe, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 101–112 (2007).
4. Bengoa-Vergniory, N., Roberts, R. F., Wade-Martins, R. & Alegre-Abarrategui, J. Alpha-synuclein oligomers: A new hope. *Acta Neuropathol.* **134**, 819–838 (2017).
5. Prots, I. et al. alpha-Synuclein oligomers induce early axonal dysfunction in human iPSC-based models of synucleinopathies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **115**, 7813–7818 (2018).
6. Willbold, D. & Kutzsche, J. Do we need anti-prion compounds to treat Alzheimer's Disease? *Molecules* **24**, https://doi.org/10.3390/molecules24122237 (2019).
7. Majbour, N. K. et al. Cerebrospinal alpha-Synuclein oligomers reflect disease motor severity in DeNoPa longitudinal cohort. *Mov. Disord.* https://doi.org/10.1002/mds.28611 (2021).
8. Majbour, N. K. et al. Oligomeric and phosphorylated alpha-synuclein as potential CSF biomarkers for Parkinson's disease. *Mol. Neurodegener.* **11**, 7 (2016).
9. Sengupta, U. et al. Tau oligomers in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **4**, 226–235 (2017).
10. Kulenkampff, K., Wolf Perez, A.-M., Sormanni, P., Habchi, J. & Vendruscolo, M. Quantifying misfolded protein oligomers as drug targets and biomarkers in Alzheimer and Parkinson diseases. *Nat. Rev. Chem.* **5**, 277–294 (2021).
11. Herrmann, Y. et al. Nanoparticle standards for immuno-based quantitation of alpha-synuclein oligomers in diagnostics of Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Clin. Chim. Acta* **466**, 152–159 (2017).
12. Alam, P., Bousset, L., Melki, R. & Otzen, D. E. alpha-synuclein oligomers and fibrils: A spectrum of species, a spectrum of toxicities. *J. Neurochem.* **150**, 522–534 (2019).
13. Willbold, D., Strodel, B., Schroder, G. F., Hoyer, W. & Heise, H. Amyloid-type protein aggregation and prion-like properties of amyloids. *Chem. Rev.* **121**, 8285–8307 (2021).
14. Hülsemann, M. et al. Biofunctionalized Silica nanoparticles: Standards in amyloid-beta oligomer-based diagnosis of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **54**, 79–88 (2016).
15. Kühbach, K. et al. Application of an Amyloid Beta Oligomer Standard in the sFIDA Assay. *Front Neurosci.* **10**, 8 (2016).
16. Bolstad, N. et al. Heterophilic antibody interference in commercial immunoassays; a screening study using paired native and pre-blocked sera. *Clin. Chem. Lab Med.* **49**, 2001–2006 (2011).
17. Vanderstichele, H., Stoops, E., Vanmechelen, E. & Jeromin, A. Potential sources of interference on Abeta immunoassays in biological samples. *Alzheimers Res. Ther.* **4**, 39 (2012).
18. Ishii, R. et al. Decrease in plasma levels of alpha-synuclein is evident in patients with Parkinson's disease after elimination of heterophilic antibody interference. *PLoS One* **10**, e0123162 (2015).
19. Sehlin, D. et al. Interference from heterophilic antibodies in amyloid-beta oligomer ELISAs. *J. Alzheimers Dis.* **21**, 1295–1301 (2010).
20. Barkovits, K. et al. Blood Contamination in CSF and Its Impact on Quantitative Analysis of Alpha-Synuclein. *Cells* **9**, https://doi.org/10.3390/cells9020370 (2020).
21. Mollenhauer, B. et al. alpha-Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study. *Lancet Neurol.* **10**, 230–240 (2011).
22. Forland, M. G. et al. The value of cerebrospinal fluid alpha-synuclein and the tau/alpha-synuclein ratio for diagnosis of neurodegenerative disorders with Lewy pathology. *Eur. J. Neurol.* **27**, 43–50 (2020).
23. van Steenoven, I. et al. alpha-Synuclein species as potential cerebrospinal fluid biomarkers for dementia with lewy bodies. *Mov. Disord.* **33**, 1724–1733 (2018).
24. Slaets, S. et al. Increased CSF alpha-synuclein levels in Alzheimer's disease: Correlation with tau levels. *Alzheimers Dement* **10**, S290–S298 (2014).
25. Savica, R., Grossardt, B. R., Bower, J. H., Ahlskog, J. E. & Rocca, W. A. Incidence and pathology of synucleinopathies and tauopathies related to parkinsonism. *JAMA Neurol.* **70**, 859–866 (2013).
26. Winner, B. et al. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 4194–4199 (2011).
27. Tokuda, T. et al. Detection of elevated levels of alpha-synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology* **75**, 1766–1772 (2010).
28. Park, M. J., Cheon, S. M., Bae, H. R., Kim, S. H. & Kim, J. W. Elevated levels of alpha-synuclein oligomer in the cerebrospinal fluid of drug-naive patients with Parkinson's disease. *J. Clin. Neurol.* **7**, 215–222 (2011).
29. Parnetti, L. et al. Differential role of CSF alpha-synuclein species, tau, and Abeta42 in Parkinson's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **6**, 53 (2014).
30. Wakabayashi, K. et al. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol. Neurobiol.* **47**, 495–508 (2013).
31. Irwin, D. J. & Hurtig, H. I. The Contribution of Tau, Amyloid-Beta and Alpha-Synuclein Pathology to Dementia in Lewy Body Disorders. *J. Alzheimers Dis. Parkinsonism* **8**, https://doi.org/10.4172/2161-0460.1000444 (2018).
32. Hamilton, R. L. Lewy bodies in Alzheimer's disease: a neuropathological review of 145 cases using alpha-synuclein immunohistochemistry. *Brain Pathol.* **10**, 378–384 (2000).
33. Galpern, W. R. & Lang, A. E. Interface between tauopathies and synucleinopathies: A tale of two proteins. *Ann. Neurol.* **59**, 449–458 (2006).
34. Robinson, J. L. et al. Neurodegenerative disease concomitant proteinopathies are prevalent, Age-related and APOE4-associated. *Brain* **141**, 2181–2193 (2018).
35. Hansson, O. et al. Levels of cerebrospinal fluid alpha-synuclein oligomers are increased in Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies compared to Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* **6**, 25 (2014).
36. Abdi, I. Y. et al. Preanalytical stability of CSF Total and Oligomeric Alpha-Synuclein. *Front. Aging Neurosci.* **13**, 638718 (2021).
37. Gerson, J. E. et al. Characterization of tau oligomeric seeds in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol. Commun.* **2**, 73 (2014).
38. Olsson, B. et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* **15**, 673–684 (2016).
39. Wagshal, D. et al. Divergent CSF tau alterations in two common tauopathies: Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **86**, 244–250 (2015).
40. Karch, C. M., Jeng, A. T. & Goate, A. M. Extracellular Tau levels are influenced by variability in Tau that is associated with tauopathies. *J. Biol. Chem.* **287**, 42751–42762 (2012).
41. Zhang, X. et al. Tau pathology in Parkinson's Disease. *Front Neurol.* **9**, 809 (2018).
42. Irwin, D. J., Lee, V. M. & Trojanowski, J. Q. Parkinson's disease dementia: Convergence of alpha-synuclein, tau and amyloid-beta pathologies. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 626–636 (2013).
43. Ingelsson, M. Alpha-Synuclein Oligomers-Neurotoxic Molecules in Parkinson's disease and other Lewy body disorders. *Front. Neurosci.* **10**, 408 (2016).
44. Bartels, T., Choi, J. G. & Selkoe, D. J. alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* **477**, 107–110 (2011).
45. Fauvet, B. et al. alpha-Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and Escherichia coli exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.* **287**, 15345–15364 (2012).
46. Herouit, J., Nischwitz, V., Bartczak, D. & Goenaga-Infante, H. The potential of asymmetric flow field-flow fractionation hyphenated to multiple detectors for the quantification and size estimation of silica nanoparticles in a food matrix. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 3919–3927 (2014).

47. Dubascoux, S. et al. Field-flow fractionation and inductively coupled plasma mass spectrometer coupling: History, development and applications. *J. Anal. At. Spectrom.* **25**, 613–623 (2010).
48. Meermann, B. & Nischwitz, V. ICP-MS for the analysis at the nanoscale – a tutorial review. *J. Anal. At. Spectrom.* **33**, 1432–1468 (2018).
49. Kravchenko, K. et al. Analysis of anticoagulants for blood-based quantitation of amyloid beta oligomers in the sFIDA assay. *Biol. Chem.* **398**, 465–475 (2017).
50. Toledo, J. B. et al. A platform for discovery: The University of Pennsylvania Integrated Neurodegenerative Disease Biobank. *Alzheimer's Dement* **10**, 477–484 e471 (2014).
51. Irwin, D. J. et al. CSF tau and beta-amyloid predict cerebral synucleinopathy in autopsied Lewy body disorders. *Neurology* **90**, e1038–e1046 (2018).
52. Berlyand, Y. et al. An Alzheimer's Disease-Derived Biomarker Signature Identifies Parkinson's Disease Patients with Dementia. *PLoS One* **11**, e0147319 (2016).

ACKNOWLEDGEMENTS

We received funding from the European Union Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) under grant agreement 602999 (SYMPATH project), the Federal Ministry of Education and Research within the projects VIP (03V0641), KNDD (01GI1010A), JPND/BIOMARKAPD (01ED1203H), and NEUROALLIANZ (16GW0099). We were also supported by the programs "Biomarkers Across Neurodegenerative Diseases I + II" of The Alzheimer's Association, Alzheimer's Research UK and the Weston Brain Institute (11084 and BAND-19-614337). We are also grateful for support from The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research (14977, 009889), from the ALS Association and from the Packard Center (19-SI-476). We further received funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (INST 208/616-1 FUGG, INST 208/794-1 FUGG) and the Helmholtz Association (HVF0079). TFT is additionally funded by the NIH (K23-NS11416). In memoriam of John Q. Trojanowski.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LB, MP, and VK developed the assay. LB performed the experiments and analyzed the data, VK, AC and VN assisted in validation of the method. AK, FR and JW helped carry out the statistics and analysis. LB wrote the manuscript together with OB, DW and GT. OB, DW, and ACP supervised the project. DWe, DI, MG, DAW, JQT, TFT, and ACP recruited the patients. RZ, TFT, and ACP selected appropriate samples and organized the clinical data. AD, AS and TB contributed to the discussion of the results and provided critical feedback. JQT reviewed the manuscript and all data before his passing on February 8, 2022.

FUNDING

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

COMPETING INTERESTS

The Authors declare no competing non-financial interests but the following competing financial interests: DW, OB, and AK are shareholders of attyloid GmbH. All other authors declare no competing financial interests related to this work.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41531-022-00330-x.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Dieter Willbold.

Reprints and permission information is available at http://www.nature.com/reprints

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2022

4.7 Quantifizierung von DISC1 Aggregaten in humanen Liquorproben

Disrupted-in-schizophrenia 1 protein aggregates in cerebrospinal fluid are elevated in patients with first-episode psychosis

Autoren	**Marlene Pils**, Julia Rutsch, Feride Eren, Göran Engberg, Fredrik Piehl, Simon Cervenka, Carl Sellgren, Svenja Troßbach, Dieter Willbold, Sophie Erhardt, Oliver Bannach and Carsten Korth
Publiziert in	**Psychiatry and Clinical Neurosciences (2023)** Impact-Faktor: 11,9 (2022) DOI: https://doi.org/10.1111/pcn.13594
Beitrag	**Eigener Anteil 75%** ▪ Weiterentwicklung und Validierung der sFIDA-Technologie für den Nachweis von DISC1-Aggregaten ▪ Durchführung der Validierungsstudien ▪ Durchführung der sFIDA-Studie zur Quantifizierung von DISC1-Aggregaten aus humanen Liquorproben ▪ Auswertung und Analyse der sFIDA-Daten ▪ Anfertigungen der Abbildungen ▪ Diskussion der Ergebnisse ▪ Hauptverfasserin des Manuskripts
Druckgenehmigung	siehe Anhang 26

Check for updates

PCN Psychiatry and Clinical Neurosciences

REGULAR ARTICLE

Disrupted-in-schizophrenia 1 protein aggregates in cerebrospinal fluid are elevated in patients with first-episode psychosis

Marlene Pils, MSc[1,2] **Julia Rutsch, MSc**[3] **Feride Eren, PhD**[4] **Göran Engberg, MD**[4] **Fredrik Piehl, MD**[5,6] **Simon Cervenka, MD, PhD**[7,8] **Carl Sellgren, MD, PhD**[4,7] **Svenja Troßbach, PhD**[3] **Dieter Willbold, PhD**[1,2,9] **Sophie Erhardt, PhD**[4] **Oliver Bannach, PhD**[1,2]* **and Carsten Korth, MD, PhD**[3]*

Aim: The disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) protein is a key regulator at the intersection of major signaling pathways relevant for adaptive behavior. It is prone to posttranslational changes such as misassembly and aggregation but the significance of such transformations for human mental illness has remained unclear. We aimed to demonstrate the occurrence of DISC1 protein aggregates in patients with first-episode psychosis (FEP).

Method: Cerebrospinal fluid samples of patients with FEP ($n = 50$) and matched healthy controls (HCs; $n = 47$) were measured by the highly sensitive surface-based fluorescence intensity distribution analysis technology that enables single aggregate detection.

Results: We demonstrate that DISC1 protein aggregates are increased in cerebrospinal fluid samples of patients with FEP versus HCs. The concentration was in the low femtomolar range. No correlations were found with specific symptom levels, but the difference was particularly significant in the subset of patients with the diagnoses schizophrenia, unspecified (DSM-IV 295.9) or schizoaffective disorder (DSM-IV 295.70) at 18-month follow-up. DISC1 protein aggregate levels did not significantly change within the 18-month observation interval and were on average higher for individuals carrying the major DISC1 rs821577 allele, before correction.

Conclusion: The occurrence of protein aggregates *in vivo* in patients with psychotic disorders has not been previously reported. It underscores the significance of posttranslational modifications of proteins both as pathogenetic mechanisms and as potential diagnostic markers in these disorders.

Keywords: *biomarker, cerebrospinal fluid, disrupted-in-schizophrenia 1 protein, pathomechanisms, schizophrenia.*

http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pcn.13594/full

Molecular markers for major psychiatric diseases such as schizophrenia and recurrent affective disorders that can aid in the diagnostic workup and/or therapeutic monitoring are urgently needed. The current lack of such markers in part reflects an incomplete understanding of underlying disease mechanisms. Initial hopes of genetic markers to fulfill such a role have not materialized so far. Although schizophrenia shows a high degree of heritability, currently known common genetic variants together account for less than 10% of variance in disease risk.[1]

Proteins are the ultimate executors of cellular functions and are involved in signaling pathways governing adaptive behavior. They are also the most recognized molecular markers in medical routine diagnostics, usually detected by specific immunological assays. Posttranslationally modified proteins play a key role in neurodegenerative diseases,[2] where the presumed causally responsible protein aggregates such as Aβ, tau, α-synuclein, or others can be measured in *post mortem* brain, and *in vivo* by using positron emission tomography, cerebrospinal fluid (CSF) or blood.

The establishment of a role of posttranslationally modified proteins, such as misassembled or aggregated proteins, and particularly the identification of candidate proteins in major psychiatric diseases is still in its infancy.[3,4] The disrupted-in-schizophrenia 1 *(DISC1)* gene was identified as a familial gene in a large Scottish pedigree[5] but was subsequently not found to feature in larger studies of common gene variants.[1,6] The protein, however, is subject to posttranslational modifications such as phosphorylation[7] and multimerization.[8]

[1] Institute of Biological Information Processing (Structural Biochemistry: IBI-7), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany
[2] attyloid GmbH, Düsseldorf, Germany
[3] Department of Neuropathology, Heinrich Heine University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany
[4] Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden
[5] Department of Clinical Neuroscience, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden
[6] Department of Neurology, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden
[7] Centre for Psychiatry Research, Department of Clinical Neuroscience, Karolinska Institutet, and Stockholm Health Care Services, Region Stockholm, Stockholm, Sweden
[8] Department of Medical Sciences, Psychiatry, Uppsala University, Uppsala, Sweden
[9] Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany
* Correspondence: Email: ckorth@hhu.de; o.bannach@fz-juelich.de

© 2023 The Authors. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Japanese Society of Psychiatry and Neurology.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

PCN Psychiatry and Clinical Neurosciences

14401819, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pcn.13594 by Cochrane Germany, Wiley Online Library on [09/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Furthermore, it is highly aggregation-prone, both *in vitro* and *in vivo*.[8,9] In *post mortem* brains, DISC1 aggregates have been identified biochemically in patients with schizophrenia and with recurrent affective disorders, but were not found in healthy controls (HCs) or patients with classical neurodegenerative diseases.[8,10] An animal model displaying DISC1 aggregation showed dysregulated dopamine homeostasis,[11] consistent with a role for DISC1 aggregates in non-adaptive behavior.

We set out to identify DISC1 aggregates in patients with first-episode psychosis (FEP) using a highly sensitive surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA). We previously introduced sFIDA as a protein oligomer-specific quantitation method for counting single proteinaceous particles. sFIDA features a combination of an enzyme-linked immunosorbent assay–like biochemical setup and a microscopy-based readout with subfemtomolar sensitivity (Fig. 1).[12,13] By using the same or overlapping epitopes for capture and detection, specificity for aggregates versus monomers is obtained. The method has been applied more recently to quantify α-synuclein and Tau oligomers in CSF of patients diagnosed with tauopathies and synucleinopathies.[14] Furthermore, sFIDA has been employed to determine levels of α-synuclein aggregates in stool samples obtained from patients with idiopathic rapid eye movement sleep disorder and Parkinson disease,[15] as well as Aβ aggregate levels in *ex vivo* brain samples from patients with Alzheimer disease.[16]

The main aim of our study was to use sFIDA to quantitatively compare DISC1 protein aggregates in CSF between patients with FEP versus HCs and to explore the presence and the potential diagnostic significance of DISC1 aggregate detection for clinical use. A second aim was to compare DISC1 aggregate levels with the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS), as well as cognitive functions. Finally, DISC1 aggregates levels were compared between subsets of patients depending on their DSM-IV diagnosis at follow-up to explore the use of DISC1 as a potential biomarker for clinical progression.

Methods

Patients

The present study was approved by Stockholm's regional ethics committee (Dnr 2010/879–31/1). Prior to participating in the trial, all patients and HCs completed a written informed consent form in line with the Declaration of Helsinki. The Karolinska Schizophrenia Project recruited all participants in partnership with four psychiatric institutes in Stockholm, Sweden: PRIMA Vuxenpsykiatri, Södra Stockholms Psykiatri, Norra Stockholms Psykiatri, and Psykiatri Nordväst. The study's participants were recruited between March 2011 and March 2019. The presence of neurologic disorders or severe somatic sickness, a history of illicit substance addiction, and the existence neurodevelopmental abnormalities such as autism spectrum disorder were all exclusion factors for the study. Urine testing was used to assess drug usage. To rule out macroscopic brain abnormalities, magnetic resonance imaging (MRI) was employed. To assess clinical characteristics of the patients, the Global Assessment of Functioning (GAF; where symptom and functioning dimensions were assessed separately), PANSS, Clinical Global Impression (CGI), Alcohol Use Disorders Identification Tests, and Drug Use Disorders Identification Tests were used. A clinical interview using DSM-IV or a consensus diagnostic process was employed to establish the diagnosis. Patients were contacted for reassessment after roughly 18 months, and the corresponding DSM-IV diagnosis was determined for 50 patients: paranoid schizophrenia (PS; DSM-IV 295.30) ($n = 23$); schizophrenia, unspecified (SU; DSM-IV 295.9) ($n = 9$); other schizophrenia (OS; DSM-IV 295.40) ($n = 1$); hebephrenic schizophrenia (HS; DSM-IV 295.10) ($n = 3$); residual schizophrenia (RS; DSM-IV 295.60) ($n = 1$); delusional disorders (DD; DSM-IV 297.1) ($n = 3$); acute and transient psychotic disorder, unspecified (ATPDU; DSM-IV 298.8) ($n = 1$); unspecified nonorganic psychosis (UNO; DSM-IV 298.9) ($n = 4$); schizoaffective disorder (SAD; DSM-IV 295.70) ($n = 4$); and major depressive disorder (MD; DSM-IV 296.21) ($n = 1$). Tobacco products were permitted to be used by patients, and 13 of the patients (26%) used nicotine derivatives (smoking or snuff), with information on nicotine missing in one patient. During their participation in the study, several patients needed sedatives and anxiolytics. Benzodiazepines were administered to 21 of the 50 patients during plasma and CSF sampling. At the time of sampling, 29 of 50 (58%) patients were taking antipsychotic medications. For these individuals, the highest number of days on antipsychotic therapy was 25, and the mean number±SEM of days was 14.2 ± 2.2 ($n = 14$). The remaining 21 patients had not used antipsychotics before or during plasma and CSF collection. The following antipsychotics were used by patients: olanzapine, aripiprazole, risperidone, quetiapine, paroxetine, or haloperidol. Patients' close relatives supplied knowledge available on the duration of untreated psychosis.

Healthy controls

The study enlisted 47 healthy individuals through advertising. A physical examination, brain MRI, blood and urine collection, and other procedures were performed to assess the HC participants. The Mini International Neuropsychiatric Interview was used to screen patients for past psychiatric illness. The study excluded participants who used illicit substances, were not taking medicine, or had first-degree relatives with a mental disorder. During the study, any current drug usage was assessed by the Alcohol Use Disorders Identification Test/Drug Use Disorders Identification Test. An expert

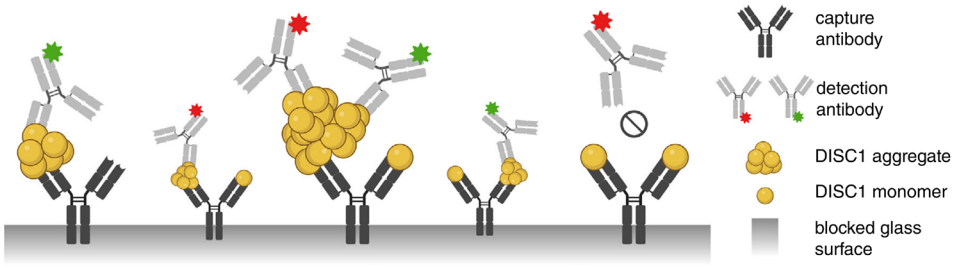


Fig. 1 Scheme of the surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) assay for the quantitation of disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) aggregates. The glass surface of a microtiter plate is coated with 14F2 antibodies directed against linear epitopes of DISC1 (aa 747–768). Afterwards, a human cerebrospinal fluid sample is incubated on the assay surface, with both monomeric and aggregated DISC1 immobilized by the capture antibodies. However, the fluorescently labeled detection antibodies (14F2 CF633 and 14F2 CF488A) can only detect aggregated DISC1 species because all assay antibodies bind to the same epitope. In case of monomeric DISC1, the epitope is occupied by the capture antibody, preventing binding of the probe antibody. Finally, the assay surface is imaged by dual-color total internal reflection fluorescence microscopy and only single particles with colocalized fluorescence signals on the well surface are counted by image-data analysis. *Created with BioRender.com*.

neuroradiologist at Karolinska University Hospital, Solna reviewed the MRI data at an MRI center, and just one participant had a structural anomaly on the MRI. This individual exhibited early demyelination, but it was inadequate for a multiple sclerosis diagnosis because no neurological symptoms had earlier been reported, and a clinical neurological test indicated normal results. Lumbar puncture and cognitive tests for HCs were performed within 37.4 ± 5.7 days (mean ± SEM).

CSF collection

For CSF collection, standard lumbar puncture methods were used. A disposable atraumatic needle (22G Sprotte, Pajunk GmbH Medizintechnologie) was placed at the L4–L5 level in all patients who were in the right decubitus position. CSF (18 mL) was allowed to drop into a plastic test tube protected from light. CSF supernatant from all patients was separated into 10 aliquots and frozen at −80°C within 1 h of collection after centrifugation (rotor 5810R, Eppendorf SE) at 3500 rpm (1438 g) for 10 min to separate cells and supernatant. The lumbar puncture was performed on the majority of individuals ($n = 76$; 33 patients with FEP and 43 HCs) between 7:45 AM and 10 AM following a night's sleep. Morning sampling was not achievable for the rest of the patients with FEP (n = 17) due to clinical routines. To account for this confounding effect, four healthy individuals likewise underwent lumbar puncture at the same time window (i.e. 10:30 AM and 1:15 PM). Participants were asked not to participate in physical activity for the prior 8 h, although their activity could not be monitored.

sFIDA analysis

Assay development and analytical validation were performed using artificial DISC1 aggregates, which were either DISC1-coated silica nanoparticles (SiNaPs) or synthetic DISC1 (598–785) aggregates[17] spiked into buffer showing femtomolar detection limits (6.08 fM LoD

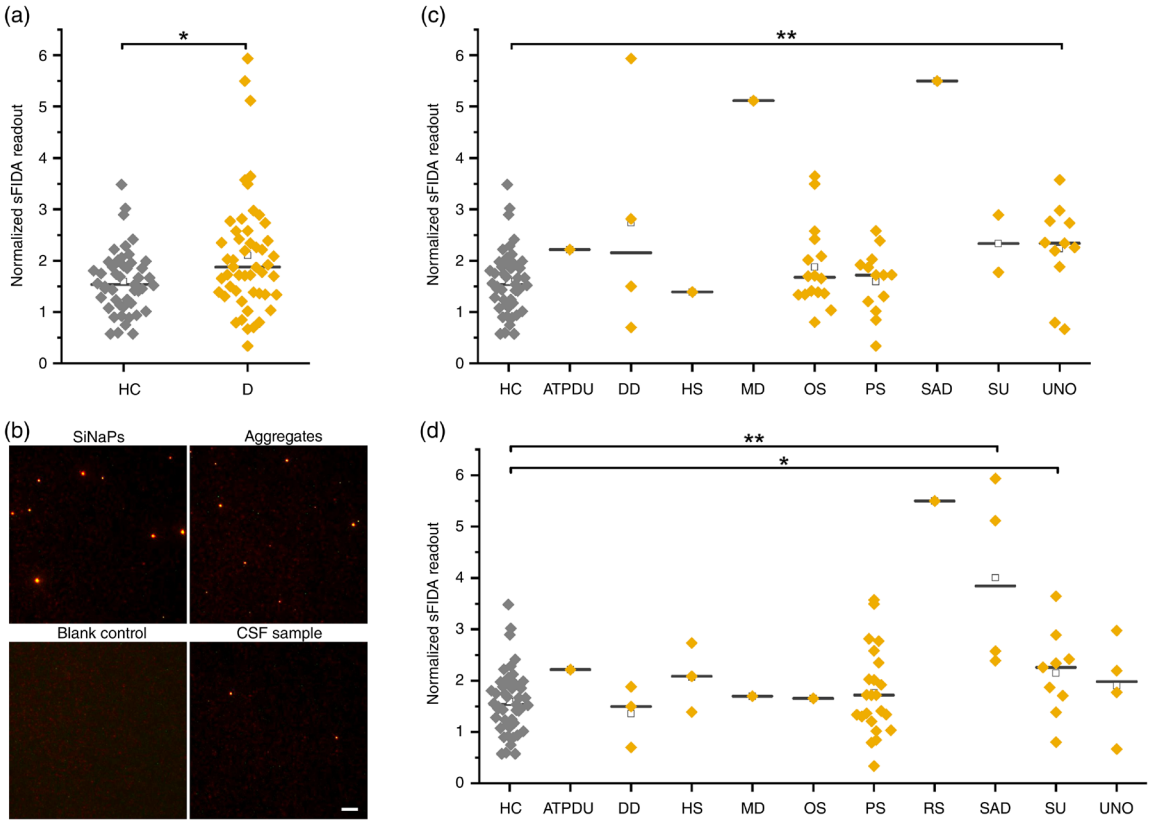


Fig. 2 Quantitation of disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) aggregates in cerebrospinal fluid (CSF) samples of patients with first-episode psychosis (FEP). (a) Scatter plot of normalized surface-based fluorescence intensity distribution analysis readouts for healthy controls (HCs; $n = 47$) and patients with FEP ($n = 50$). Statistical analysis was performed using two-sided Mann-Whitney *U* test (confidence interval [CI], 0.05), and significantly elevated DISC1 levels in FEP patient samples were determined, indicated by a *P*-value of 0.027. (b) Representative total internal reflection fluorescence microscopy images as a composition of channel 0 and channel 1 (with an excitation: 633 nm, emission: 705 nm [channel 0] and an excitation: 488 nm, emission: 525 nm [channel 1], both with an exposure time of 500 ms and gain of 800) of DISC1-coated SiNaPs (160 fM), synthetic DISC1 aggregates (32 fM, subunit concentration), blank control (blocking solution only), and human CSF sample (FEP patient sample). Scale bar: 20 µm. Samples were divided according to their diagnosis at baseline (c) or at follow-up (d) and examined for significant differences from HC samples using one-sided Mann-Whitney *U* test (CI, 0.05). Using the baseline diagnosis for grouping, significantly higher DISC1 levels were determined for unspecified nonorganic psychosis (UNO; 298.9; P=0.005) compared with the HC group. In contrast, using the follow-up diagnosis for grouping revealed significantly higher DISC1 levels for schizoaffective disorder (SAD; 295.70) (P=0.001) and schizophrenia, unspecified (SU; 295.9); (P=0.024) compared with the HC group. The line indicates the median and the square indicates the mean. Significant differences between cohorts were signed with *(*P = 0.01–0.05; **P = 0.001–0.01). ATPDU, acute and transient psychotic disorders, unspecified (all diagnoses are DSM-IV 298.8); DD, delusional disorders (297.1); HS, hebephrenic schizophrenia (295.10), MD, major depressive disorder (296.21); OS, other schizophrenia (295.40); PS, paranoid schizophrenia (295.30); RS, residual schizophrenia (295.60); sFIDA, surface-based fluorescence intensity distribution analysis; UNO, unspecified nonorganic psychosis (298.9).

14401819, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pcn.13594 by Cochrane Germany, Wiley Online Library on [09/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

PCN Psychiatry and Clinical Neurosciences

14401819, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pcn.13594 by Cochrane Germany, Wiley Online Library on [09/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

and 9.54 fM LLoQ) and low intra-assay variability (DISC1-coated SiNaPs 15.8%, synthetic DISC1 aggregates 7.9%) (Fig. S1), high assay comparability (differences <10%) (Fig. S2), and complete selectivity (~100%) (Fig. S3).

DISC1-coated SiNaPs, synthetic DISC1 aggregates, and a set of 97 CSF samples from patients with FEP ($n = 50$, 31 male, 19 females) and HCs ($n = 47$; 20 male, 27 females) enrolled in the Karolinska Schizophrenia Project were subjected to sFIDA analysis (Fig. 1). Patient and control samples were mixed and analyzed blinded to group allocation and to exclude any human bias. Patients who on follow-up did not receive a clinical diagnosis were excluded from the overall analysis. Due to the high number of assay points, the measurements were performed on three 384-well microtiter plates, and each sample was applied in quadruplicate. The assay surface was imaged *via* total internal reflection fluorescence microscopy as described above and for analysis a cutoff of 0.005% of blank control values was used to determine the sFIDA readouts. For assay calibration and as positive control, dilution series (see above) of DISC1-coated SiNaPs and synthetic DISC1 aggregates, respectively, were applied on each plate. However, since the sFIDA readouts of DISC1 aggregates in human CSF samples were close to buffer control readouts, not enough calibration points of SiNaPs were available to obtain a robust calibration and consequently only the noncalibrated sFIDA readout could be provided for the CSF samples. To account for measurement bias on multiple plates, samples were normalized using individual plate specific normalization factors based on the readouts of the HC group. For a detailed description of sFIDA development, normalizations, and further statistics, see Supplemental Methods and Table S1. Since normalized data showed non-normal distribution (Table S2), we used the two-sided Mann-Whitney *U* test for statistical computation

Table 1. Demographic information on CSF samples

Variable	All cohorts	HCs	Patients with FEP	Kruskal-Wallis ANOVA
Number	97	47	50	
Female, No. (%)	58 (59.8)	27 (57.4)	31 (62.0)	0.05652
Age (mean ± SEM)	28.52 ± 0.74	26.85 ± 0.78	30.08 ± 1.19	0.07229
BMI (mean ± SEM)	23.84 ± 0.38	24.23 ± 0.55	23.47 ± 0.53	0.44859
Nicotine, yes, No. (%)	20 (20.6)	7 (14.9)	13 (22.8)	0.16267
Medication, yes, No. (%)	29 (29.9)	0 (0)	29 (58)	5.52×10^{-10}

Note: Kruskal-Wallis analysis of variance (ANOVA): confidence interval, 0.05. Significant differences between both cohorts are in italics.

Table 2. Correlations of DISC1 aggregate levels with symptom levels and cognitive function

Test	Baseline		Follow-up	
	Spearman r	*P*-value	Spearman r	*P*-value
PANSS positive	−0.08	0.72	0.08	0.72
PANSS negative	−0.49	0.023	0.02	0.93
PANSS general	−0.01	0.95	0.34	0.15
PANSS total	−0.2	0.37	0.21	0.37
GAF-Symp	0.07	0.75	−0.17	0.49
GAF-Func	0.19	0.4	−0.02	0.93
CGI	−0.1	0.66	−0.08	0.73
TMT	−0.05	0.81	0.23	0.34
BACS-SC	0.56	0.008	0.06	0.81
HVLT-R	0.29	0.21	0.08	0.75
WMS-II-SS	0.09	0.69	0.31	0.18
LNS	0.29	0.21	0.11	0.64
NAB-Mazes	0.31	0.17	0.07	0.78
BVMT-R	0.29	0.19	0.13	0.58
Fluency	0.33	0.14	0.04	0.86
MSCEIT-ME	−0.13	0.58	0.09	0.69
CPT-IP	0.27	0.24	0.23	0.35

Note: No significant correlations (after false discovery rate corrections, not included in the table) between disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) levels in cerebrospinal fluid and the following variables[11–14] were observed. BACS-SC, Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia–Symbol Coding Test; BVMT-R, Brief Visuospatial Memory Test – Revised; CGI, Clinical Global Impression; CPT-IP, Continuous Performance Test–Identical Pairs; GAF-Symp, Global Assessment of Symptoms; GAF-Func, Global Assessment of Functioning; HVLT-R, Hopkins Verbal Learning Test—Revised; LNS, letter number sequencing; MSCEIT-ME, Mayer-Salovey-Caruso Emotional Intelligence Test's Managing Emotions Component; NAB-Mazes, Neuropsychological Assessment Battery–Mazes; PANSS, Positive and Negative Syndrome Scale; TMT, Trail Making Test; WMS-II-SS-R, Wechsler Memory Scale III Spatial Span.

Results

sFIDA analysis revealed that concentrations of aggregated DISC1 species were significantly increased in CSF samples of patients with FEP compared with HCs (P=0.026) (Fig. 2a). Representative total internal reflection fluorescence microscopy images of DISC1-coated SiNaPs, synthetic DISC1 aggregates, blank control, and a human CSF sample from a patient with FEP are shown in Fig. 2b.

Sex, body mass index, and nicotine usage were not significantly different between HCs and patients with FEP (demographic information, Table 1). The mean age ± SEM for HCs was 26.9 ± 0.8 years and for patients with FEP 30.1 ± 1.2 years. No significant correlations were evident between CSF DISC1 aggregate levels and age, body mass index, sex, smoking status, or medication (Tables S3 and S4).

We then looked at correlations of DISC1 protein aggregate levels with PANSS scores, GAF scale, CGI scale, as well as cognitive tests from the Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia (MATRICS) battery, but no significant result was obtained after false discovery rate correction (Table 2).

When we separated different subsets of patients, based on the clinical diagnosis at follow-up, assuming that DISC1 aggregate levels might be more elevated in some subsets rather than in others. A one-sided Mann-Whitney U test (confidence interval, 0.05) was used to reveal differences between the respective subsets and HCs (Fig. 2d, Table 3). Significantly higher CSF levels of aggregated DISC1 compared with controls were observed in SAD (DSM-IV 295.70 [P=0.001]) and SU (DSM-IV 295.9 [P=0.024]).

Next, we performed receiver operating characteristic analysis to quantify the diagnostic accuracy of the sFIDA assay for the detection of DISC1 aggregates in CSF samples (Fig. 3). While HC could be discriminated from all FEP samples with a specificity of 83.0% and a sensitivity of 46.0% with an area under the curve of 0.632 using sFIDA, the diagnostic validity, i.e. the diagnostic sensitivity, was improved using SAD and SU cases as a specific subset of FEP (specificity: 89.4%, sensitivity: 69.2% [area under the curve: 0.789]).

When we investigated both the segregation of a limited number of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) within the *DISC1* gene

Table 3. P-values of Mann-Whitney U test for comparison of observed sFIDA readouts of HC and FEP groups or subgroups according to their final clinical diagnosis after 18 months

HC vs	P-value
FEP groups	*0.0257*
ATPDU	-
DD	0.7094
HS	0.1181
MD	-
OS	-
PS	0.2911
RS	-
SAD	*0.0012*
SU	*0.0235*
UNO	0.1953

Note: Significant differences (P<0.05) between the first-episode psychosis (FEP) (sub)group and healthy controls (HCs) are in italics. For the comparison of HCs vs patients with FEP, two-sided Mann-Whitney U test was performed, and for the comparison of HCs vs each subgroup, one-sided Mann-Whitney U test was performed. No Mann-Whitney U test was performed for acute and transient psychotic disorder unspecified (ATPDU; DSM-IV 298.8), major depressive disorder (MD; DSM-IV 296.21), other schizophrenia (OS; DSM-IV 295.40), and residual schizophrenia (RS; DSM-IV 295.60) as only one value was available.
Abbreviations: DD, delusional disorders (DSM-IV 297.1); HS, hebephrenic schizophrenia (DSM-IV 295.10); PS, paranoid schizophrenia (DSM-IV 295.30); SAD, schizoaffective disorder (DSM-IV 295.70); sFIDA, surface-based fluorescence intensity distribution analysis; SU, schizophrenia, unspecified (DSM-IV 295.9); UNO, unspecified nonorganic psychosis (DSM-IV 298.9).

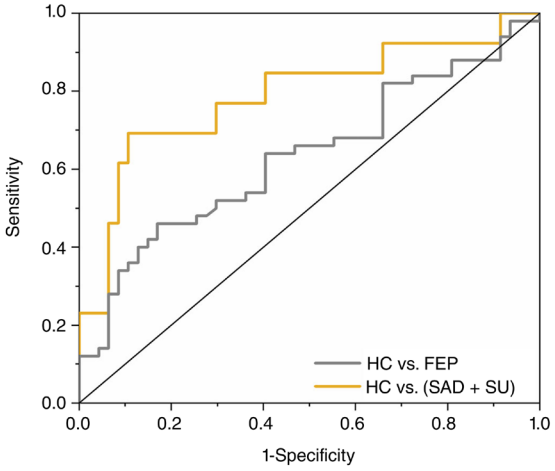


Fig. 3 Receiver operating characteristic analysis for the detection of disrupted-in-schizophrenia 1 aggregates in human cerebrospinal fluid samples. Discrimination of healthy controls (HCs) and patients with first-episode psychosis (FEP) showed a diagnostic specificity of 83% and a sensitivity of 46%, with an area under the curve of 0.632 and a respective P-value of 0.026 (gray line). In comparison, diagnostic validity was improved by including only patients with schizoaffective disorder (SAD; DSM-IV 295.70) and schizophrenia, unspecified (SU; DSM-IV 295.9) as a specific subset of FEP in the analysis. Patients with SAD and SU *versus* HCs showed a diagnostic specificity of 89.4% and a sensitivity of 69.2%, with an area under the curve of 0.789 and a respective P-value of 0.002 (yellow line).

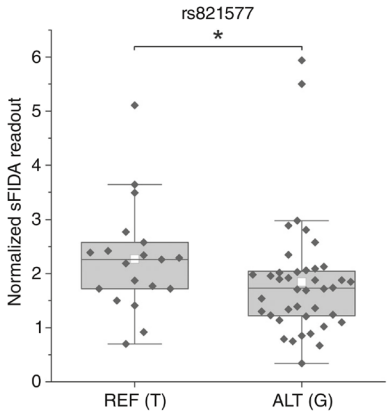


Fig. 4 Comparison of disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) oligomer levels for DISC1 single-nucleotide polymorphism rs821577 for all samples using two-tailed Mann-Whitney U test. ALT, alternative nucleotide; G, guanine; REF, reference nucleotide; sFIDA, surface-based fluorescence intensity distribution analysis; T, thymine. Confidence interval, 0.05 (*$P \leq 0.05$).

14401819, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pcn.13594 by Cochrane Germany, Wiley Online Library on [09/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

PCN Psychiatry and Clinical Neurosciences

with FEP (Table S5), as well as the DISC1 oligomer levels for DISC1 SNPs in all individuals (Table S6, Fig. 4), we noted that rs821577[18] stood out in being associated with both the FEP groups and higher DISC1 oligomer levels. Statistical significance of this result, however, was lost after correcting for repetitive analysis.

Discussion

We report the presence of DISC1 protein aggregates, or oligomers, in CSF of patients with FEP and controls and their elevation in patients with FEP compared with controls. To this end, such DISC1 aggregates were shown only in *post mortem* brains of patients with chronic mental illnesses, and as coaggregates in patients with Huntington disease[19] and frontotemporal dementia.[20] A limitation is that these protein aggregates were in the femtomolar range and require highly sensitive methods such as sFIDA which are able to count single protein aggregates. sFIDA has been previously developed to exploit pathological oligomers and aggregates as a biomarker for neurodegeneration.[12,14–16] sFIDA has the capacity to measure single particles through fluorescence imaging, thereby making it possible to determine the size of aggregates larger than ~200 nm. However, due to the constraints posed by diffraction-limited optics, it is not feasible to directly analyze the size distribution of subresolution particles, including small protein aggregates and oligomers. The scope of future work will be to introduce subresolution size standards, which can be used for particle sizing based on pixel intensity. Furthermore, at this point we cannot make statements regarding measuring truncated versus full-length DISC1 protein. The small amounts of protein present, as measured with our highly sensitive method, makes proteomic investigations in this direction difficult.

Since it is likely that different biological causes are summarized in the clinical diagnosis of psychosis, DISC1 aggregates may have higher diagnostic validity for specific subsets of FEP as shown in receiver operating characteristic analyses (Fig. 3). However, there was only a low number of cases of SAD, thus making the present results preliminary. Moreover, schizophrenia subtypes were shown to have low diagnostic reliability and validity, resulting in their removal in DSM-5. Nevertheless, the present results suggest that DISC1 aggregate-positive cases may be clinically rather atypical and could overlap with symptoms from affective disorders. Supporting DISC1 aggregate-positive cases as a possible diagnostic category not matching current clinical boundaries is also the absence of solid correlations to cognitive symptom measures (Table 2). Interestingly, phenotypic variability spanning from schizophrenia to affective disorders has also been reported in the Scottish pedigree with DISC1 mutations where the *DISC1* gene was discovered.[5] In that context it is noteworthy that *DISC1* SNP rs821577 has been associated with bipolar disorders,[18] has been reported to be in complex epistasis with other DISC1 SNPs,[18,21] and was significantly associated with the FEP groups as well as elevated DISC1 oligomers, even though statistical significance did not survive correction for multiple testing. The low number of cases limits the significance of genetic studies, and the low number of SAD cases within the FEP group limits our ability to draw robust conclusions regarding genetics from the present data set.

It is also noteworthy that from the initial diagnosis at baseline, only one clinical subset of patients featured significantly elevated DISC1 aggregate levels (UNO) (Fig. 2c, Table S7), but that in the more solid clinical diagnosis after 18 months, the clinical subsets of SAD and SU turned out to be significantly associated with elevated DISC1 aggregate levels. This was mainly due to some individuals who at baseline were diagnosed as having OS (DSM-IV 295.40), on follow-up instead fulfilled criteria for PS (DSM-IV 295.30, seven cases) and SU (DSM-IV 295.9, five cases), and SAD (DSM-IV 295.70, one case).

For 21 patients with FEP (11 male, 10 female) and 15 HCs (three male, 12 females) in the present study, CSF samples were obtained again after 18 months, allowing us to investigate longitudinal differences. However, for both HCs (P=0.074) and patients with FEP (P=0.487), no significant changes in DISC1 aggregate levels were detected by Wilcoxon rank test (Fig. 5), indicating that DISC1 aggregate levels seem to be stable over the medium term and thus representing a more stable phenotype.

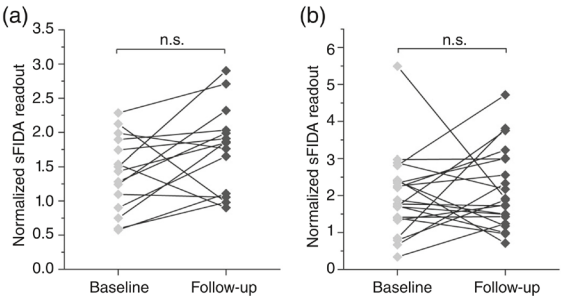


Fig. 5 Changes of disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) aggregate levels in cerebrospinal fluid (CSF) samples over time. Baseline (inpatient admission) and follow-up levels (reassessment) of DISC1 aggregate in CSF of 15 healthy controls (HCs; a) and 21 patients with first-episode psychosis (FEP; b) were investigated for significant changes by Wilcoxon rank sum test (confidence interval, 0.05). For both HC and diseased samples, no significant changes in biomarker levels were observed, as indicated by P-values of 0.074 (HC) and 0.487 (FEP). sFIDA, surface-based fluorescence intensity distribution analysis.

In summary, we demonstrate, to our knowledge for the first time, that DISC1 protein aggregates can be detected in CSF and that levels are increased in patients with FEP. Increases were seen specifically in the subsets of SU or SAD, warranting more extensive, further studies, in conjunction with comprehensive genetic studies. The existence of a subset of patients with psychosis featuring high DISC1 aggregate levels, previously termed DISC1opathies,[22] strengthens the notion that this brain proteinopathy represents a novel pathogenic mechanism independent of familial or common genetic traits, and highlights DISC1 protein aggregates as a candidate biomarker for phenotypic characterization in FEP.

Author contributions

CK conceived the project. MP, ST, and JR developed the assay. MP designed and performed the experiments and validation studies and analyzed the sFIDA data. CSM and SC coordinated recruitment and clinical characterization of the patients. FP coordinated and performed the lumbar punctures. MP wrote the manuscript in consultation with OB, SE, FE, and CK. OB, SE, GE, SC, CS, DW, and CK supervised the project. All authors discussed the results and provided critical feedback.

Acknowledgments

We thank Volker Nischwitz (Central Institute for Engineering, Electronics and Analytics, Analytics (ZEA-3), Forschungszentrum Jülich, 52428, Jülich, Germany) for determination of silicon concentration of the used DISC1-coated SiNaPs by ICP-MS. CK was supported by a grant from the DFG 1679/14-1. The study was further supported by the Swedish Research Council (grant No. 523-2014-3467 (SC), Erling Persson Foundation (CMS), Vetenskapsrådet 2021-02251_VR (SE), 523-2014-3467 (SE), 2019-01452_VR (GE), Karolinska Institutet and Stockholm County Council (20160328, 20180487 [SC], (20190175) [SE], 20190447 [CMS]). Development of the sFIDA technology was supported by the programs Biomarkers Across Neurodegenerative Diseases I + II of The Alzheimer's Association, Alzheimer's Research UK, and the Weston Brain Institute (11084 and BAND-19-614337). We are also grateful for support from The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research (14977, 009889), the ALS Association, and the Packard Center (19-SI-476). Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

14401819, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pcn.13594 by Cochrane Germany, Wiley Online Library on [09/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Disclosure statement

The authors declare no competing nonfinancial interests but the following competing financial interests: DW and OB are shareholders of attyloid GmbH. FP has received gratuities for expertise testimony from Novartis, and has advised Chugai, Lundbeck and Roche. All other authors declare no competing financial interests related to this work.

Ethics statement

Ethical approval for the study was granted by the regional ethics committee in Stockholm (2010/879–31-1 with amendments).

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions. For image data analysis, we used the sFIDAta software tool, which can be made available on request from the corresponding author.

References

1. Trubetskoy VPA, Qi T, Pardiñas AF *et al.* Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia. *Nature* 2022; **604**: 502–508.
2. Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 2002; **296**: 1991–1995.
3. Bradshaw NJ, Korth C. Protein misassembly and aggregation as potential convergence points for non-genetic causes of chronic mental illness. *Mol. Psychiatry* 2019; **24**: 936–951.
4. Hui KK, Endo R, Sawa A, Tanaka M. A perspective on the potential involvement of impaired Proteostasis in neuropsychiatric disorders. *Biol. Psychiatry* 2022; **91**: 335–345.
5. Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S *et al.* Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.* 2000; **9**: 1415–1423.
6. Mathieson I, Munafo MR, Flint J. Meta-analysis indicates that common variants at the DISC1 locus are not associated with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 2011; **16**: 1–8.
7. Ishizuka K, Kamiya A, Oh EC *et al.* DISC1-dependent switch from progenitor proliferation to migration in the developing cortex. *Nature* 2011; **473**: 92–96.
8. Leliveld SR, Bader V, Hendriks P *et al.* Insolubility of disrupted-in-schizophrenia 1 disrupts oligomer-dependent interactions with nuclear distribution element 1 and is associated with sporadic mental disease. *J. Neurosci.* 2008; **28**: 3839–3845.
9. Cukkemane A, Becker N, Zielinski M *et al.* Conformational heterogeneity coupled with β-fibril formation of a scaffold protein involved in chronic mental illnesses. *Transl. Psychiatry* 2021; **11**: 639.
10. Ottis P, Bader V, Trossbach S *et al.* Convergence of two independent mental disease genes on the protein level: Recruitment of dysbindin to cell invasive DISC1 aggresomes. *Biol. Psychiatry* 2011; **70**: 604–610.
11. Trossbach SV, Bader V, Hecher L *et al.* Misassembly of full-length disrupted-in-schizophrenia 1 protein is linked to altered dopamine homeostasis and behavioral deficits. *Mol. Psychiatry* 2016; **21**: 1561–1572.
12. Kulawik A, Heise H, Zafiu C, Willbold D. Advancements of the sFIDA method for oligomer-based diagnostics of neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 2018; **592**: 516–534.
13. Herrmann Y, Kulawik A, Kühbach K *et al.* sFIDA automation yields sub-femtomolar limit of detection for Aβ aggregates in body fluids. *Clin. Biochem.* 2017; **50**: 244–247.
14. Blömeke L, Pils M, Kraemer-Schulien V *et al.* Quantitative detection of α-Synuclein and tau oligomers and other aggregates by digital single particle counting. *NPJ Parkinsons Dis.* 2022; **8**: 68.
15. Schaffrath A, Schleyken S, Seger A *et al.* Patients with isolated REM-sleep behavior disorder have elevated levels of alpha-synuclein aggregates in stool. *NPJ Parkinsons Dis* 2023; **9**: 14.
16. Kass B, Schemmert S, Zafiu C *et al.* Aβ oligomer concentration in mouse and human brain and its drug-induced reduction ex vivo. *Cell Rep Med* 2022; **3**: 3.
17. Leliveld SR, Hendriks P, Michel M *et al.* Oligomer assembly of the C-terminal DISC1 domain (640-854) is controlled by self-association motifs and disease-associated polymorphism S704C. *Biochemistry* 2009; **48**: 7746–7755.
18. Hennah W, Thomson P, McQuillin A *et al.* DISC1 association, heterogeneity and interplay in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* 2009; **14**: 865–873.
19. Tanaka M, Ishizuka K, Nekooki-Machida Y *et al.* Aggregation of scaffolding protein DISC1 dysregulates phosphodiesterase 4 in Huntington's disease. *J. Clin. Invest.* 2017; **127**: 1438–1450.
20. Endo R, Takashima N, Nekooki-Machida Y *et al.* TAR DNA-binding protein 43 and disrupted in schizophrenia 1 Coaggregation disrupts dendritic local translation and mental function in frontotemporal lobar degeneration. *Biol. Psychiatry* 2018; **84**: 509–521.
21. Schumacher J, Laje G, Jamra RA *et al.* The DISC locus and schizophrenia: Evidence from an association study in a central European sample and from a meta-analysis across different European populations. *Hum. Mol. Genet.* 2009; **18**: 2719–2727.
22. Korth C. Aggregated proteins in schizophrenia and other chronic mental diseases: DISC1opathies. *Prion* 2012; **6**: 134–141.

Supporting Information

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

14401819, 0, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pcn.13594 by Cochrane Germany, Wiley Online Library on [09/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

4.8 *Ex-vivo* Target Engagement

Aβ oligomer concentration in mouse and human brain and its drug-induced reduction ex vivo

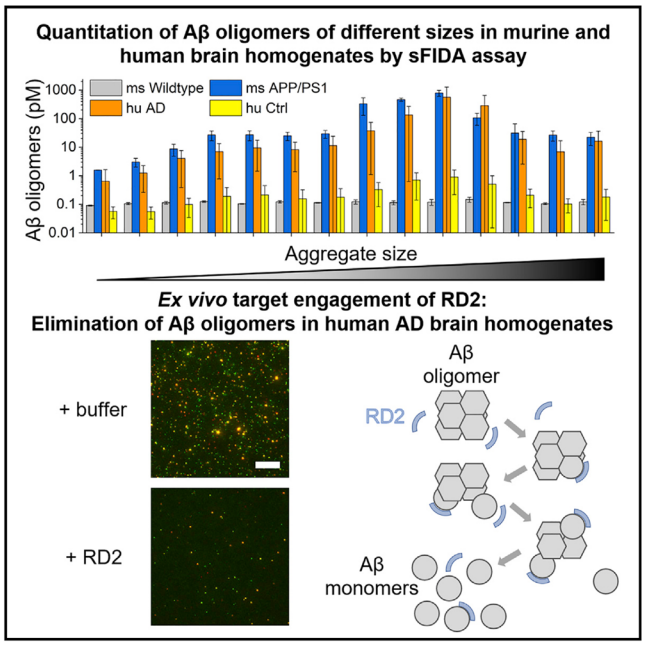
Autoren	Bettina Kass, Sarah Schemmert, Christian Zafiu, **Marlene Pils**, Oliver Bannach, Janine Kutzsche, Tuyen Bujnicki, Dieter Willbold
Publiziert in	**Cell Rep Med. 17;3(5) (Mai 2022)** Impact-Faktor: 16,988 (2021) DOI: 10.1016/j.xcrm.2022.100630
Beitrag	**Eigener Anteil 5%** ▪ Weiterentwicklung der sFIDA-Technologie sowie der verwendeten Oberflächenchemie ▪ Unterstützung beim Verfassen und Korrigieren des Manuskripts
Druckgenehmigung	siehe Anhang 27

Cell Reports
Medicine

Article

Aβ oligomer concentration in mouse and human brain and its drug-induced reduction *ex vivo*

Graphical abstract



Highlights

- Quantitation of Aβ oligomers in murine and human brain homogenates by sFIDA assay
- Native Aβ oligomers from human AD brain homogenates are eliminated *ex vivo* by RD2
- Oligomer disassembly into monomers is incubation-time- and RD2-dose-dependent

Authors

Bettina Kass, Sarah Schemmert, Christian Zafiu, ..., Janine Kutzsche, Tuyen Bujnicki, Dieter Willbold

Correspondence

d.willbold@fz-juelich.de

In brief

Eliminating amyloid beta (Aβ) oligomers is a promising strategy for therapeutic drug development of Alzheimer's disease (AD). Here, Kass et al. quantitate Aβ oligomers in brain homogenates from various AD murine and human tissue samples and demonstrate the dose- and time-dependent disassembly of Aβ oligomers by the compound RD2.

Kass et al., 2022, Cell Reports Medicine *3*, 100630
May 17, 2022 © 2022 The Author(s).
https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100630

CellPress

Cell Reports Medicine

CellPress
OPEN ACCESS

Article

Aβ oligomer concentration in mouse and human brain and its drug-induced reduction *ex vivo*

Bettina Kass,[1] Sarah Schemmert,[1] Christian Zafiu,[1,3] Marlene Pils,[1,2,3] Oliver Bannach,[1,2,3] Janine Kutzsche,[1] Tuyen Bujnicki,[1] and Dieter Willbold[1,2,3,4,5,*]

[1]Institute of Biological Information Processing, Structural Biochemistry (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, Jülich 52428, Germany
[2]Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf 40225, Germany
[3]attyloid GmbH, Düsseldorf, 40225, Germany
[4]Priavoid GmbH, Düsseldorf, 40225, Germany
[5]Lead contact
*Correspondence: d.willbold@fz-juelich.de
https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100630

SUMMARY

The elimination of amyloid beta (Aβ) oligomers is a promising strategy for therapeutic drug development of Alzheimer's disease (AD). AD mouse models that develop Aβ pathology have been used to demonstrate *in vivo* efficacy of compounds that later failed in clinical development. Here, we analyze the concentration and size distribution of Aβ oligomers in different transgenic mouse models of AD and in human brain samples by surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA), a highly sensitive method for detecting and quantitating protein aggregates. We demonstrate dose- and time-dependent oligomer elimination by the compound RD2 in mouse and human AD brain homogenates as sources of native Aβ oligomers. Such *ex vivo* target engagement analyses with mouse- and human-brain-derived oligomers have the potential to enhance the translational value from pre-clinical proof-of-concept studies to clinical trials.

INTRODUCTION

For 2020, the number of worldwide dementia cases was estimated to exceed 50 million,[1] with Alzheimer's disease (AD) being responsible for 60%–80% of all cases of dementia.[2] The disease's pathology is characterized by plaques consisting of amyloid beta (Aβ) fibrils in the extracellular space, neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated tau protein fibrils inside neurons, and neurodegeneration. Still, no curative treatment of AD is available. There is agreement that by the time first cognitive symptoms become noticeable, the disease process has already been going on for decades.[3,4] Soluble oligomeric forms of Aβ are thought to be the most toxic species and have been described to be especially synapto- and neurotoxic.[5,6] Aβ oligomers are, therefore, a very attractive target for curative therapy approaches as well as for early diagnosis.

During the last years, we have developed compounds that are designed to stabilize Aβ monomers in their native, intrinsically disordered conformation. Thereby, the drug candidates destabilize Aβ oligomers and other Aβ assemblies and ultimately disassemble them directly into native Aβ monomers. In order to achieve this mode of action, we use all-D-enantiomeric peptides, which are known to be protease-resistant[7] and non-immunogenic.[8,9] The lead compound, D3, was selected by mirror-image phage display[10] and was shown to reduce Aβ aggregation and neuroinflammation and to improve cognition in a mouse model of AD even when applied orally.[11,12] Since then, numerous derivatives of D3 have been developed in order to optimize its binding properties and pharmacokinetic properties.[13–15] The most promising and clinically most advanced candidate is RD2. It is well characterized in terms of binding mode, target engagement, efficiency,[16–18] and pharmacokinetics.[19] Oral treatment with RD2 improved cognition in different mouse models of AD,[18,20] even in old-aged mice with full-blown pathology.[21] In the latter study[21], we demonstrated that RD2 treatment significantly reduced the concentration of Aβ oligomers, as measured by surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) in brain homogenates.

sFIDA realizes absolute specificity for Aβ aggregates over Aβ monomers. It achieves single aggregate particle sensitivity by combining the biochemical principle of a sandwich-ELISA with the readout of fluorescence intensity per pixel as obtained from fluorescence microscopy. Originally developed for the detection of prion protein aggregates,[22] sFIDA has been adapted for the quantitation of Aβ oligomers in cerebrospinal fluid (CSF)[23] and blood[24] and is in further development as a general tool for quantitating all possible protein aggregates.[25] sFIDA is specific for aggregates by using capture and detection antibodies that recognize overlapping or identical epitopes of the aggregated protein of interest. Mostly, two different fluorescence-labeled detection antibodies are used, and total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy images are recorded in both channels directly at the glass surface, providing superior single particle sensitivity compared with the ensemble signal used in ELISA-type assays. Only pixels above a certain intensity threshold that are co-localized in both channels are counted



This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

CellPress
OPEN ACCESS

Cell Reports Medicine
Article

(indicated as sFIDA readout), thereby ruling out possible unspecific signal of any of the used antibodies. Based on the sFIDA readout, concentrations can be calculated using a calibration standard, such as silica nanoparticles (SiNaPs) of a defined size, covalently coated with the capture and detection antibody-relevant epitopes.[26,27]

Here, we set out to characterize the amounts and the size distributions of Aβ oligomers in various amyloid-based animal models to compare them with each other and with human-brain-derived Aβ oligomers. Also, we demonstrate the usefulness of sFIDA to measure Aβ oligomer target engagement of the oligomer-eliminating compound RD2 in human brain homogenates. Such *ex vivo* target engagement based on patient-derived brain tissue (*ex vivo*) may well be suitable to enhance the translational value of pre-clinical *in vivo* experiments toward clinical trials.

RESULTS

Comparison of the concentrations of Aβ oligomers in density gradient centrifugation (DGC) fractions and in unfractionated brain homogenates from different mouse models of AD

Recently, sFIDA assay was adapted for quantitative detection of Aβ aggregates in complex matrices, such as brain homogenate, to demonstrate *in vivo* target engagement and validate the mechanism of action for RD2.[21] Brain homogenates were fractionated by density gradient centrifugation (DGC) prior to analysis by the sFIDA assay. In the current study, we analyzed specimens of three mouse models expressing different human APP variants based on human familial mutations in comparison with wild-type mice. Aβ oligomer concentrations were calculated based on SiNaP calibration standards and are displayed in Figure 1A as concentrations in undiluted brain homogenate or DGC-obtained fractions, resulting in an apparent concentration of 1 pM in unfractionated wild-type brain homogenate. The average sFIDA readout observed in wild-type DGC fractions barely exceeded that of the buffer control. The antibodies IC16 and Nab228 used in this assay are specific for human Aβ, which is absent in wild-type mice. This outcome matched the expectations for wild-type mice as a negative control. Wild types were, therefore, not included in the calculation of relative oligomer concentrations, shown in Figure 1B. Western blot analysis performed with antibody 6E10, which is also specific for human Aβ, also did not yield specific bands in wild-type DGC fractions, as displayed in Figure 1C.

In transgenic mouse samples, the highest Aβ oligomer titers were found in fractions 9 (APP_{SwDI}) or 10 (APP/PS1 and APP_{Lon}), with mean concentrations of up to 16.0 ± 9.7 pM in APP_{SwDI}, 790 ± 190 pM in APP/PS1, and 300 ± 150 pM in APP_{Lon} samples. Samples showed high inter-individual heterogeneity, and the respective peak fractions made up 26.6% ± 16.2% (APP_{SwDI}), 41.8% ± 9.9% (APP/PS1), or 30.3% ± 14.5% (APP_{Lon}) of all oligomers measured in DGC fractions of the respective mouse models Figure 1B. A local maximum was identified in all transgenic mouse models, covering fractions 4 and 5. The amounts of oligomers found in these two fractions together made up 13% (APP_{SwDI}), 2.8% (APP/PS1), and 6.9% (APP_{Lon}) of the total oligomer concentration. In this type of density gradient, calibrated with globular proteins, fractions 4 and 5 would correspond to a size of 66–150 kDa, and fractions 9 and 10 to a size of at least 400 kDa, respectively.[28] The overall distribution of total Aβ detected via western blot with antibody 6E10, shown in Figure 1C, was similar to the sFIDA results of the different mouse models. However, APP_{SwDI} Aβ bands were of equal or higher intensity than those of the other two mouse models, although the Aβ oligomer concentration measured by sFIDA in this mouse model was substantially lower. All three antibodies worked equally well in western blot (Figure S1), so major differences in the general detectability of denatured DI-Aβ by IC16 and Nab228 in comparison with 6E10 were ruled out as a possible reason for this observed difference. Recovery was calculated as the ratio of the total amount of oligomers measured by sFIDA assay in all fractions to the total amount of oligomers in the corresponding unfractionated homogenates. The respective recovery rates were 0.986 for APP_{SwDI}, 1.634 for APP/PS1, and 0.975 for APP_{Lon} samples. Overall, this shows that the chosen dilutions of 1:10 for DGC fractions and 1:100 for 10% brain homogenates were well suited for quantitation of oligomers in APP_{SwDI}, APP/PS1, and APP_{Lon} mice, while applying less diluted wild-type samples did not cause any artifacts. Small amounts of sample would therefore be sufficient to investigate *in vivo* target engagement of oligomer-eliminating compounds in several different mouse models, in a similar fashion to Schemmert et al.[21]

Notable differences of the concentration of Aβ oligomers between human AD samples and non-demented controls

The previously analyzed transgenic mouse models of AD play an important role in the development of therapeutic compounds that would ultimately be used in human patients. In order to mimic the clinical situation more accurately, we investigated the concentrations and size distributions of Aβ oligomers in *post mortem* brain homogenates of human AD patients as well as in age-matched, non-demented control subjects (NCs). Details of human brain donors can be found in Table 1. While the four NCs had similar oligomer concentrations, the AD samples showed large differences between each other, as indicated in Figures 2A and 2B. In general, the Aβ oligomer concentration in the NC group was more than 10-fold lower than the lowest oligomer concentration in the AD group but clearly exceeding the limit of detection (LOD) of 7.6 fM and lower limit of quantitation (LLOQ) of 9.7 fM With the exception of sample AD3, DGC fraction 10 contained the highest Aβ oligomer concentrations, ranging from 19.9 ± 3.8 pM (AD1) to 1820 ± 191 pM (AD6) and 0.9 ± 0.7 pM in NC samples. These oligomer particles, corresponding to a calibrated size of more than 450 kDa,[28] made up 33.9% ± 6.5% to 54.5% ± 5.7% in all AD samples, except for AD3, and 23.4% ± 1.8% in NC samples, as depicted in Figure 2C. In sample AD3, the highest oligomer concentration (50.3 ± 9.1 pM) was found in fraction 11 and a concentration of 42.7 ± 1.1 pM in fraction 10, which corresponded to 33.8% ± 6.1% and 28.6% ± 0.3% of all oligomers, respectively. Similar to the observations in transgenic mouse samples, local maxima were identified. A local maximum was found in fraction 5 in almost all

Cell Reports Medicine
Article

CellPress
OPEN ACCESS

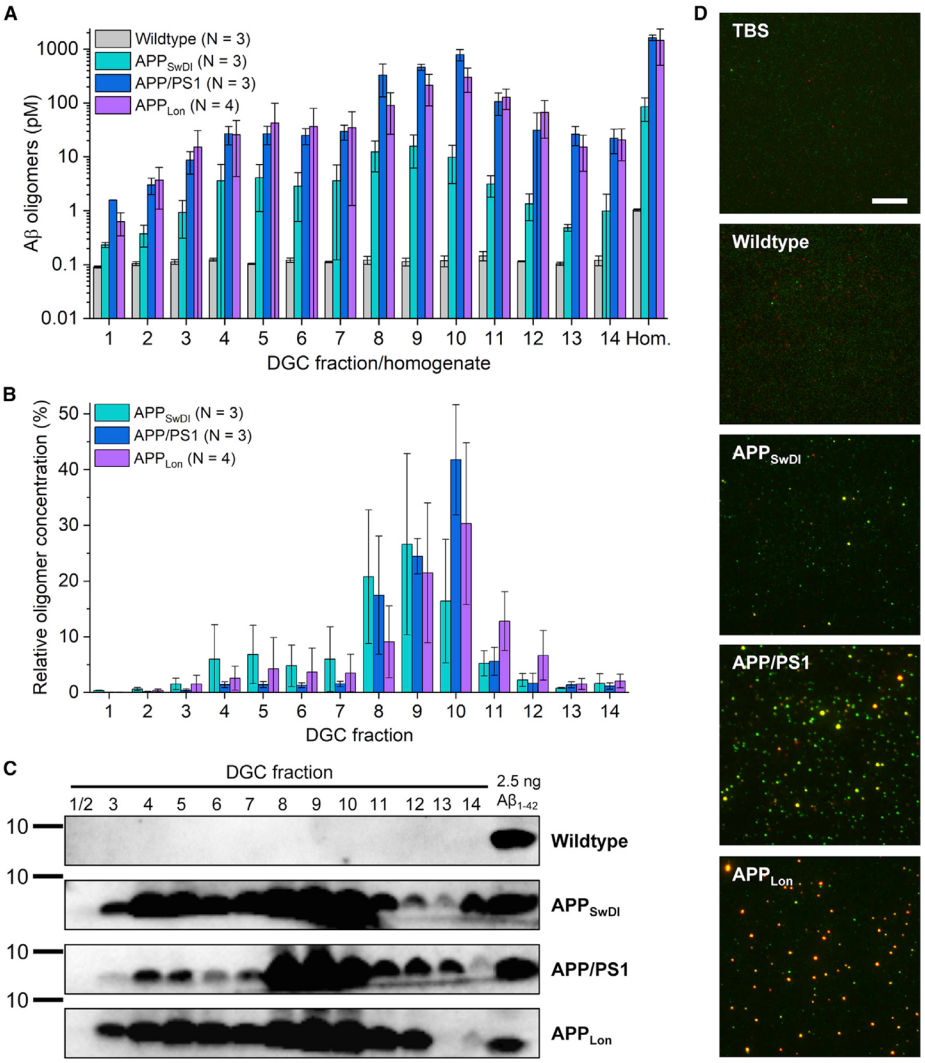


Figure 1. Comparison of the concentrations of Aβ oligomers in DGC-obtained fractions and in unfractionated brain homogenates of different mouse models of AD

(A) Overall distribution of different Aβ oligomers separated by DGC in different mouse models measured by sFIDA. Concentrations are displayed as they were present in DGC fractions or 10% brain homogenate (Hom.), respectively, before any dilution steps during the sFIDA experiments. Please note the logarithmic scale of the y axis.

(B) Relative concentration in percent of the total concentration of all fractions of oligomers in transgenic mouse samples. See Figure S1F for individual data points, referring to Figure 1B. Data in (A) and (B) are presented as mean ± SD of the indicated number (N) of animals.

(C) Western blot analysis of undiluted DGC fractions (12 μL per lane) of one representative animal per group in comparison with a synthetic $A\beta_{1-42}$ standard showing Aβ bands detected by monoclonal antibody 6E10. See also Figure S1 for full blots.

(D) Representative sections of TIRF images of brain homogenate samples from transgenic mice and from wild-type mice as well as from a buffer control. Final dilution factors of APP/PS1, APP_{Lon}, and APP_{SwDI} mouse brain homogenates were 1:200; wild-type mouse brain homogenates are shown at a final dilution of 1:20. Red and green fluorescence channels were merged, depicting co-localized (yellow) pixels used for calculating the oligomer concentration. The scale bar represents 10 μm.

CellPress
OPEN ACCESS

Cell Reports Medicine
Article

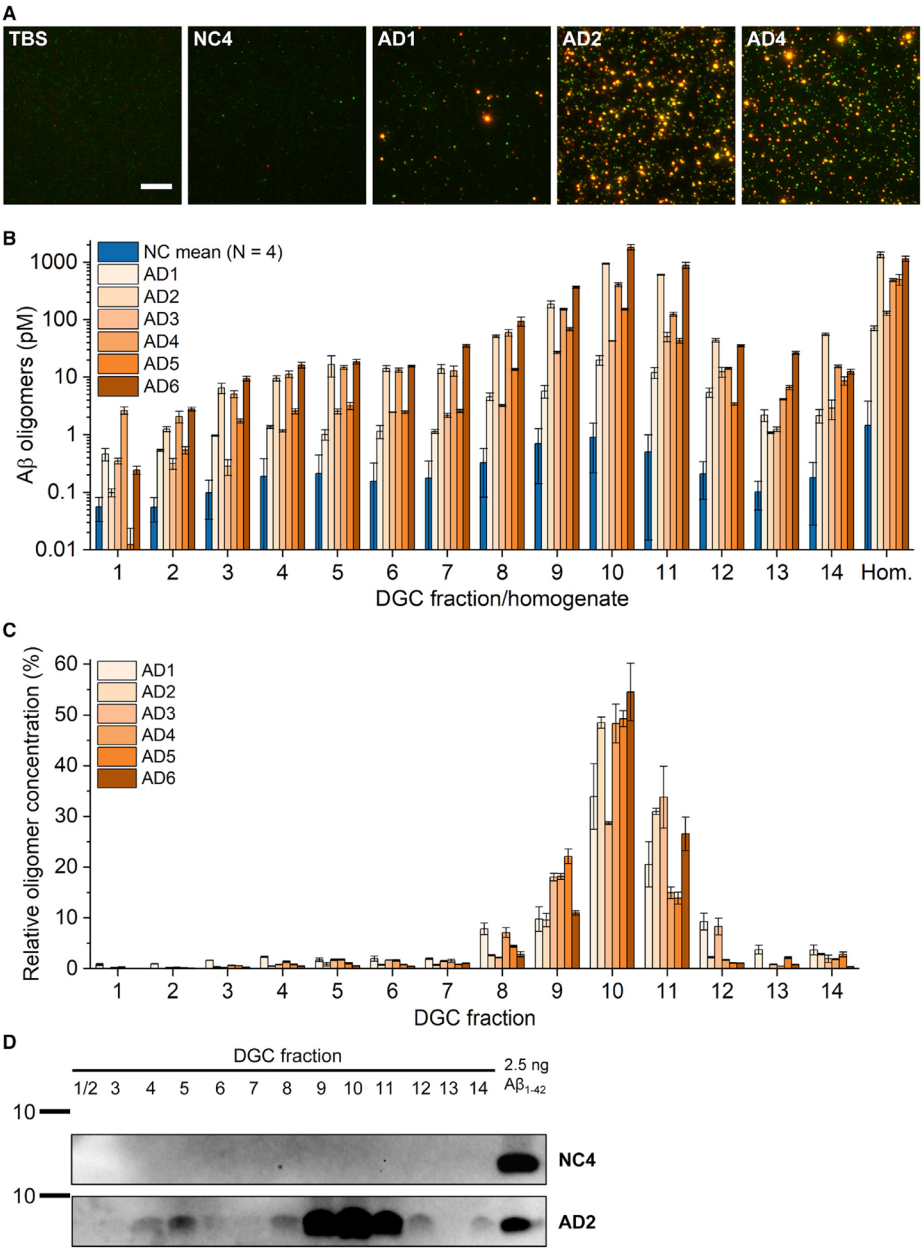


Figure 2. Notable differences of the concentration of Aβ oligomers between human AD samples and non-demented controls

(A) Representative sections of TIRF images of unfractionated human brain homogenates at a final dilution of 1:10. A merged image of red and green fluorescence channels is shown, depicting co-localized (yellow) pixels used for calculating the oligomer concentration. The scale bar represents 10 μm.

(B) Overall distribution of different Aβ oligomers separated by DGC measured by sFIDA. Concentrations are displayed as they were present in undiluted DGC fractions or 10% brain homogenate, respectively, before any dilution steps during the sFIDA experiments. Please note the logarithmic scale of the y axis.

(legend continued on next page)

Cell Reports Medicine
Article

CellPress
OPEN ACCESS

samples, AD1 being the only exception, with a local maximum in fraction 4. The size of these oligomers agrees well with the size of artificially prepared Aβ oligomers that have not yet elongated and do not contain other components besides Aβ.[28] The percentage of total oligomers found in the respective local maximum fraction was in the range of 0.6% ± 0.1% to 2.3% ± 0.1% for AD samples and 5.5% ± 0.6% for NC samples. In a corresponding western blot of total Aβ, no bands were detectable in the NC2 sample, with the distribution of total Aβ across the density gradient matching the sFIDA results for the AD4 sample (Figure 2D; uncropped western blot images can be found in Figure S2). Recovery rates were 1.15, 2.02, 1.61, 2.40, 0.86, and 4.06 for AD1 to AD6, respectively. Here, the sFIDA assay has demonstrated its usefulness to determine concentrations of Aβ oligomers, even in complex samples like brain homogenates with a wide range of oligomer particle sizes. While the diversity of oligomer concentrations found in human samples was much larger compared with transgenic mice, the overall size distribution was very similar to that of aged APP/PS1 mice. Recovery rates exceeding 1 by a larger margin could be due to underestimation of the oligomer concentration in unfractionated brain homogenates. This effect occurred mostly in the three AD samples with the highest oligomer concentration. As a consequence, greater dilution factors of unfractionated homogenate have been used in the following experiments to reduce the possible influence of other proteins and to avoid saturation effects, while still staying in the quantifiable, linear range of the assay.

Ex vivo treatment with RD2 results in a dose- and incubation-time-dependent reduction of Aβ oligomers derived from APP/PS1 mouse or human brain homogenate with RD2

The all-D-enantiomeric compound RD2 has been developed to stabilize Aβ monomers in their native conformation, thus destabilizing Aβ assemblies and ultimately disassembling them into Aβ monomers. RD2 has been shown to improve cognition in several AD mouse models,[18,20,21] and its oligomer-eliminating effect has been well characterized using synthetic Aβ.[17,18] RD2 did not display any toxic effects in mice or in cell cultures, indicating that the possible disruption of HMW oligomer species by RD2 did not produce smaller, toxic oligomer species but non-toxic monomers.[18,21] In a study conducted in APP/PS1 mice, a reduction of Aβ oligomer concentration was measured by the sFIDA assay in brain homogenates of RD2-treated mice, demonstrating *in vivo* target engagement and suggesting elimination of these oligomers by RD2.[21] That study showed that oligomers were significantly reduced in brain homogenates of APP/PS1 mice after oral treatment with RD2 in comparison with placebo. DGC fraction 10 contained the highest concentration of Aβ oligomers. We therefore first investigated the effect of RD2 on this isolated fraction 10 in an *ex vivo* approach. RD2 or buffer was added to 1:2 diluted fraction 10 of APP/PS1 mouse brain homogenate, and samples were drawn after the indicated incubation times. In cases of "0 min" incubation time, samples were mixed and immediately flash-frozen. As shown in Figure 3, RD2 was able to reduce the concentration of oligomers in a dose- and time-dependent manner. After the maximum incubation time of 20 h, an 81% reduction of oligomers was achieved with 50 μM, and 67% reduction was observed with 20 μM. The incubation time dependence clearly indicates that the RD2 dose dependence of oligomer reduction is not due to competition with the detection antibodies. A slight effect could also be seen with 10 μM RD2, yielding a reduction of about 8% after 20 h, but this change was not statistically significant. It must be noted that samples incubated with 20 and 50 μM RD2 showed a remarkably reduced oligomer concentration even without additional incubation time (Figure 3B, 0 min): the baseline oligomer concentration of the sample incubated with buffer was 88 ± 6 pM, whereas samples with the addition of 20 or 50 μM RD2 had Aβ oligomer concentrations of 48 ± 3 pM and 36 ± 2 pM, respectively. A possible explanation could be an ongoing reaction of RD2 with oligomers during sample incubation on the capture surface, thereby prolonging the effective reaction time by about 2 h. Another possible explanation would be that the initial elimination of oligomers is a fast process and that the delay of several minutes during the sample preparation steps due to freezing and thawing the samples before analysis would make observation of a true baseline value difficult. To address these questions and in order to rule out any delays during sample preparation, freeze-thaw cycles were omitted in further experiments involving short incubation times and 0 min marks. The dose-dependent reduction of Aβ oligomers from APP/PS1 mouse brain strongly suggests successful *ex vivo* target engagement of RD2.

Next, we wanted to investigate whether RD2 shows similar *ex vivo* target engagement on Aβ oligomers in brain homogenates derived from AD patients. Based on the aforementioned sFIDA analysis of several human brain homogenates (Figure 2), homogenate sample AD2 was chosen for further analysis, because this sample had one of the largest quantities of Aβ aggregates, allowing robust detection of signal across a range of dilutions, even considering the possible drastic reduction of sFIDA signal by the addition of RD2. The 10% homogenate sample was serially diluted before being incubated with different concentrations of RD2, ranging from 0.31 to 20 μM. In addition to buffer as a negative control, we chose another all-D-enantiomeric compound of similar size, D1, as a negative control peptide. D1 was originally selected for binding Aβ fibrils, but not for specific elimination of oligomers,[29] and was further developed as a positron emission tomography (PET) tracer rather than a therapeutic compound.[30–32] After an incubation time of 24 h, samples were subjected to sFIDA assay, and concentrations were calculated with SiNaP standards. Refer to Figure S3A for representative TIRF images. The 1:10 diluted brain homogenate that was incubated only with buffer, shown in Figure 4A, had a concentration of 47.1 ± 20.0 pM Aβ oligomers. Samples incubated with D1 showed an

(C) Relative concentration in percent of the total concentration of all fractions of oligomers in human brain homogenates fractionated by DGC. Data in (B) and (C) are presented as mean ± SD AD samples (N = 6, separately shown for each AD sample): N = 3 (technical replicates); NC samples: N = 4 (biological replicates). (D) Exemplary western blot analysis of undiluted DGC fractions (12 μL per lane) in comparison with a synthetic $Aβ_{1-42}$ standard showing Aβ bands detected by monoclonal antibody 6E10. Marker bands indicate 10 kDa. See also Figure S2 for full blots.

CellPress
OPEN ACCESS

Cell Reports Medicine
Article

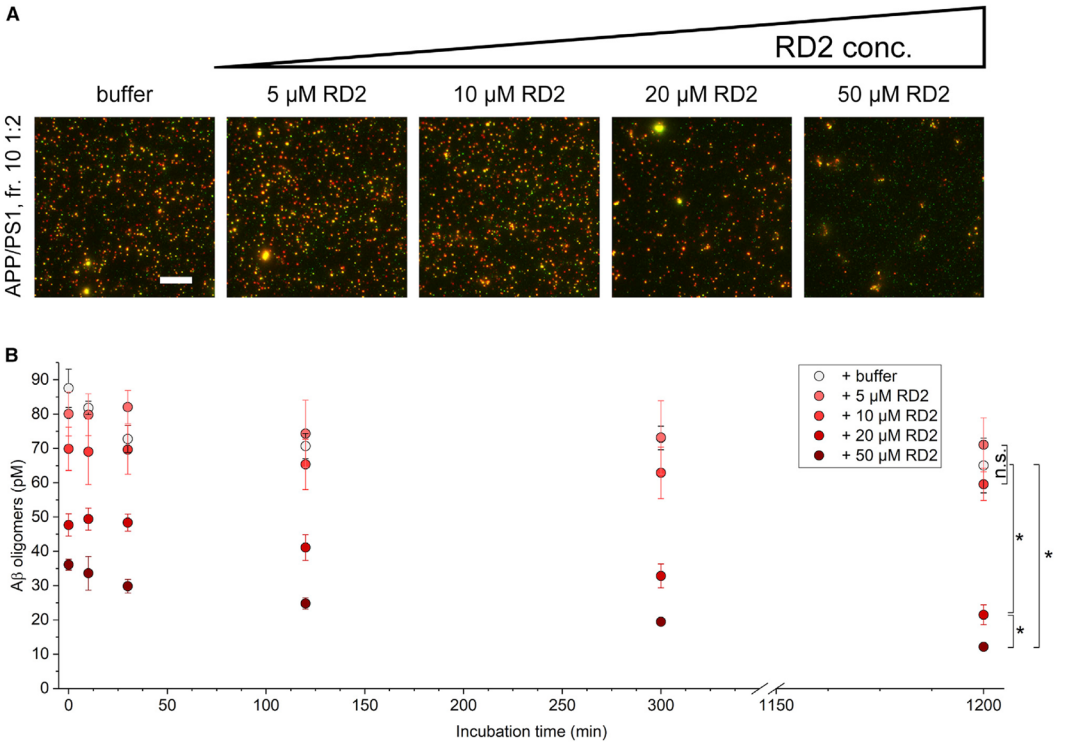


Figure 3. Dose- and incubation-time-dependent effect of RD2 on fractionated APP/PS1 mouse brain homogenate

DGC fraction 10 of APP/PS1 mouse brain homogenate, representing the peak of sFIDA signal, was diluted 1:2 and was incubated with 0, 5, 10, 20, or 50 μM RD2. Before analysis, samples were further diluted 1:5, resulting in a total dilution of 1:10, and the Aβ oligomer concentration was immediately analyzed by sFIDA assay. The final dilution factor during image acquisition was 1:20.

(A) Sections of representative TIRF images after 20 h of incubation. Red and green fluorescence channels were merged. The scale bar represents 10 μm.

(B) Aβ oligomer concentrations present in the original 1:2 diluted sample. Concentrations given here reflect the actual concentrations in the prepared sample after dilution and are not directly related to the concentrations in undiluted samples, shown in Figure 1.

Data are presented as mean ± SD *between groups, $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks with Student-Newman-Keuls *post hoc* analysis). N = 3 (technical replicates).

overall reduced concentration of 30.2 ± 4.1 pM to 37.1 ± 3.7 pM, but no dose-dependent effect was observed. The same could be observed for the three lowest concentrations of RD2. The addition of 20 μM RD2 resulted in a drastic, significant reduction of the Aβ oligomer concentration down to 3.3 ± 0.4 pM, corresponding to a reduction by 93% compared with the buffer control. The Aβ oligomer concentration in 1:20 diluted homogenate was 12.8 ± 1.8 pM in the sample incubated with buffer (Figure 4B). Addition of D1 of any concentration or of 0.31 and 1.25 μM RD2 resulted in a similar reduction as observed in the 1:10 diluted homogenate sample, with no significant dose-dependent effect. Effects of 5 and 20 μM RD2 were distinct, with a reduction of oligomers to 4.9 ± 1.0 pM (61%) and 0.6 ± 0.1 pM (95%), respectively. The results for 1:40 diluted brain homogenate are shown in Figure 4C: after 24 h incubation with 5 and 20 μM RD2, the concentration of Aβ oligomers was reduced to 0.7 ± 0.1 pM (84%) and 0.2 ± 0.04 pM (96%) from 4.1 ± 1.1 pM. A tendency of oligomer reduction was also observed with 0.31 and 1.25 μM RD2, with a reduction to 2.7 ± 0.1 pM (36%) and 2.1 ± 0.1 pM (50%), respectively, of which only 1.25 μM RD2 caused an oligomer reduction that was significantly different from that observed with all concentrations of the control peptide D1. Different degrees of signal reduction were observed with the control peptide D1, ranging from 4% to 27% with no evidence of a dose-effect. Despite a certain reduction of Aβ oligomers in D1-treated samples, this effect was not dose-dependent, leading to the conclusion that only RD2 showed a specific reduction effect on Aβ oligomers in human AD brain homogenate.

Time- and dose-dependent elimination of oligomers in human brain homogenate by RD2 but not by control D-peptides D1 and QB37

To gain more insight into the dynamics of the *ex vivo* target engagement of RD2 in human AD brain homogenate, we

Cell Reports Medicine
Article

CellPress
OPEN ACCESS

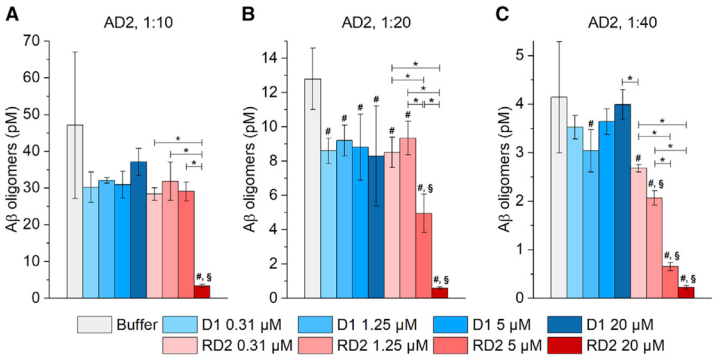


Figure 4. Dose-dependent reduction of Aβ oligomer concentration in human brain homogenate incubated with RD2

Human AD brain homogenate (sample AD2) was diluted 1:10, 1:20, or 1:40 and was incubated with 0.31, 1.25, 5, or 20 μM (factor of four dilution scheme) of D-peptides RD2 or D1 for one day (24 h).

(A–C) D1 was used as a control peptide. Samples were measured by (aggregate-specific) sFIDA assay, and the concentration of Aβ oligomers was calculated based on SiNaP standards. Results for dilutions of 1:10, 1:20, and 1:40 are displayed in (A), (B), and (C), respectively. Concentrations given here reflect the actual concentrations in the prepared sample after dilution and are not directly related to the concentrations in undiluted samples, shown in Figure 2. Data are presented as mean ± SD N = 3 (technical replicates) *between groups, $p < 0.05$; #versus buffer, $p < 0.05$; §versus all concentrations of D1, $p < 0.05$ (one-way ANOVA with Student-Newman-Keuls *post hoc* analysis). The corresponding representative TIRF images are found in Figure S3.

monitored the Aβ oligomer concentration in diluted homogenates from four different AD patients with incubation times ranging from 0 to 23 h. These samples were chosen because of their high concentration of Aβ oligomers, as determined previously, to allow monitoring of changes over a wide signal range. In addition to the previously tested peptide D1, QB37 was added as an additional control D-peptide of similar size to RD2 and D1. The homogenate was used at a dilution of 1:20; both control peptides were used at a concentration of 20 μM; and RD2 concentrations were 1.25, 5, and 20 μM. Figures 5A, 5C, 5E, and 5G show baseline concentrations measured by sFIDA assay after 0 min incubation time and endpoint concentrations after 1,365 min (AD2); 1,3,57 min (AD4 and AD5); or 1,425 min (AD6) of incubation; for representative TIRF images of samples AD2 and AD6 at their endpoints, see Figure S3B. At baseline, none of the peptides, including RD2, caused a reduction of Aβ oligomers in comparison with the buffer controls. The design of sFIDA assay includes an incubation time of at least 1.5 h after the indicated pre-incubation times. Without any pre-incubation time (0 min), no sFIDA signal reduction was observed. This indicates that the signal reduction observed after longer incubation times was attributed to the reaction of the Aβ oligomers with RD2 but that no additional reaction took place once the oligomers were captured on the sFIDA plate. After approximately 23 h of incubation, samples incubated with 5 and 20 μM RD2 showed a significant decrease in oligomer concentration to 1.0 ± 0.3 pM (57% decrease) and 0.1 ± 0.1 pM (93%) for AD2, 0.41 ± 0.03 pM (81%) and 0.19 ± 0.03 pM (91%) for AD4, 0.44 ± 0.05 pM (73%) and 0.18 ± 0.02 pM (89%) for AD5, or 3.6 ± 0.4 pM (64%) and 1.0 ± 0.2 pM (90%) for AD6 compared with the buffer control. Results for additional incubation times of these two RD2 concentrations are shown in Figures 5B, 5D, 5E, and 5H, demonstrating a rapid decrease of oligomer concentration within the first 40 to 50 min of the reaction with 20 μM RD2, followed by a considerably slower further reduction of the oligomer concentration in the following hours. In order to describe our observations using a global kinetic fit based on a pseudo-first-order reaction, a double exponential decay function was used, essentially reflecting a combination of two reactions taking place at different rates. Importantly, a threshold concentration of RD2 was assumed for these calculations, because an effect was observed only with a dose of 5 μM but not with 1.25 μM RD2 or lower. Due to possible binding of RD2 to various other components of brain homogenate, the effective RD2 concentrations were expected to be considerably smaller than the total concentration. The global fits shown in Figures 5B, 5D, 5F, and 5H are therefore based on a threshold concentration of 4 μM, meaning that the remaining effective RD2 concentrations were 1 and 16 μM instead of 5 and 20 μM, respectively. Reaction rate constants $k_{1,fast}$ of 2,329; 2,928; 2,374; and 1,275 $L^*mol^{-1}*min^{-1}$ were calculated for AD2, AD4, AD5, and AD6, respectively. The reaction rate constants $k_{1,slow}$ were 76, 37, 50, and 48 $L^*mol^{-1}*min^{-1}$ for AD2, AD4, AD5, and AD6. Similar to our previous observation, shown in Figure 4, with samples from AD2, three of the samples showed a reduction of Aβ oligomers with 20 μM D1 as well. The effect was much weaker than with 5 μM RD2 and is most likely not specific, due to the absence of a dose-dependent effect, as stated before (Figure 4).

Effect of RD2 on different DGC fractions of human brain homogenate

Fractions 5 and 10 of AD brain homogenate were identified as local and total Aβ oligomer concentration peak fractions, indicating distinct sizes and possibly different types of aggregates. To investigate the effect of RD2 on these fractions while staying in the quantifiable concentration range of the assay, fraction 10 was diluted 1:10, and fractions 4 to 6 were pooled with no further dilution. While fractions 4 to 6 would possibly represent oligomers with sizes similar to that of synthetic Aβ oligomers in absence of other proteins, in fraction 10, larger Aβ assembly species are present that possibly also consist of additional proteins and form co-aggregates. Fraction 10 was of particular interest because the reduction of oligomers found in this fraction correlated with improved cognition in transgenic mice treated with RD2.[21] For incubation with fraction 10, RD2 was used at 5 and 20 μM, and pooled fractions 4 to 6 were incubated with 20 μM

CellPress
OPEN ACCESS

Cell Reports Medicine
Article

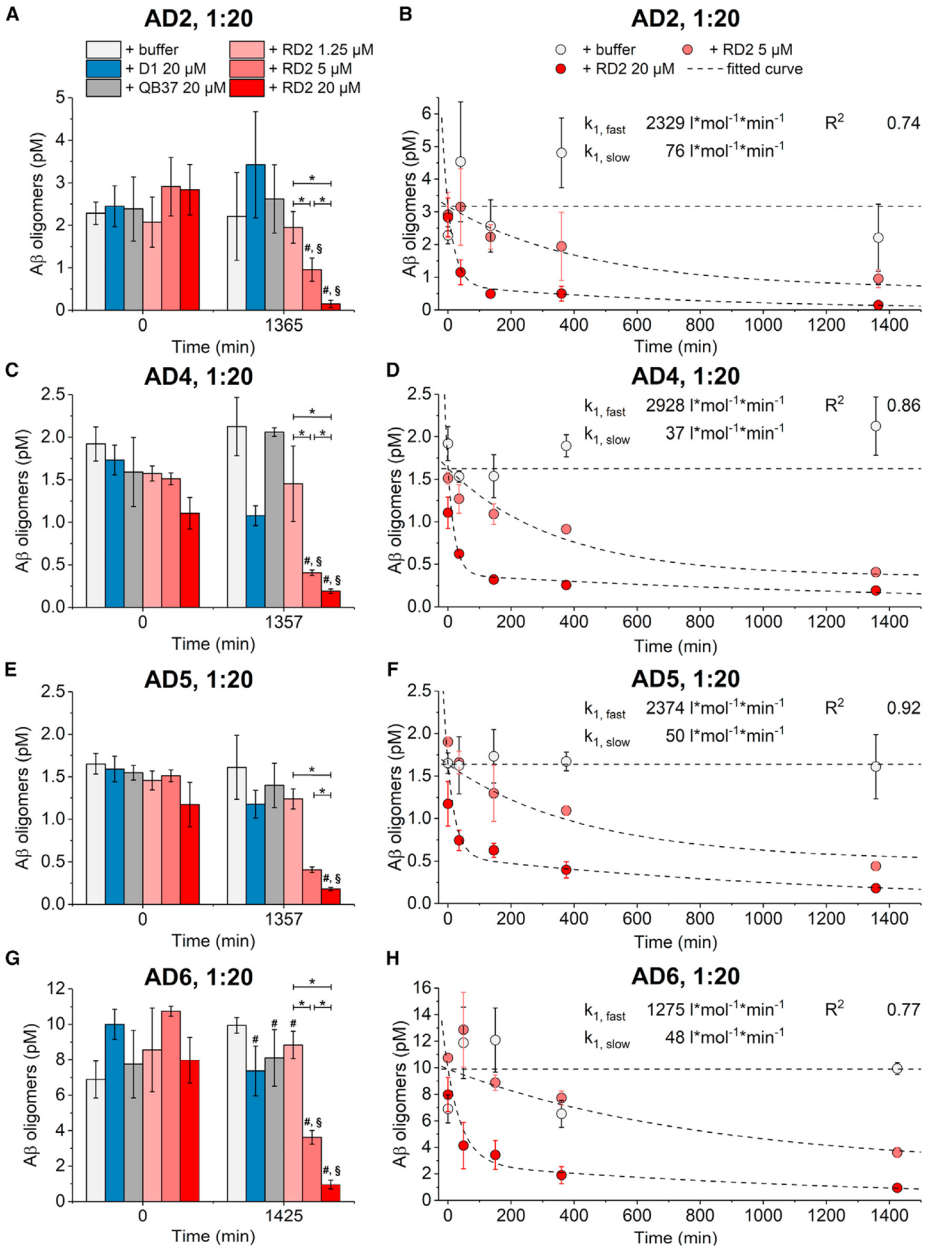


Figure 5. Time- and dose-dependent elimination of oligomers in human brain homogenate by RD2 but not by D-peptides D1 and QB37

Human AD brain homogenate (AD cases 2, 4, 5, and 6) was diluted 1:20 and was incubated with different concentrations of RD2 or 20 µM D1 or QB37. After incubating for the indicated amounts of time, samples were analyzed by sFIDA assay.

(A–H) Aβ oligomer concentrations at baseline and after overnight incubation are displayed for AD2 (A), AD4 (C), AD5 (E), and AD6 (G). Concentrations given here reflect the actual concentrations in the prepared sample after dilution and are not directly related to the concentrations in undiluted samples, shown in Figure 2.

(legend continued on next page)

Cell Reports Medicine
Article

CellPress
OPEN ACCESS

RD2. sFIDA results for fraction 10 are shown in Figures 6A and 6B for samples AD2 and AD6; representative TIRF images are shown in Figure S4A. After 0 min of pre-incubation, baseline concentration of fractions without peptides was around 11 pM for AD2 and 8 pM for AD6. A slight decrease in concentration of these samples was observed after 327 and 1,380 min to around 9 pM (AD2) and 6 pM (AD6). In contrast to the previous findings on unfractionated homogenates, fraction 10 of both samples showed a reduction of oligomer concentration by approximately 50% already at 0 min pre-incubation time with 5 μM RD2 and over 60% with 20 μM RD2. The concentration of Aβ oligomers in RD2-treated samples decreased further over the course of 1,380 min, down to 1.7 ± 0.1 pM (5 μM RD2, 81%) and 0.7 ± 0.1 pM (20 μM RD2, 92%) in AD2 and 1.4 ± 0.1 pM (5 μM, 77%) and 0.7 ± 0.1 pM (20 μM, 88%) in AD6. With 20 μM RD2, the endpoint values were comparable with those found in unfractionated homogenate, whereas 5 μM RD2 had an overall slightly larger effect on fraction 10 than on homogenate. The time- and dose-dependent response observed here with DGC-derived fraction 10 of human AD brain homogenate as well as the seemingly instant reduction of oligomers without additional pre-incubation time is very similar to the one observed in fraction 10 of APP/PS1 mouse brain homogenate before (Figure 3). The pooled fractions 4 to 6 showed low baseline values of 0.35 ± 0.03 pM (AD2) and 0.51 ± 0.04 pM (AD6), as presented in Figures 6C and 6D (Figure S4B: representative TIRF images). Baseline concentrations were identical for the samples incubated with buffer and samples with 20 μM RD2. After 1,380 min, the concentrations of the samples incubated with 20 μM RD2 were notably reduced to 0.12 ± 0.01 pM (AD2, 64%) and 0.14 ± 0.01 pM (AD6, 62%).

DISCUSSION

Size distribution of Aβ aggregates in relevant AD mouse models and patient-derived samples

Transgenic mouse models of AD are commonly used for understanding disease development and testing potential disease-modifying drugs. However, there is no single mouse model of choice that displays the complete and holistic pathology of AD, including Aβ plaques, tangles, neurodegeneration, and cognitive decline. Therefore, several different mouse models are used to investigate the efficacy of potential drug candidates. We analyzed the Aβ oligomer size distributions in brain homogenates of aged specimens of three different mouse models of AD and human AD cases, using the aggregate-specific sFIDA assay in combination with DGC. Our choice of extraction and analysis methods was intended to keep all aggregates as native as possible. In general, a majority of Aβ aggregates were found in fractions 9 or 10, corresponding to a calibrated size of more than 400 kDa in all transgenic mice and in human AD as well as NC samples. Aβ aggregates of similar size have been reported in transgenic mice and human AD cases before, using methods, such as size-exclusion chromatography (SEC), blue native blots, or density gradients. They have been found to have oligomeric or protofibrillar conformation[33–35] and have been postulated to serve as a reservoir for smaller, more diffusible toxic oligomers rather than being toxic themselves.[36,37] Fractions 4 to 6 were of special interest because they contained especially neurotoxic oligomers between 66 and 150 kDa in experiments with synthetic Aβ[28] and presented a local maximum in all transgenic mice and human samples. Oligomers in this size range might therefore have particular biological significance despite their lower relative concentration in the samples.

It is also likely that different co-aggregates of Aβ are found in different fractions. Oligomer binding proteins, such as apolipoprotein E (ApoE), influence the apparent aggregate size of Aβ assemblies consisting of otherwise similar numbers of Aβ units.[38] The investigation of the composition and function of potential co-aggregates in these fractions is a subject of further research.

In comparison with the strong bands observed in the western blot using the antibody 6E10, the concentrations of Aβ oligomers from APP_{SwDI} mouse brains measured by sFIDA assay using the antibodies Nab228 and IC16 were lower than expected, albeit still within the dynamic range of the assay. A control of the western blot using antibodies Nab228 and IC16 also yielded strong bands (Figure S1). These findings suggest that Aβ oligomers from APP_{SwDI} brain homogenate samples have less accessible epitopes for the antibodies used in the sFIDA but that these epitopes were released by the denaturing conditions of the SDS-PAGE. In contrast to APP_{Lon} and APP/PS1 mice, the Aβ variant expressed in APP_{SwDI} mice contains two amino acid residue replacements (E22Q/D23N). This highly artificial APP variant, which does not exist in humans, possibly results in Aβ monomers that form oligomers with conformations that are different from those obtained from other transgenic models and humans. Such different conformations possibly result in reduced accessibility of the epitopes for the respective antibodies in non-denaturing conditions, even though the epitopes as such are not affected by the APP mutations. Still, we were able to clearly discriminate APP_{SwDI} samples from wild-type samples in all fractions at a 1:10 dilution. All transgenic mice tested here showed full-blown pathology, which would be relevant for curative studies like the one conducted by Schemmert et al.,[21] in which sFIDA assay was used for the first time to monitor *in vivo* target engagement. The development and possible changes in aggregate size can be monitored in mice of different ages to further characterize existing or novel mouse models of AD.

Data are presented as mean ± SD N = 3 (technical replicates). *between groups, $p < 0.05$; #versus buffer, $p < 0.05$; §versus both control peptides D1 and QB37, $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks with Student-Newman-Keuls *post hoc* analysis). (B), (D), (F), and (H) Determination of the reaction rate constants $k_{1,fast}$ and $k_{1,slow}$ by a global double exponential fit of AD2 (B), AD4 (D), AD5 (F), or AD6 (H). Only the data corresponding to the three RD2 concentrations that were significantly different from each other (0 [buffer], 5, and 20 μM) were used. Effective RD2 concentrations were assumed to be 1 μM for the 5 μM data and 16 μM for the 20 μM data. Concentrations given here reflect the actual concentrations in the prepared sample after dilution and are not directly related to the concentrations in undiluted samples, shown in Figure 2. Data are presented as mean ± SD N = 3 (technical replicates). Refer to Figure S3 for representative TIRF images and to Figure S6 for the proposed mechanism of oligomer elimination by RD2.

CellPress
OPEN ACCESS

Cell Reports Medicine
Article

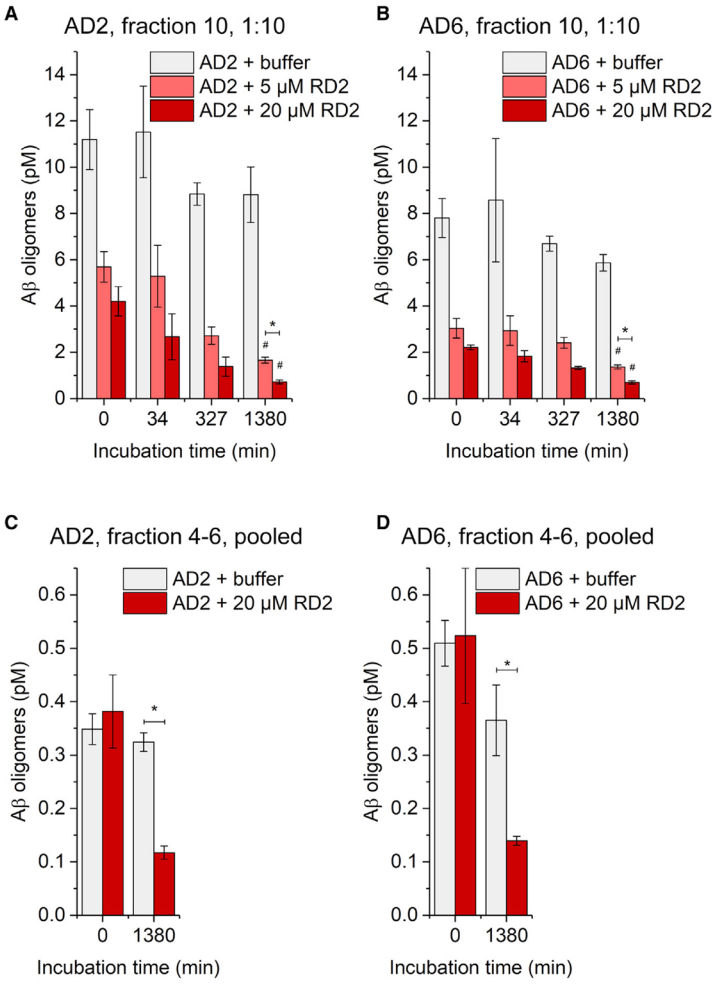


Figure 6. Effect of RD2 on different DGC fractions of human brain homogenate

(A and B) DGC fraction 10 of human AD brain homogenate (AD cases 2 and 6), representing the peak of sFIDA signal, was diluted 1:10 and was incubated with 0, 5, or 20 µM RD2. After incubating for the indicated duration, the Aβ oligomer concentration of the samples was analyzed by sFIDA assay. Concentrations given here reflect the actual concentrations in the prepared sample after dilution and are not directly related to the concentrations in undiluted samples, shown in Figure 2. Data are presented as mean concentration ±SD N = 3 (technical replicates). *between groups, $p < 0.05$; #versus buffer, $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks with Student-Newman-Keuls *post hoc* analysis).

(C and D) DGC fractions 4 to 6 of human AD brain homogenate (AD cases 2 and 6), representing a local maximum in the size distribution of Aβ oligomers, were pooled and were incubated with 0 or 20 µM RD2 overnight. Samples were analyzed by sFIDA assay. Concentrations given here reflect the actual concentrations in the prepared sample after dilution and are not directly related to the concentrations in undiluted samples, shown in Figure 2. Data are presented as mean ± SD N = 3 (technical replicates). *between groups, $p < 0.05$ (two-tailed t test); TIRF images are displayed in Figure S4.

Human AD brain homogenates showed much larger inter-individual variability of their total Aβ oligomer concentrations compared with those of transgenic mice, which was expectable due to the generally larger variation among human patients compared with inbred mouse strains. It is also possible that the location from which the samples were taken for homogenization affected the total amount of aggregates later found in the sample: All human samples used in the present study were from the superior parietal lobule, but inhomogeneity of the local distribution of Aβ might still occur, which would not be noticeable in mice of which the whole brains were used. Although mostly lacking Aβ pathology, NC samples also showed low amounts of oligomers with a maximum in fraction 10 as well. The occurrence of these miniscule amounts of oligomers is in line with the fact that sporadic accumulation of Aβ can generally be found long before cognitive symptoms would occur, if the afflicted person were to develop AD at all.[39] Regardless of the differences in absolute concentrations and in amyloid plaque pathology, the relative distribution of Aβ oligomer in AD samples was mostly comparable with that of APP/PS1 mice, possibly indicating similar types of aggregates.

Ex vivo target engagement of the oligomer-eliminating compound RD2

There is an urgent need to assess the value of pre-clinical animal experiments for their predictability in clinical studies, especially in the field of AD. Previously, we described that oral treatment with RD2 in aged APP/PS1 mice with full-blown pathology yielded improvement of cognition, memory, and behavior. We rationalized that this outcome was based on the efficacy of the compound to directly eliminate toxic Aβ oligomers, a mode of action that RD2 was designed and developed for. Indeed, a significant reduction of Aβ oligomer concentration in fraction 10 of fractionated brain homogenate was found.[21]

To further substantiate the rationale that RD2 will show the same efficacy also in AD patients, we demonstrated that the Aβ oligomers obtained from brains of the APP/PS1 mouse model and from human patients do have very similar size distributions, suggesting that the target Aβ oligomer has similar properties in both sources. The range of Aβ oligomer concentrations found in AD-affected human brain samples overlapped with that of

Cell Reports Medicine
Article

CellPress
OPEN ACCESS

Table 1. Details of human brain donors

	Gender	Age	Braak	Amyloid	*Post mortem* Interval
AD1	M	77	5	C	4:30 h
AD2	M	91	4		4:15 h
AD3	F	85	6	C	4:00 h
AD4	F	96	5		3:30 h
AD5	F	83	6	C	4:55 h
AD6	M	84	6	C	4:35 h
NC1	M	84	1	O	7:05 h
NC2	M	93	1	O	5:05 h
NC3	F	78	2		7:30 h
NC4	F	78	1	A	7:10 h

the APP/PS1 mouse model. This similarity in Aβ oligomers in the animal experiment and in human patients may already give some degree of confidence to the translation of the pre-clinical efficacy data for clinical trials.

Even more confidence is obtained from the direct observation of RD2-eliminating Aβ oligomers from APP/PS1 mouse brain homogenate *ex vivo* (Figure 3) and from AD patient-derived brain homogenate (Figures 4 and 5). During the *ex vivo* target engagement of RD2 in unfractionated brain homogenates of AD patients, we found a dose- and time-dependent reduction of Aβ aggregates. Two further D-peptides of similar size as RD2 were chosen as controls, D1 and QB37. None of these two peptides showed any dose-dependent effect, indicating that the observed reduction of Aβ oligomer concentration was indeed specific for RD2. A closer look at earlier time points of homogenate at a 1:20 dilution with 20 μM RD2 (Figure 5) revealed that the majority of the reaction took place in the first 40 min of pre-incubation time. Importantly, no reaction was observed without pre-incubation time, which means that no further reaction took place during the incubation with capture antibody on the sFIDA assay plate. It also shows that the observed effect is not attributed to any interaction of RD2 with the assay setup as such. The brain homogenates that we used here present a very complex matrix due to the abundance of different proteins that become released during the homogenization procedure. A considerable portion of RD2 is possibly bound to proteins other than Aβ, while its positive net charge makes it also likely to interact with nucleic acids, glycoproteins, and membrane constituents, such as phospholipids.[40] In order to describe the time and dose dependency of the reduction of Aβ oligomers by RD2 by global kinetic parameters, a concentration of 4 μM of RD2 considered as bound ("threshold dose") was subtracted from the respective total RD2 concentrations. The best fit was achieved with a double exponential decay model, suggesting a fast and a slow reaction. This could be indicative of different types of Aβ aggregates present in the sample that have different susceptibility to RD2. The calculated reaction rate constants, while generally in the same range, were global only within each sample but could potentially be used to compare different compounds. We observed *ex vivo* target engagement of RD2 in pooled DGC fractions 4 to 6 and in a 1:10 dilution of fraction 10 in human samples as well. Unlike fractions 4 to 6 and unfractionated homogenate, fraction 10 showed a notable decrease of Aβ oligomer concentration without pre-incubating with RD2, indicating that the majority of the reaction either happened within less than a minute or during the interval of about 120 min, in which the capture and first washing steps were completed. The latter, however, seems less likely due to the aforementioned observations in unfractionated brain homogenate. On the one hand, this might be due to high susceptibility to RD2 of the particular oligomers in fraction 10. On the other hand, possible matrix effects should be taken into account. While the overall oligomer concentration was almost equally high in a 1:10 dilution of fraction 10 and a 1:20 dilution of homogenate, DGC fractionation generally results in a reduction of complexity and in a dilution of the total protein concentration.

The dose and time dependence of RD2 activity resembles that of an enzyme. This is well in agreement with the proposed mode of action of RD2. RD2 is designed to stabilize Aβ monomers in their native intrinsically disordered conformation. Aβ oligomers, therefore, are destabilized by RD2, which is ultimately disassembling Aβ oligomers into monomers. Complexes of RD2 with Aβ monomers are transient, but of high affinity in the nanomolar K_D range,[17] and may be called fuzzy complexes.[41] The observed dose- and time-dependent Aβ oligomer elimination by RD2 agrees well with the hypothesis that RD2 is acting similar to a chaperone[42] that folds Aβ oligomers back into natively folded Aβ monomers (Figure S6).

CONCLUSION

sFIDA reliably allowed the reproducible measurement of Aβ oligomer concentrations in *post mortem* brain tissues from transgenic AD mouse models and from human AD patients. The combination of sFIDA with particle-size-dependent fractionation of the respective brain tissue homogenates by DGC allowed the quantitative analysis of the particle size distribution of Aβ oligomers. Although the absolute oligomer concentrations varied between individual AD patients and between the different mouse models by about two orders of magnitude, oligomer size distributions were very similar among human AD samples as well as between human AD samples and transgenic mice. The similarity of size distributions of Aβ oligomers in AD mouse models and humans supports a translational value of beneficial effects for cognition observed in the respective animal model, at least for drug candidates that eliminate Aβ oligomers, especially when animal models have been used that express human wild-type Aβ.

Also, animal and human brain tissue can be used to assay for *ex vivo* target engagement of drug candidates designed for direct Aβ oligomer elimination. Our results on *ex vivo* target engagement of RD2 support the findings of earlier *in vitro* and *in vivo* studies demonstrating the Aβ oligomer elimination activity of RD2.[18,21] After *ex vivo* treatment with RD2, the concentrations of Aβ oligomers in brain homogenates, as measured by sFIDA assay, were reduced. Due to the specificity of sFIDA assay for multimeric Aβ assemblies, reduction of sFIDA-obtained oligomer concentrations suggests monomerization of existing, native Aβ oligomers in the samples. The combination of DGC fractionation and sFIDA provides a general and sensitive tool for characterization and identification of different Aβ (co-)aggregates and further

CellPress
OPEN ACCESS

Cell Reports Medicine
Article

monitoring of *ex vivo* and *in vivo* target engagement. This allows testing of the efficacy of oligomer-eliminating compounds developed for therapy of AD with a fully physiological composition of Aβ aggregates in addition to conventional target engagement studies with pure, synthetic, or recombinant Aβ oligomers. Here, effective target engagement of the compound RD2 with human samples could be a promising indication of its efficacy in human patients. Safety in humans has been demonstrated already.[43] The principle of using *ex vivo*-obtained oligomers to test efficacy of oligomer-eliminating compounds using sFIDA can be translated to other disease-relevant oligomers, such as α-synuclein or tau oligomers.

Limitations of the study

Our analysis of a limited number of human brain samples revealed variability concerning the individual Aβ oligomer concentrations. Yet, we reliably observed *ex vivo* target engagement of RD2 in samples derived from different donors, supporting the mode of action and the general concept of RD2's *ex vivo* target engagement. The reduction of effective peptide concentrations by potential matrix effects in native human brain homogenates is also a point of concern. In future studies, further attempts may be undertaken to reduce this effect, for example, by using isolated DGC-obtained fractions with reduced matrix content.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
  - Lead contact
  - Materials availability
  - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
  - Animal models
  - Human samples
- METHOD DETAILS
  - Preparation of brain homogenates
  - Density gradient centrifugation
  - Incubation of brain homogenates and DGC fractions with D-peptides
  - Surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) assay
  - Western blot analysis
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
  - Analysis of image data
  - Calculation of Aβ oligomer concentration
  - Statistical analysis

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100630.

ACKNOWLEDGMENTS

D.W. was supported by grants from the Russian Science Foundation (RSF; project no. 20-64-46027) and by the Technology Transfer Fund of the Forschungszentrum Jülich. D.W. was supported by "Portfolio Drug Research" of the "Impuls und Vernetzungs-Fonds der Helmholtzgemeinschaft." Additional funding was received from Part the Cloud: Translational Research Funding for Alzheimer's Disease (PTC) award number: 18PTC-19-605853 from the Alzheimer's Association. We received funding from the European Union Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) under grant agreement 602999 (SYMPATH project) and the Federal Ministry of Education and Research within the projects VIP (03V0641), KNDD (01GI1010A), JPND/BIOMARKAPD (01ED1203H), and NEUROALLIANZ (16GW0099). We were also supported by the programs "Biomarkers Across Neurodegenerative Diseases I + II" of the Alzheimer's Association, Alzheimer's Research UK, and the Weston Brain Institute (11084 and BAND-19-614337). We are also grateful for support from The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research (14977), the ALS Association, and the Packard Center (19-SI-476). We further received funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (INST 208/616-1 FUGG, INST 208/794-1 FUGG) and the Helmholtz Association (HVF0079). We thank Luana Camargo and Dominik Honold for technical assistance with the collection of mouse brain samples. We thank Dr. Carsten Korth for providing us the IC16 antibody.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, D.W., B.K., C.Z., J.K., and T.B.; methodology, B.K., C.Z., and M.P.; investigation, B.K.; formal analysis, B.K. and C.Z.; visualization, B.K.; writing – original draft, B.K.; writing – review and editing, all authors; funding acquisition, D.W., O.B., and J.K.; resources, J.K., S.S., O.B., and D.W.; and supervision, T.B., J.K., and D.W.

DECLARATION OF INTERESTS

D.W. is a founder and shareholder of the company Priavoid and member of its supervisory board. D.W. is co-inventor of patents related to the compound RD2. C.Z., D.W., and B.K. are inventors of patent WO2019101250A1 (method for quantifying protein aggregates of a protein misfolding disease in a sample). D.W., O.B., and C.Z. are founders and shareholders of attyloid. D.W. is member of attyloid's supervisory board. These had no influence on the interpretation of the data. All other authors declare no competing interests.

Received: December 8, 2021
Revised: February 28, 2022
Accepted: April 15, 2022
Published: May 17, 2022

REFERENCES

1. Prince, M.J., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G.-C., Wu, Y.-T., Prina, M., et al. (2015). World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia: an Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends (Alzheimer's Disease International).
2. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's Dementia *16*, 391–460.
3. Sperling, R.A., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Bennett, D.A., Craft, S., Fagan, A.M., Iwatsubo, T., Jack, C.R., Jr., Kaye, J., Montine, T.J., et al. (2011). 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 *7*, 280–292. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.003.
4. Hadjichrysanthou, C., Evans, S., Bajaj, S., Siakallis, L.C., McRae-McKee, K., de Wolf, F., and Anderson, R.M.; The Alzheimer's Disease Neuroimaging I (2020). The dynamics of biomarkers across the clinical spectrum of Alzheimer's disease. Alzheimer's Res. Ther. *12*, 74.

Cell Reports Medicine
Article

CellPress
OPEN ACCESS

5. Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. Nature *416*, 535–539. https://doi.org/10.1038/416535a.

6. Benilova, I., Karran, E., and De Strooper, B. (2012). The toxic Aβ oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. Nat. Neurosci. *15*, 349–357. https://doi.org/10.1038/nn.3028.

7. Elfgen, A., Hupert, M., Bochinsky, K., Tusche, M., Gonzalez de San Roman Martin, E., Gering, I., Sacchi, S., Pollegioni, L., Huesgen, P.F., Hartmann, R., et al. (2019). Metabolic resistance of the D-peptide RD2 developed for direct elimination of amyloid-β oligomers. Sci. Rep. *9*, 5715. https://doi.org/10.1038/s41598-019-41993-6.

8. Wiesehan, K., and Willbold, D. (2003). Mirror-image phage display: aiming at the mirror. Chembiochem *4*, 811–815. https://doi.org/10.1002/cbic.200300570.

9. Funke, S.A., and Willbold, D. (2009). Mirror image phage display - a method to generate D-peptide ligands for use in diagnostic or therapeutical applications. Mol. Biosyst. *5*, 783–786. https://doi.org/10.1039/b904138a.

10. van Groen, T., Wiesehan, K., Funke, S.A., Kadish, I., Nagel-Steger, L., and Willbold, D. (2008). Reduction of Alzheimer's disease amyloid plaque load in transgenic mice by D3, a D-enantiomeric peptide identified by mirror image phage display. ChemMedChem *3*, 1848–1852. https://doi.org/10.1002/cmdc.200800273.

11. van Groen, T., Kadish, I., Funke, S.A., Bartnik, D., and Willbold, D. (2013). Treatment with D3 removes amyloid deposits, reduces inflammation, and improves cognition in aged AβPP/PS1 double transgenic mice. J. Alzheimer's Dis. *34*, 609–620. https://doi.org/10.3233/jad-121792.

12. Funke, S.A., van Groen, T., Kadish, I., Bartnik, D., Nagel-Steger, L., Brener, O., Sehl, T., Batra-Safferling, R., Moriscot, C., Schoehn, G., et al. (2010). Oral treatment with the <scp>d</scp>-Enantiomeric peptide D3 improves the pathology and behavior of Alzheimer's disease transgenic mice. ACS Chem. Neurosci. *1*, 639–648. https://doi.org/10.1021/cn100057j.

13. Leithold, L.H.E., Jiang, N., Post, J., Niemietz, N., Schartmann, E., Ziehm, T., Kutzsche, J., Shah, N.J., Breitkreutz, J., Langen, K.-J., et al. (2016). Pharmacokinetic properties of tandem d-peptides designed for treatment of Alzheimer's disease. Eur. J. Pharm. Sci. *89*, 31–38. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.04.016.

14. Schartmann, E., Schemmert, S., Ziehm, T., Leithold, L.H.E., Jiang, N., Tusche, M., Joni Shah, N., Langen, K.J., Kutzsche, J., Willbold, D., and Willuweit, A. (2018). Comparison of blood-brain barrier penetration efficiencies between linear and cyclic all-d-enantiomeric peptides developed for the treatment of Alzheimer's disease. Eur. J. Pharm. Sci. *114*, 93–102. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.12.005.

15. Ziehm, T., Buell, A.K., and Willbold, D. (2018). Role of hydrophobicity and charge of amyloid-beta oligomer eliminating <scp>d</scp>-Peptides in the interaction with amyloid-beta monomers. ACS Chem. Neurosci. *9*, 2679–2688. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00132.

16. Olubiyi, O.O., Frenzel, D., Bartnik, D., Glück, J.M., Brener, O., Nagel-Steger, L., Funke, S.A., Willbold, D., and Strodel, B. (2014). Amyloid aggregation inhibitory mechanism of arginine-rich D-peptides. Curr. Med. Chem. *21*, 1448–1457. https://doi.org/10.2174/09298673216613129122247.

17. Zhang, T., Gering, I., Kutzsche, J., Nagel-Steger, L., and Willbold, D. (2019). Toward the mode of action of the clinical stage all-<scp>d</scp>-enantiomeric peptide RD2 on Aβ42 aggregation. ACS Chem. Neurosci. *10*, 4800–4809. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.9b00458.

18. van Groen, T., Schemmert, S., Brener, O., Gremer, L., Ziehm, T., Tusche, M., Nagel-Steger, L., Kadish, I., Schartmann, E., Elfgen, A., et al. (2017). The Aβ oligomer eliminating D-enantiomeric peptide RD2 improves cognition without changing plaque pathology. Sci. Rep. *7*, 16275. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16565-1.

19. Leithold, L.H.E., Jiang, N., Post, J., Ziehm, T., Schartmann, E., Kutzsche, J., Shah, N.J., Breitkreutz, J., Langen, K.-J., Willuweit, A., and Willbold, D. (2016). Pharmacokinetic properties of a novel d-peptide developed to be therapeutically active against toxic β-amyloid oligomers. Pharm. Res. *33*, 328–336. https://doi.org/10.1007/s11095-015-1791-2.

20. Kutzsche, J., Schemmert, S., Tusche, M., Neddens, J., Rabl, R., Jurgens, D., Brener, O., Willuweit, A., Hutter-Paier, B., and Willbold, D. (2017). Large-scale oral treatment study with the four most promising D3-derivatives for the treatment of Alzheimer's disease. Molecules *22*, 1693. https://doi.org/10.3390/molecules22101693.

21. Schemmert, S., Schartmann, E., Zafiu, C., Kass, B., Hartwig, S., Lehr, S., Bannach, O., Langen, K.J., Shah, N.J., Kutzsche, J., et al. (2019). Aβ oligomer elimination restores cognition in transgenic Alzheimer's mice with full-blown pathology. Mol. Neurobiol. *56*, 2211–2223. https://doi.org/10.1007/s12035-018-1209-3.

22. Birkmann, E., Henke, F., Weinmann, N., Dumpitak, C., Groschup, M., Funke, A., Willbold, D., and Riesner, D. (2007). Counting of single prion particles bound to a capture-antibody surface (surface-FIDA). Vet. Microbiol. *123*, 294–304. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.001.

23. Wang-Dietrich, L., Funke, S.A., Kuhbach, K., Wang, K., Besmehn, A., Willbold, S., Cinar, Y., Bannach, O., Birkmann, E., and Willbold, D. (2013). The amyloid-β oligomer count in cerebrospinal fluid is a biomarker for Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. *34*, 985–994. https://doi.org/10.3233/jad-122047.

24. Kravchenko, K., Kulawik, A., Hulsemann, M., Kuhbach, K., Zafiu, C., Herrmann, Y., Linnartz, C., Peters, L., Bujnicki, T., Willbold, J., et al. (2017). Analysis of anticoagulants for blood-based quantitation of amyloid β oligomers in the sFIDA assay. Biol. Chem. *398*, 465–475. https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0153.

25. Kulawik, A., Heise, H., Zafiu, C., Willbold, D., and Bannach, O. (2018). Advancements of the sFIDA method for oligomer-based diagnostics of neurodegenerative diseases. FEBS Lett. *592*, 516–534. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12983.

26. Hülsemann, M., Zafiu, C., Kuhbach, K., Luhmann, N., Herrmann, Y., Peters, L., Linnartz, C., Willbold, J., Kravchenko, K., Kulawik, A., et al. (2016). Biofunctionalized silica nanoparticles: standards in amyloid-β oligomer-based diagnosis of Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. *54*, 79–88. https://doi.org/10.3233/jad-160253.

27. Herrmann, Y., Bujnicki, T., Zafiu, C., Kulawik, A., Kuhbach, K., Peters, L., Fabig, J., Willbold, J., Bannach, O., and Willbold, D. (2017). Nanoparticle standards for immuno-based quantitation of α-synuclein oligomers in diagnostics of Parkinson's disease and other synucleinopathies. Clin. Chim. Acta *466*, 152–159. https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.01.010.

28. Brener, O., Dunkelmann, T., Gremer, L., van Groen, T., Mirecka, E.A., Kadish, I., Willuweit, A., Kutzsche, J., Jurgens, D., Rudolph, S., et al. (2015). QIAD assay for quantitating a compound's efficacy in elimination of toxic Aβ oligomers. Sci. Rep. *5*, 13222. https://doi.org/10.1038/srep13222.

29. Wiesehan, K., Buder, K., Linke, R.P., Patt, S., Stoldt, M., Unger, E., Schmitt, B., Bucci, E., and Willbold, D. (2003). Selection of D-amino-acid peptides that bind to Alzheimer's disease amyloid peptide $A\beta_{1-42}$ by mirror image phage display. Chembiochem *4*, 748–753. https://doi.org/10.1002/cbic.200300631.

30. Funke, S.A., Bartnik, D., Gluck, J.M., Piorkowska, K., Wiesehan, K., Weber, U., Gulyas, B., Halldin, C., Pfeifer, A., Spenger, C., et al. (2012). Development of a small D-enantiomeric Alzheimer's amyloid-β binding peptide ligand for future in vivo imaging applications. PLoS One *7*, e41457. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041457.

31. Gulyás, B., Spenger, C., Beliczai, Z., Gulya, K., Kása, P., Jahan, M., Jia, Z., Weber, U., Pfeifer, A., Muhs, A., et al. (2012). Distribution and binding of ^{18}F-labeled and ^{125}I-labeled analogues of ACI-80, a prospective molecular imaging biomarker of disease: a whole hemisphere post mortem autoradiography study in human brains obtained from Alzheimer's disease patients. Neurochem. Int. *60*, 153–162. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.10.010.

32. Jahan, M., Nag, S., Krasikova, R., Weber, U., Muhs, A., Pfeifer, A., Spenger, C., Willbold, D., Gulyás, B., and Halldin, C. (2012). Fluorine-18 labeling of three novel D-peptides by conjugation with N-succinimidyl-4-[^{18}F]

CellPress
OPEN ACCESS

Cell Reports Medicine
Article

fluorobenzoate and preliminary examination by postmortem whole-hemisphere human brain autoradiography. Nucl. Med. Biol. *39*, 315–323. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2011.09.008.

33. Sehlin, D., Englund, H., Simu, B., Karlsson, M., Ingelsson, M., Nikolajeff, F., Lannfelt, L., and Pettersson, F.E. (2012). Large aggregates are the major soluble Aβ species in AD brain fractionated with density gradient ultracentrifugation. PLoS One *7*, e32014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032014.

34. Mc Donald, J.M., O'Malley, T.T., Liu, W., Mably, A.J., Brinkmalm, G., Portelius, E., Wittbold, W.M., 3rd, Frosch, M.P., and Walsh, D.M. (2015). The aqueous phase of Alzheimer's disease brain contains assemblies built from ∼4 and ∼7 kDa Aβ species. Alzheimers Dementia *11*, 1286–1305. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.01.005.

35. Upadhaya, A.R., Lungrin, I., Yamaguchi, H., Fandrich, M., and Thal, D.R. (2012). High-molecular weight Aβ oligomers and protofibrils are the predominant Aβ species in the native soluble protein fraction of the AD brain. J. Cell Mol. Med. *16*, 287–295. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01306.x.

36. Yang, T., Li, S., Xu, H., Walsh, D.M., and Selkoe, D.J. (2017). Large soluble oligomers of amyloid β-protein from Alzheimer brain are far less neuroactive than the smaller oligomers to which they dissociate. J. Neurosci. *37*, 152–163. https://doi.org/10.1523/jneurosci.1698-16.2016.

37. Hong, W., Wang, Z., Liu, W., O'Malley, T.T., Jin, M., Willem, M., Haass, C., Frosch, M.P., and Walsh, D.M. (2018). Diffusible, highly bioactive oligomers represent a critical minority of soluble Aβ in Alzheimer's disease brain. Acta Neuropathol. *136*, 19–40. https://doi.org/10.1007/s00401-018-1846-7.

38. Lana, E., Gellerbring, A., Jung, S., Nordberg, A., Unger Lithner, C., and Darreh-Shori, T. (2019). Homomeric and heteromeric Aβ species exist in human brain and CSF regardless of Alzheimer's disease status and risk genotype. Front. Mol. Neurosci. *12*, 176. https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00176.

39. Thal, D.R., Walter, J., Saido, T.C., and Fändrich, M. (2015). Neuropathology and biochemistry of Aβ and its aggregates in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. *129*, 167–182. https://doi.org/10.1007/s00401-014-1375-y.

40. Meloni, B.P., Mastaglia, F.L., and Knuckey, N.W. (2020). Cationic arginine-rich peptides (CARPs): a novel class of neuroprotective agents with a multimodal mechanism of action. Front. Neurol. *11*, 108. https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00108.

41. Borgia, A., Borgia, M.B., Bugge, K., Kissling, V.M., Heidarsson, P.O., Fernandes, C.B., Sottini, A., Soranno, A., Buholzer, K.J., Nettels, D., et al. (2018). Extreme disorder in an ultrahigh-affinity protein complex. Nature *555*, 61–66. https://doi.org/10.1038/nature25762.

42. Arosio, P., Michaels, T.C.T., Linse, S., Månsson, C., Emanuelsson, C., Presto, J., Johansson, J., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., and Knowles, T.P.J. (2016). Kinetic analysis reveals the diversity of microscopic mechanisms through which molecular chaperones suppress amyloid formation. Nat. Commun. *7*, 10948. https://doi.org/10.1038/ncomms10948.

43. Kutzsche, J., Jurgens, D., Willuweit, A., Adermann, K., Fuchs, C., Simons, S., Windisch, M., Humpel, M., Rossberg, W., Wolzt, M., and Willbold, D. (2020). Safety and pharmacokinetics of the orally available antiprionic compound PRI-002: a single and multiple ascending dose phase I study. Alzheimers Dement (N Y) *6*, e12001. https://doi.org/10.1002/trc2.12001.

44. Jager, S., Leuchtenberger, S., Martin, A., Czirr, E., Wesselowski, J., Dieckmann, M., Waldron, E., Korth, C., Koo, E.H., Heneka, M., et al. (2009). Î±-secretase mediated conversion of the amyloid precursor protein derived membrane stub C99 to C83 limits Aî² generation. J. Neurochem. *111*, 1369–1382. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06420.x.

45. Jankowsky, J.L., Slunt, H.H., Ratovitski, T., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Borchelt, D.R. (2001). Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. Biomol. Eng. *17*, 157–165. https://doi.org/10.1016/s1389-0344(01)00067-3.

46. Jankowsky, J.L., Fadale, D.J., Anderson, J., Xu, G.M., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Lee, M.K., Younkin, L.H., Wagner, S.L., et al. (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β-amyloid peptide *in vivo*: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. Hum. Mol. Genet. *13*, 159–170. https://doi.org/10.1093/hmg/ddh019.

47. Borchelt, D.R., Davis, J., Fischer, M., Lee, M.K., Slunt, H.H., Ratovitsky, T., Regard, J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., and Price, D.L. (1996). A vector for expressing foreign genes in the brains and hearts of transgenic mice. Genet. Anal. Biomol. Eng. *13*, 159–163. https://doi.org/10.1016/s1050-3862(96)00167-2.

48. Lee, M.K., Borchelt, D.R., Kim, G., Thinakaran, G., Slunt, H.H., Ratovitski, T., Martin, L.J., Kittur, A., Gandy, S., Levey, A.I., et al. (1997). Hyperaccumulation of FAD-linked presenilin 1 variants *in vivo*. Nat. Med. *3*, 756–760. https://doi.org/10.1038/nm0797-756.

49. Garcia-Alloza, M., Robbins, E.M., Zhang-Nunes, S.X., Purcell, S.M., Betensky, R.A., Raju, S., Prada, C., Greenberg, S.M., Bacskai, B.J., and Frosch, M.P. (2006). Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. Neurobiol. Dis. *24*, 516–524. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.08.017.

50. Hong, S., Beja-Glasser, V.F., Nfonoyim, B.M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K.M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B.A., et al. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. Science *352*, 712–716. https://doi.org/10.1126/science.aad8373.

51. Kamphuis, W., Mamber, C., Moeton, M., Kooijman, L., Sluijs, J.A., Jansen, A.H.P., Verveer, M., de Groot, L.R., Smith, V.D., Rangarajan, S., et al. (2012). GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. PLoS One *7*, e42823. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042823.

52. Kilgore, M., Miller, C.A., Fass, D.M., Hennig, K.M., Haggarty, S.J., Sweatt, J.D., and Rumbaugh, G. (2010). Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. Neuropsychopharmacology *35*, 870–880. https://doi.org/10.1038/npp.2009.197.

53. Lalonde, R., Kim, H.D., Maxwell, J.A., and Fukuchi, K. (2005). Exploratory activity and spatial learning in 12-month-old APP_{695}SWE/co+PS1/ΔE9 mice with amyloid plaques. Neurosci. Lett. *390*, 87–92. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.08.028.

54. Rupp, N.J., Wegenast-Braun, B.M., Radde, R., Calhoun, M.E., and Jucker, M. (2011). Early onset amyloid lesions lead to severe neuritic abnormalities and local, but not global neuron loss in APPPS1 transgenic mice. Neurobiol. Aging *32*, 2324.e1. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.08.014.

55. Minkeviciene, R., Ihalainen, J., Malm, T., Matilainen, O., Keksa-Goldsteine, V., Goldsteins, G., Iivonen, H., Leguit, N., Glennon, J., Koistinaho, J., et al. (2008). Age-related decrease in stimulated glutamate release and vesicular glutamate transporters in APP/PS1 transgenic and wild-type mice. J. Neurochem. *105*, 584–594. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05147.x.

56. Davis, J., Xu, F., Deane, R., Romanov, G., Previti, M.L., Zeigler, K., Zlokovic, B.V., and Van Nostrand, W.E. (2004). Early-onset and robust cerebral microvascular accumulation of amyloid β-protein in transgenic mice expressing low levels of a vasculotropic Dutch/Iowa mutant form of amyloid β-protein precursor. J. Biol. Chem. *279*, 20296–20306. https://doi.org/10.1074/jbc.m312946200.

57. Levy, E., Carman, M.D., Fernandez-Madrid, I.J., Power, M.D., Lieberburg, I., van Duinen, S.G., Bots, G.T.A.M., Luyendijk, W., and Frangione, B. (1990). Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. Science *248*, 1124–1126. https://doi.org/10.1126/science.2111584.

58. Grabowski, T.J., Cho, H.S., Vonsattel, J.P.G., Rebeck, G.W., and Greenberg, S.M. (2001). Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa

Cell Reports Medicine
Article

CellPress
OPEN ACCESS

family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. Ann. Neurol. *49*, 697–705. https://doi.org/10.1002/ana.1009.

59. Miao, J., Xu, F., Davis, J., Otte-Höller, I., Verbeek, M.M., and Van Nostrand, W.E. (2005). Cerebral microvascular amyloid β protein deposition induces vascular degeneration and neuroinflammation in transgenic mice expressing human vasculotropic mutant amyloid β precursor protein. Am. J. Pathol. *167*, 505–515. https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62993-8.

60. Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., Reversé, D., Baekelandt, V., Naidu, A., Tesseur, I., Spittaels, K., Haute, C.V.D., Checler, F., et al. (1999). Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. J. Biol. Chem. *274*, 6483–6492. https://doi.org/10.1074/jbc.274.10.6483.

61. Van Dorpe, J., Smeijers, L., Dewachter, I., Nuyens, D., Spittaels, K., Van Den Haute, C., Mercken, M., Moechars, D., Laenen, I., Kuiperi, C., et al. (2000). Prominent cerebral amyloid angiopathy in transgenic mice overexpressing the london mutant of human APP in neurons. Am. J. Pathol. *157*, 1283–1298. https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64644-5.

62. Dominguez-del-Toro, E., Rodriguez-Moreno, A., Porras-Garcia, E., Sanchez-Campusano, R., Blanchard, V., Laville, M., Bohme, G.A., Benavides, J., and Delgado-Garcia, J.M. (2004). An in vitro and in vivo study of early deficits in associative learning in transgenic mice that over-express a mutant form of human APP associated with Alzheimer's disease. Eur. J. Neurosci. *20*, 1945–1952. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03643.x.

63. Rzepecki, P., Nagel-Steger, L., Feuerstein, S., Linne, U., Molt, O., Zadmard, R., Aschermann, K., Wehner, M., Schrader, T., and Riesner, D. (2004). Prevention of Alzheimer's disease-associated Aβ aggregation by rationally designed nonpeptidic β-sheet ligands. J. Biol. Chem. *279*, 47497–47505. https://doi.org/10.1074/jbc.m405914200.

64. Schemmert, S., Schartmann, E., Honold, D., Zafiu, C., Ziehm, T., Langen, K.J., Shah, N.J., Kutzsche, J., Willuweit, A., and Willbold, D. (2019). Deceleration of the neurodegenerative phenotype in pyroglutamate-Aβ accumulating transgenic mice by oral treatment with the Aβ oligomer eliminating compound RD2. Neurobiol. Dis. *124*, 36–45. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.10.021.

65. van Groen, T., Kadish, I., Wiesehan, K., Funke, S.A., and Willbold, D. (2009). In vitro and in vivo staining characteristics of small, fluorescent, Aβ42-binding D-enantiomeric peptides in transgenic AD mouse models. ChemMedChem *4*, 276–282. https://doi.org/10.1002/cmdc.200800289.

CellPress
OPEN ACCESS

Cell Reports Medicine
Article

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Anti-beta-Amyloid Purified (SIGNET) Monoclonal Antibody, Unconjugated, Clone 6E10	Covance	Cat# SIG-39320, RRID:AB_662798
IC16	Dr. Carsten Korth, HHU Düsseldorf[44]	N/A
Mouse Anti-Human beta-Amyloid Monoclonal Antibody, Clone NAB 228	Sigma-Aldrich	Cat# A8354, RRID:AB_476770
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	Thermo Fisher Scientific	Cat# 31430, RRID:AB_228307
Biological samples		
Human brain samples	Netherlands Brain Bank	https://www.brainbank.nl/
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
OptiPrep™ Density Gradient Medium	Sigma-Aldrich	Cat# D1556
D1	JPT Peptide Technologies	N/A
QB37	peptides&elephants	N/A
RD2	CBL Patras	N/A
Amyloid β-Protein (1-42)	Bachem	Cat# H-1368
Experimental models: Organisms/strains		
Mouse: B6.Cg-Tg(APPswe,PSEN1dE9) 85Dbo/Mmjax (APP_{swe}/PS1ΔE9 (APP/PS1))	The Jackson Laboratory	RRID:MMRRC_034832-JAX
Mouse: Tg(Thy1-APPLon)2Vln (APP_{Lon})	Fred van Leuven	RRID:MGI:3717578
Mouse: C57BL/6-Tg(Thy1-APPSwDutIowa) BWevn/Mmjax (APP_{SwDI})	The Jackson Laboratory	RRID:MMRRC_034843-JAX
Mouse: C57BL/6J (wildtype)	The Jackson Laboratory	RRID:IMSR_JAX:000664
Software and algorithms		
sFIDAta	In-house developed software	N/A
ImageJ 1.51k	National Institutes of Health, USA	RRID:SCR_003070
SigmaPlot 11.0	Systat Software, Germany	RRID:SCR_003210
OriginPro 2017G	OriginLab Corp., USA	RRID:SCR_014212

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Dieter Willbold (d.willbold@fz-juelich.de).

Materials availability

This study did not generate new unique reagents.

Data and code availability

- This study includes no data deposited in external repositories. The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on request.
- This paper does not report original code.
- Any additional information required to reanalyze the data reported in this work paper is available from the Lead contact upon request.

Cell Reports Medicine
Article

CellPress
OPEN ACCESS

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Animal models

Three different transgenic Alzheimer's disease (AD) mouse models were used:

APP_{swe}/PS1ΔE9 (APP/PS1, RRID:MMRRC_034832-JAX): This well-characterized double-transgenic model was created by Jankowsky et al.[45,46] by co-expressing two previously described transgenes. The mice express chimeric mouse/human APP_{swe} (mouse APP695 with human Aβ domain and "Swedish" mutation K595M/N596L, first created by Borchelt et al.[47]) and human PSEN1 lacking exon 9[48] under control of mouse prion protein promoters. The mutant PSEN1 shifts the ratio of $Aβ_{40}/Aβ_{42}$ in favor of the more amyloidogenic $Aβ_{42}$. The mice start developing plaques at about 4 months,[49] synaptic loss in the hippocampus at 4 months,[50] astrogliosis[51] and deficits in contextual memory starting at six months of age.[52] Spatial memory, as assessed by the Morris water maze (MWM), has been found to be impaired in 12-month-old mice.[53] APP/PS1 mice do not develop tau tangle pathology, and show only moderate neuronal loss in the vicinity of plaques.[54] Successful *in vivo* target engagement of the oligomer eliminating D-peptide RD2 was demonstrated in a study from Schemmert et al.,[21] with RD2-treated mice showing significant cognitive improvement as well as a reduction of Aβ oligomers. The mice were purchased from Jackson and were bred in-house on a C57BL/6J background. In the current study, three male 18 month-old heterozygous APP/PS1 mice on a C57BL/6J background were used, since they show distinctive cognitive deficits in the Morris water maze (MWM) and full-blown plaque pathology at this age.[49,55]

APP_{SwDI} (RRID:MMRRC_034843-JAX): This mouse model was created by Davis et al.[56] by expressing human APP (isoform 770) containing "Swedish" (K670N/M671L), "Dutch" (E693Q), and "Iowa" (D694N) mutations under the control of the mouse Thy1.2 promoter on a C57Bl/6J background. "Dutch" and "Iowa" mutations are located within the Aβ domain, creating a vasculotropic Aβ variant (E22Q/D23N); single "Dutch" or "Iowa" mutations are associated with severe familial cerebral amyloid angiopathy.[57,58] Heterozygous APP_{SwDI} mice accumulate extensive microvascular fibrillar Aβ deposits starting at six months of age, and diffuse Aβ deposits starting at three months of age, covering most of the forebrain by twelve months of age.[56] In addition, they develop gliosis especially in the thalamus and subiculum, increasing over the course of 24 months. Homozygous APP_{SwDI} mice develop pathology faster and to a greater extent, and cognitive deficits were reported using the Barnes maze.[59] The mice were purchased from Jackson and were bred in-house on a C57BL/6J background. In the current study, three female 25.5-month-old homozygous APP_{SwDI} mice were used.

APP_{Lon} (RRID:MGI:3717578): Transgenic mice overexpressing human APP_{695} with the APPV717I ("London") mutation under control of the mouse Thy-1 promotor were first introduced by Moechars et al.[60] In addition to amyloid plaques starting at about 10 months of age, these mice develop cerebral amyloid angiopathy (CAA) bearing similarity to a subset of human AD cases as they age.[61] APP_{Lon} mice show cognitive impairment starting at six months of age, before plaques become evident.[60,62] The mice were originally obtained from Fred van Leuven, and were bred in-house on a C57BL/6J background. For analysis in the current study, two male and two female heterozygous APP_{Lon} mice of more than 24 months of age were used.

Wildtype C57BL/6J mice (RRID:IMSR_JAX:000664) were used as negative controls. All mice were housed under controlled conditions, with a light/dark cycle of 12/12 h, a temperature of 22°C and 54% humidity. Food and water were available *ad libitum*.

Upon reaching a certain age, as described above, mice were sacrificed, brains were removed, and immediately snap-frozen in isopentane. Brain hemispheres were stored at −80°C until further use.

All procedures involving animals were done in accordance with the German Law on the protection of animals (TierSchG). All animal experiments were performed in accordance with the German Law on the protection of animals (TierSchG §§ 7–9) and were approved by a local ethics committee (LANUV, North-Rhine-Westphalia, Germany, reference number: Az: 84-02.04.2014.362 or Az: 84-02.04.2019.A304).

Human samples

Human brain samples were obtained from The Netherlands Brain Bank, Netherlands Institute for Neuroscience, Amsterdam (NBB, open access: www.brainbank.nl), project number 1116. All Material has been collected from donors for or from whom a written informed consent for a brain autopsy and the use of the material and clinical information for research purposes had been obtained by the NBB. The part of the study involving human tissue samples was approved by the ethics committee of the medical faculty of the Heinrich-Heine-University, Düsseldorf (study number: 6215).

Superior parietal lobule samples of six Alzheimer's disease subjects (AD, 77 to 96 years of age at death, Braak staging 4 to 6) and four non-demented control subjects (NC, 78 to 93 years of age at death, Braak stage 1 to 2) were used for analysis. Details, including Braak staging for neurofibrillary tangles (NFT) and amyloid staging as far as provided by the NBB, are listed in Table 1. Two additional NC samples were provided by NBB, but were excluded from further analyses due to extensive amyloid plaque pathology corresponding to stage "B" on a scale from "O" to "C."

METHOD DETAILS

Preparation of brain homogenates

All homogenates were prepared using a Precellys24 homogenizer (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, France) with CK14 lysing kits (Bertin Instruments) for 2 × 30 s, 6000 rpm under constant cooling by Cryolys cooling unit (Bertin Instruments).

CellPress
OPEN ACCESS

Cell Reports Medicine
Article

All homogenates were centrifuged at 1200 g for 10 min, and the supernatant was used for analysis. The protein concentration of the homogenate supernatants was assessed by BCA assay. Homogenates were stored at −80°C.

Mouse brain samples

One hemisphere of each animal, excluding the cerebellum, was homogenized at a concentration of 10% w/v in Tris buffer (20 mM Tris, 250 mM NaCl, pH 8.3) containing cOmplete EDTA-free protease inhibitor and PhosSTOP phosphatase inhibitor (Roche, Basel, Switzerland).

Human brain samples

Pieces of around 250 mg were homogenized at a concentration of 10% w/v in TBS (24.7 mM Tris, 136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4) containing c Omplete EDTA-free protease inhibitor and PhosSTOP phosphatase inhibitor (Roche, Basel, Switzerland).

Density gradient centrifugation

Discontinuous density gradients of 5% to 50% (w/v) iodixanol (OptiPrep, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) buffered to pH 7.4 with 10 mM sodium phosphate buffer (NaP_i), were prepared as described by Brener et al.,[28] Rzepecki et al.:[63] Layers of 260 μL of 50%, 260 μL of 40%, 260 μL of 30%, 780 μL of 20%, 260 μL of 10% and 100 μL of 5% iodixanol were formed in 11 × 34 mm polypropylene open-top ultracentrifuge tubes (Beckman-Coulter, USA). 100 μL of homogenate supernatant, adjusted to the same amount of total protein within each group (mouse or human), was overlaid on top of each gradient. After centrifugation at 259,000 g, 4°C for 3 h using an Optima MAX-XP ultracentrifuge with TLS-55 rotor (both Beckman Coulter, USA), 14 fractions of 140 μL each were collected from top to bottom.

Incubation of brain homogenates and DGC fractions with D-peptides

RD2 was purchased from CBL Patras (Olenia, Greece). RD2 is a rationally designed derivative of the D-peptide D3 - a compound which was originally identified by mirror-image phage display against monomeric $A\beta_{1-42}$.[10] RD2 has first been characterized by Olubiyi, Frenzel (16). As described earlier, RD2 is effective at eliminating Aβ oligomers *in vitro*[18] and has proven its *in vivo* efficiency in different AD mouse models.[20,21,64] The sequence of RD2 is H-ptlhthnrrrrr-NH_2.

D1 was purchased from JPT Peptide Technologies (Berlin, Germany). It was identified by a mirror-image phage display selection targeting $A\beta_{1-42}$ fibrils[29] and has been shown to bind amyloid plaques in human AD brain tissue sections[29] as well as in transgenic APP/PS1 mouse brain samples.[65] The sequence of D1 is H-qshyrhispaqv-NH_2.

QB37 was purchased from peptides&elephants (Henningsdorf, Germany). Its sequence is H-sytldlsgfrgh-NH_2.

All peptide solutions were freshly prepared in 10 mM NaP_i, pH 7.4, from lyophilized powder for each experiment.

DGC derived fraction 10 from APP/PS1 mouse brain homogenate was incubated with an equal volume of RD2 solutions or 10 mM NaP_i, resulting in a dilution factor of 1:2 during incubation. Incubation was performed at 4 °C at 125 rpm. Samples were drawn from the mixtures after the incubation times indicated in Figure 3, and were flash-frozen and were stored at −80°C until analysis.

For *ex vivo* target engagement experiments involving dilutions of 10% human brain homogenates or DGC derived fractions 10 as substrate, the homogenates/fraction 10 were diluted with 10 mM NaP_i, pH 7.4. To avoid further dilution of DGC fractions 4 to 6, they were pooled and were mixed with a volume of RD2 stock solution making up no more than 10% of the total reaction mixture. Incubation was performed at 4°C, 125 rpm. Freezing and thawing was avoided by separately preparing the reaction mixtures at the indicated times before analysis. Even though freeze-thaw cycles were avoided within a single experiment, samples used for *ex vivo* target engagement experiments generally received additional incubation times at 4°C and additional handling, involving e.g. surfaces of pipette tips and Eppendorf tubes, as compared to the samples displayed in Figures 1 and 2. Therefore, total concentrations of recoverable Aβ oligomers were expected to be lower in *ex vivo* target engagement samples.

Surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) assay

Preparation

sFIDA assays were performed using 384-well glass-bottom microtiter plates (Sensoplate Plus, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). The well bottom was coated with monoclonal antibody Nab228 (RRID:AB_476770, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) using a multi-step protocol for covalent coupling. The principle of the coupling reactions is described in detail by Kulawik et al.[25] First, the glass surface of the plate was functionalized with APTES ((3-aminopropyl)triethoxysilane; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): A 5% (v/v) solution of APTES in anhydrous toluene (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was placed in a desiccator, the plate was placed above the solution, and incubated in an argon atmosphere for 1 h. After removing the APTES solution, the plate was dried for 2 h under vacuum.

Next, 20 μL of phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to each well, followed by 20 μL of 4 mM succinimidyl carbonate-poly-(ethylene glycol)-carboxymethyl (PEG, MW 3400, Laysan Bio, Arab, USA) in ddH_2O. The plate was incubated for 1 h at room temperature. After washing five times with ddH_2O, the carboxylic acid groups now present on the glass surface were activated by adding a mixture of 200 mM N-(3-dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 50 mM N-hydroxysuccinimide (NHS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 0.1 M 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES; Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and incubating for 30 min. After five washes with ddH_2O, 20 μL of 5 μg/mL Nab228 in 0.1 M sodium hydrogen carbonate (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) was added to each well and incubated overnight at 4°C. The wells were washed five times each with Tris buffered saline (TBS; SERVA, Heidelberg, Germany) containing 0.05%

Cell Reports Medicine
Article

CellPress
OPEN ACCESS

Tween20 (AppliChem, Darmstadt, Germany) (TBS-T) and TBS without Tween20. The plate was blocked with 1% bovine serum albumin (BSA; AppliChem, Darmstadt, Germany) in TBS containing 0.03% ProClin 300 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 1 h at room temperature.

Samples and silica nanoparticle standards (SiNaPs, prepared according to Hülsemann et al.[26]) were added after washing the plate five times with TBS-T and TBS and were incubated for 75 min. Depending on the type of sample and the expected concentration of Aβ oligomers, samples were diluted in TBS beforehand to ensure equal distribution and proper separation of aggregates from each other on the well surface for accurate quantitation: Mouse brain homogenate samples of APP_{SwDI}, APP/PS1 and APP_{Lon} were diluted 1:100, their DGC fractions 1:10; wildtype samples were diluted 1:10, their DGC fractions were not diluted. Human brain homogenates were diluted 1:5, human DGC fractions 1:2. These lower dilutions factors were chosen because of the expected lower total concentration of Aβ oligomers and higher variability in human samples in contrast to transgenic mice. Target engagement samples were used at different dilutions, as indicated in the respective experiments. Drying of the wells would cause artifacts; therefore, a volume of 20 μL was present in the wells before addition of 20 μL sample, standard, or antibody, resulting in a total volume of 40 μL during incubation. Due to the aforementioned assay design, an additional dilution factor of 1:2 of the samples' original concentrations was included to yield the final dilution. SiNaPs of 20 nm diameter, coated with about 30 $Aβ_{1-15}$ peptides per particle, were used at final concentrations ranging from 1 fM to 10 pM as calibration standards for Aβ oligomers. Samples and standards were measured in triplicate.

After sample incubation, the plate was washed three times with TBS. Monoclonal detection antibodies Nab228 (RRID:AB_476770, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and IC16[44] (kindly provided by Prof. Dr. Carsten Korth, Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany) were labeled with fluorescent dyes CF633 or CF488A (both), respectively. Nab228-CF633 (epitope: $Aβ_{1-11}$) and IC16-CF488A (epitope: $Aβ_{2-8}$) were diluted to a concentration of 0.625 μg/mL each in TBS containing 0.1% BSA and 0.05% Tween20. The solution was centrifuged at 100,000 g for 1 h at 4°C, and 20 μL of the supernatant was added to each well. After 1 h, the plate was washed twice with TBS. 60 μL TBS containing 0.03% ProClin was added to each well to prevent bacterial growth, and the plate was sealed with plastic foil (SealPlate film, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Image data acquisition

14-bit grayscale images of the glass surface were acquired with a multi-color laser of a total internal reflection fluorescence (TIRF) microscope (AM TIRF MC, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), using an oil immersion objective (HC PL APO 100x/1.47 OIL CORR TIRF, Leica, Wetzlar, Germany). TIRF penetration depth was set to 200 nm, exposure time was between 400 and 1000 ms with an EM gain of 800 to 1000. 25 positions in each well were imaged in both channels (Ch0: Ex/Em 635/705 nm; Ch1: Ex/Em 488/525 nm) with an image size of 1000 x 1000 pixels, corresponding to an area of 114 × 114 μm per image. In total, approximately 3% of each well's surface area was recorded. A complete set of 25 images of a representative well is presented in Figure S5. Representative TIRF images shown here (except for Figure S5) are cropped to 25% of their original resolution, and their overall brightness is slightly adjusted to ensure better visibility on computer screens or printouts. Analysis was carried out with full-size, raw image files, as described below.

Western blot analysis

For Western blotting, samples were resolved via SDS-PAGE on 12% tris-tricine gels at a constant 45 mA per gel for 1:45 h using the Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, USA). Proteins were transferred to a PVDF membrane with a pore size of 0.2 μm (Trans-Blot Turbo Mini PVDF Transfer Pack, Bio-Rad, Hercules, USA) at 25 V, 1.3 A for 7 min, using the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, Hercules, USA). Membranes were boiled in PBS for 5 min in a microwave oven after transfer. After cooling down to room temperature, the membranes were incubated in fresh PBS for 5 min and in TBS-T (0.1% Tween20) for 5 min. Membranes were blocked with 2% nonfat dried milk powder in TBS-T for 1 h at room temperature. Anti-Aβ antibodies 6E10 (RRID:AB_662798, Covance, Princeton, USA), Nab228 (RRID:AB_476770, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or IC16 (HHU Düsseldorf, Germany) were used at a concentration of 1 μg/mL in TBS-T over night at 4 °C. Following three 10 min washes with TBS-T, the membranes were incubated with an HRP-coupled goat anti-mouse IgG (RRID:AB_228307, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), diluted 1:10000 in TBS-T. After washing three times for 10 min with TBS-T, protein bands were visualized with a ChemiDoc MP System (Bio-Rad, Hercules, USA) using ECL Select substrate (GE Healthcare, Boston, USA).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Analysis of image data

Images were analyzed using sFIDAta, an in-house developed software. All images containing artifacts such as scratches or images that were out of focus were excluded from analysis. Cutoff values were calculated for each channel, based on the 0.01% most intense pixels of the negative control (TBS). Pixels whose intensity exceeded this background intensity threshold in both channels at the same location (co-localized pixels) were counted to calculate the sFIDA readout. Means and standard deviations of the triplicates were calculated in sFIDAta.

CellPress
OPEN ACCESS

Cell Reports Medicine
Article

Calculation of Aβ oligomer concentration

The sFIDA readout of the SiNaP standards was used to perform a linear regression analysis. Concentrations were calculated based on this linear regression, reflecting the concentration of oligomer particles of a certain defined size and number of epitopes. Excel 2010 (Microsoft, USA) and OriginPro 9.4 (OriginLab, USA) were used for calculations and graphs.

Statistical analysis

All data are presented as mean ± standard deviation over triplicate wells in single sFIDA measurements (technical replicates), or mean ± standard deviation over the indicated number (N) of biological replicates. In cases where only few different biological samples were analyzed, or variation between samples was high, technical replicates are shown for each sample separately. The limit of detection (LOD) and lower limit of quantification (LLOQ) were defined as the concentration exceeding that of the blank sample by 3 or 10 standard deviations, respectively. Further statistical analyses were carried out in SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Germany) and are summed up in Table S1.

The reaction rate constant k_1 was fitted in SigmaPlot 11.0 based on the assumption that RD2 was present in large excess compared to the Aβ oligomer concentration [O], so that the principles of a pseudo-first order reaction apply:

$$[O]_t = [O]_0 \cdot e^{-kt}$$

with

$$k = k_1[RD2]$$

To calculate k_1 directly and globally, a modified formula for a double exponential decay was used:

$$[O]_t = [O]_{fast} * e^{-k_{1,\,fast} * [RD2_{free}] * t} + [O]_{slow} * e^{-k_{1,\,slow} * [RD2_{free}] * t}$$

Taking into account the observation that a certain threshold concentration of RD2 had to be exceeded to show any effect on oligomers in brain homogenate, the assumed free RD2 concentration $[RD2]_{free}$ was used for kinetic fits instead of the original concentrations. $[RD2]_{free}$ was calculated by subtracting 4 μM from each of the used concentrations, yielding effective concentrations of 1 and 16 μM. Fits were calculated using the mean concentrations of three technical replicates.

4.9 Quantifizierung von Aβ- und Tau-Aggregaten in caninen Liquorproben

Aβ oligomer elimination decreases tau oligomer concentration in CSF and enhances cognition in cognitively impaired old-aged Beagle dogs – a model of sporadic Alzheimer's disease

Autoren	Janine Kutzsche*, Sarah Schemmert*, Tuyen Bujnicki*, Christian Zafiu, Steffen Halbgebauer, Victoria Kraemer-Schulien, **Marlene Pils**, Lara Blömeke, Julia Post, Andreas Kulawik, Dagmar Jürgens, Wolfgang M. Rossberg, Michael Hümpel, Oliver Bannach, Markus Otto, Joseph A. Araujo, Antje Willuweit, Dieter Willbold * Autoren sind gleichberechtigt
Publiziert in	**Heliyon 9 (2023) e18443** Impact-Faktor: 4,0 (2022) DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e18443
Beitrag	**Eigener Anteil 5%** ▪ Weiterentwicklung der sFIDA-Technologie für den simultanen Nachweis von Aβ sowie Tau Aggregaten in caninen Liquorproben ▪ Unterstützung beim Verfassen und Korrigieren des Manuskripts
Druckgenehmigung	siehe Anhang 28

Heliyon 9 (2023) e18443

Contents lists available at ScienceDirect

Heliyon

journal homepage: www.cell.com/heliyon

Oral treatment with the all-D-peptide RD2 enhances cognition in aged beagle dogs – A model of sporadic Alzheimer's disease

Janine Kutzsche [a,1], Sarah Schemmert [a,1], Tuyen Bujnicki [a,1], Christian Zafiu [a], Steffen Halbgebauer [b], Victoria Kraemer-Schulien [a], Marlene Pils [a,g], Lara Blömeke [a,c], Julia Post [a,c], Andreas Kulawik [a], Dagmar Jürgens [a], Wolfgang M. Rossberg [d], Michael Hümpel [e], Oliver Bannach [a,c,g], Markus Otto [b], Joseph A. Araujo [f], Antje Willuweit [h], Dieter Willbold [a,c,*]

[a] Institute of Biological Information Processing, Structural Biochemistry (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany
[b] Institute of Experimental Neurology, Ulm University Hospital, Ulm, Germany
[c] Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany
[d] ConsultWMR, Potsdam, Germany
[e] KAIROSmetics UG, Berlin, Germany
[f] InterVivo Solutions, Fergus, Canada
[g] attyloid GmbH, Düsseldorf, Germany
[h] Institute of Neuroscience and Medicine, Medical Imaging Physics (INM-4), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:
Alzheimer's disease
Aβ oligomers
Tau oligomers
Cognitively impaired aged Beagle dogs
Sporadic AD animal model
Disease-modifying therapy
Pharmacokinetics
Pharmacodynamics

ABSTRACT

Disease-modifying therapies to treat Alzheimer's disease (AD) are of fundamental interest for aging humans, societies, and health care systems. Predictable disease progression in transgenic AD models favors preclinical studies employing a preventive study design with an early pre-symptomatic treatment start, instead of assessing a truly curative approach with treatment starting after diagnosed disease onset. The aim of this study was to investigate the pharmacokinetic profile and efficacy of RD2 to enhance short-term memory and cognition in cognitively impaired aged Beagle dogs - a non-transgenic model of truly sporadic AD. RD2 has previously demonstrated pharmacodynamic efficacy in three different transgenic AD mouse models in three different laboratories. Here, we demonstrate that oral treatment with RD2 significantly reduced cognitive deficits in cognitively impaired aged Beagle dogs even beyond the treatment end, which suggests in combination with the treatment dependent CSF tau oligomer decrease a disease-modifying effect of RD2 treatment.

1. Introduction

Alzheimer's disease is the most common form of dementia and accounting for 60–70% of the more than 44 million people with dementia worldwide [1]. Cognitively impaired aged Beagle dogs are one of the very few non-transgenic AD animal models that may

* Corresponding author. Forschungszentrum Jülich GmbH Institute of Biological Information Processing, Structural Biochemistry (IBI-7), 52425, Jülich, Germany.
E-mail address: d.willbold@fz-juelich.de (D. Willbold).
[1] Authors contributed equally.

https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18443
Received 24 January 2023; Received in revised form 14 July 2023; Accepted 18 July 2023
Available online 29 July 2023
2405-8440/© 2023 Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

simulate the situation of spontaneous late onset AD, i.e. sporadic AD, which is the most common form of AD in humans. Pathophysiologically, the decline in cognitive proficiency, including memory and learning deficits, is attributed to structural and functional changes in the aging canine brain that reflects AD-like neurodegeneration [2]. Affected dogs exhibit, similar to human AD patients, progressive accumulation of amyloid beta (Aβ) deposits that manifest as cortical diffuse plaques and cerebral amyloid angiopathy (CAA) [2]. Additionally, reduced neurogenesis [3], increased neuronal death [4] and cerebral atrophy [5] have been described. In contrast to human AD patients, development of neurofibrillary tangle pathology has not been described in Beagle dogs; however, they exhibit hyperphosphorylated tau that possibly represents pre-tangle pathology [6].

Age-related cognitive impairment of the dogs parallels the cognitive symptomology of AD. The earliest deficits are most evident in performance on tasks involving working (short-term) memory and complex learning [7]. Affected dogs additionally develop deficits in discrimination learning as well as behavioral changes [8]. In conclusion, these characteristics suggest that aged Beagle dogs are an appropriate AD model for testing disease-modifying effects of new drug candidates for the treatment of AD.

The novel drug candidate RD2 is currently under clinical development for the treatment of AD [9]. RD2 is an all D-enantiomeric peptide, which was designed to directly destabilize, disassemble and ultimately eliminate toxic Aβ oligomers via direct disruption into native Aβ monomers, rather than by relying on the immune system for their degradation. This mechanism of action (MoA) was confirmed by successfully demonstrating target engagement *in vitro, ex vivo* and *in vivo* [10–13]. RD2 has also proven pharmacodynamic activity in three different transgenic mouse models in independent studies conducted in three different laboratories. Treatment with orally applied RD2 enhanced the cognitive performance in two different AD mouse models (APP_{swe}/PS1ΔE9 and APP_{SL}) [10,11,14]. Efficacy was even demonstrated in aged AD mice with fully developed AD-associated pathology at the beginning of treatment resulting in cognition and behavior, which was indistinguishable from that of healthy wild type littermates at the end of treatment [10]. Furthermore, oral treatment with RD2 led to significant deceleration in the development of the motor neurodegenerative phenotype in transgenic TBA2.1 mice expressing human pyroglutamate-Aβ [15]. The aim of the current study was to investigate the pharmacokinetic profile and the efficacy of RD2 on cognition and biomarkers in a non-transgenic AD animal model - aged cognitively impaired Beagle dogs - that is not based on mutations of human early onset familial AD cases and thus is much closer to the situation of sporadic AD in humans. In addition, the cognitive tests were continued beyond the treatment end to be able to discriminate between acute and disease modifying effects.

2. Results

Two separate studies have been carried out. One study was designed as a pharmacokinetic (PK) study to obtain time dependent RD2 levels in blood and cerebrospinal fluid (CSF). The other study was designed as a placebo-controlled interventional study with a low and high once daily dose of RD2 to investigate pharmacodynamic parameters in aged dogs with three months of treatment and two more months after treatment end, "follow up phase". In both studies study dogs were returned to the colony after completion of the study. Sample collection is therefore limited to blood and CSF samples.

2.1. Tolerability of treatment with RD2 and its pharmacokinetics

In the PK study, single intravenous (i.v.) doses of 3 mg/kg and oral (p.o.) doses of 20 mg/kg or 50 mg/kg of RD2 to each of six dogs were overall well tolerated. Intravenous administration of 3 mg/kg of RD2 resulted in hypersalivation in all dogs and trembling in a subset of dogs. After the 20 mg/kg oral dose, one dog demonstrated fasciculation of neck muscles. The events resolved without intervention. No remarkable findings were noted at the 50 mg/kg oral dose level.

The PK study yielded time-dependent plasma and CSF levels of RD2 after single i.v. and p.o. dosing (Fig. 1A–C).

Following intravenous injection of 3 mg RD2 acetate/kg, a total clearance of 1.16 ml/min/kg and an apparent volume of distribution at steady-state of 0.66 l/kg was calculated from the mean AUC (area under the curve) of 28600 ng*h/ml. Plasma levels decreased rapidly from a C_{max} (0.05 h post administration) of 32000 ng/ml to 37 ng/ml. Disposition was in three phases for which half-lives of 0.05, 2.9, and 71 h were estimated. 93% of total AUC was covered by the half-life of 2.9 h, whereas the long terminal phase only covered 3.4% of the total AUC. Following the oral administration of 20 mg RD2 acetate/kg (50 mg RD2 acetate/kg, respectively)

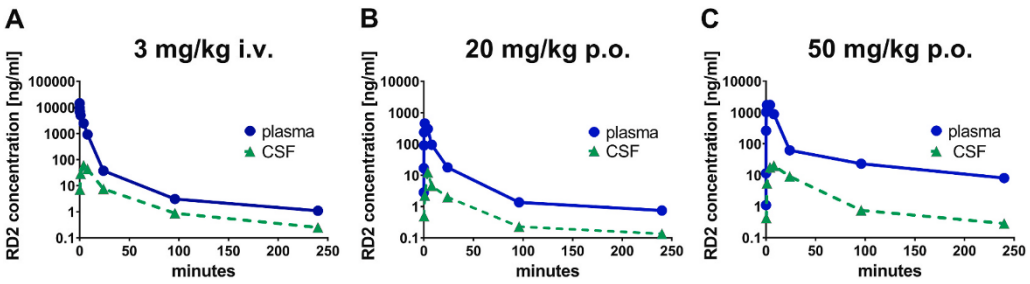


Fig. 1. Concentration-time profiles of RD2 in plasma and CSF following single (A) 3 mg/kg i.v., (B) 20 mg/kg p.o. and (C) 50 mg/kg p.o. administration of RD2 to young dogs (1.7–1.8 years of age). Data are presented as mean; n = 6.

maximum plasma levels of 567 ± 427 ng/ml (2380 ± 2280 ng/ml) were obtained at T_{max} of 2.0 ± 1.6 h (2.7 ± 2.9 h). The AUC was calculated to 3340 ± 1370 ng*h/ml (19800 ± 19700 ng*h/ml) leading to an MRT of 40.0 ± 15 h (35 ± 10 h) and an absolute oral bioavailability of 2.0 ± 0.78% (5.5 ± 4.5%). The half-life of the disposition phase β was estimated from the mean plasma level to be 0.56 h (2.9 h). More than 75% of the total AUC is eliminated with these half-lives of 3 h or shorter and less than 25% of the dose is eliminated with the much longer half-life of the disposition phase γ of 62 h (77 h). There was a more than dose-proportional increase in peak concentrations and AUC from 20 mg/kg to 50 mg/kg oral dosing. The dogs dosed with 50 mg/kg exhibited 2.65 times higher oral bioavailability compared with the mean value of the dogs exposed to 20 mg/kg.

The obtained PK parameters are shown in Table 1 for plasma and in Table 2 for CSF.

The results of the pharmacokinetic evaluation (non-compartment analysis) for RD2 in CSF are given in Table 2. The mean peak CSF level of RD2 in animals treated intravenously with 3 mg RD2/kg was 71 ng/ml 0.05 h post administration. Mean $AUC_{0\text{-tlast}}$ value was 961 h ng/ml and mean residence time 39 h. The mean peak CSF level of RD2 in animals treated orally with 20 mg/kg was 13 ng/ml at 8.0 h post administration and with 50 mg/kg 21 ng/ml at 8.7 h post administration. Mean $AUC_{0\text{-tlast}}$ value were 180 h ng/ml for the 20 mg/kg treated animals and 614 h ng/ml for the 50 mg/kg treated animals. An AUC based CSF/plasma ratio of 0.031 (3 mg/kg iv) to 0.066 (20 mg/kg po) shows that RD2 is able to penetrate the brain.

Most importantly for the following treatment study is that the oral bioavailability of RD2 was between 2.0 and 5.5%. Elimination upon oral application followed a fast phase with a half-live between 0.6 and 2.9 h and a slow phase, which accounts for about 25% of the AUC, with a half-live of about 70 h. RD2 crossed the blood-brain-barrier with a ratio of AUCs in CSF and blood between 2.5 and 6.6%. High inter-individual differences in RD2 levels in the dogs of the PK study have been observed.

During the 3-month treatment phase of the interventional study (Fig. 3A), on day 80, one dog had to be euthanized. Unblinding revealed that this dog was in the placebo cohort. On day 123 (30 days after treatment end), another dog needed to be euthanized. Unblinding revealed that the dog was in the low dose (3 mg/kg/day) cohort. The causes of morbidity (forelimb paralysis and progressing vestibular disease, respectively) were considered consequences of underlying age-related background diseases in these old dogs. All other dogs survived the study and were returned to the colony at study conclusion.

In the therapeutic study (Fig. 3A) blood samples were collected before and after three months of oral treatment for hematological (complete blood count) and clinical chemistry analyses including liver function tests (Tables S1, S2 and S3). In addition, RD2 levels in plasma (Fig. 2A) and CSF (Fig. 2B) were determined before and after one, two and three months of treatment.

Increases of triglyceride and CK-MB concentrations after 3 mg/kg and 30 mg/kg RD2 p.o. compared to in-group baseline values, although statistically significant, were minor and comparable with the changes in the placebo group (Figs. S1 and S2). Another remarkable finding was the presence of Döhle bodies in neutrophils of three out of 12 dogs after three months treatment with 30 mg/kg (once daily). The occurrence of Döhle bodies is often interpreted as a marker for inflammatory processes in dogs [16]. In the absence of changes in neutrophil, total white blood cell and platelet counts, this occurrence was most probably not of toxicological relevance.

2.2. Efficacy parameters

The treatment study was designed to investigate RD2's efficacy on cognitive outcome measures as the primary endpoint, as cognitive impairment is the predominant and most relevant symptom in human AD patients.

2.2.1. RD2 significantly decreased cognitive deficits compared to baseline even beyond the end of treatment

Dogs were tested on a variable-delay paradigm of the DNMP (delayed non-matching to position) test using delays of 20 s and 90 s. The task was performed in 5-day intervals to assess spatial working memory. Testing occurred during baseline and subsequently once a month - at three time points during the treatment phase and at two time points after treatment end (Fig. 3A). The mean performance

Table 1
Pharmacokinetic parameters for RD2 in plasma after single administration of RD2.

Parameter	3 mg/kg (i.v.) Mean ± SD	20 mg/kg (p.o.) Mean ± SD	50 mg/kg (p.o.) Mean ± SD
t_{max} (h)		2.0 ± 1.6	2.7 ± 2.9
C_{max} (ng/ml)	32000 ± 18200	567 ± 427	2380 ± 2280
$t_{1/2\ \alpha}$ (h)	0.046	n.c.	n.c.
[1]% of AUC	3.6	n.c.	n.c.
$t_{1/2\ \beta}$ (h)	2.9	0.56	2.9
[2]% of AUC	93	78	76
$t_{1/2\ \gamma}$ (h)	71	62	77
[a]% of AUC	3.4	22	25
$AUC_{0\text{-tlast}}$ (h·ng/ml)	29900 ± 4230	3340 ± 1370	19800 ± 19700
$AUC_{0\text{-inf}}$ (h·ng/ml)	28600 ± 2540	3890 ± 1120	26000 ± 21900
CL_{total} (ml/min·kg)	1.2 ± 0.11		
MRT (h)	9.4 ± 1.0	40 ± 15	35 ± 10
V_{ss} (ml/kg)	659 ± 140		
F (%)	100	2.0 ± 0.78	5.5 ± 4.5

n.c. denotes not calculable, [1]% of AUC covered by $t_{1/2\ \alpha}$, [2]% of AUC covered by $t_{1/2\ \beta}$.
[a] % of AUC covered by $t_{1/2\ \gamma}$.

Table 2
Pharmacokinetic parameters for RD2 in CSF after single administration.

Parameter	3 mg/kg (i.v.) Mean ± SD	20 mg/kg (p.o.) Mean ± SD	50 mg/kg (p.o.) Mean ± SD
t_{max} (h)	4.2 ± 2.2	8.0 ± 8.0	8.7 ± 7.8
C_{max} (ng/ml)	71 ± 32	13 ± 15	21 ± 18
Apparent $t_{1/2}$ (h)[a]	80 ± 5.6	190 ± 93	119 ± 37
$AUC_{0\text{-tlast}}$ (h·ng/ml)	961 ± 373	180 ± 77	614 ± 592
$AUC_{0\text{-inf}}$ (h·ng/ml)	990 ± 383	242 ± 47	659 ± 605
$MRT_{0\text{-inf}}$ (h)	39 ± 4.0	155 ± 131	97 ± 47
CSF/Plasma $AUC_{0\text{-inf}}$	0.031 ± 0.011	0.066 ± 0.021	0.025 ± 0.020

[a] half-life is estimated from the last 2 time points and thus may not be accurate.

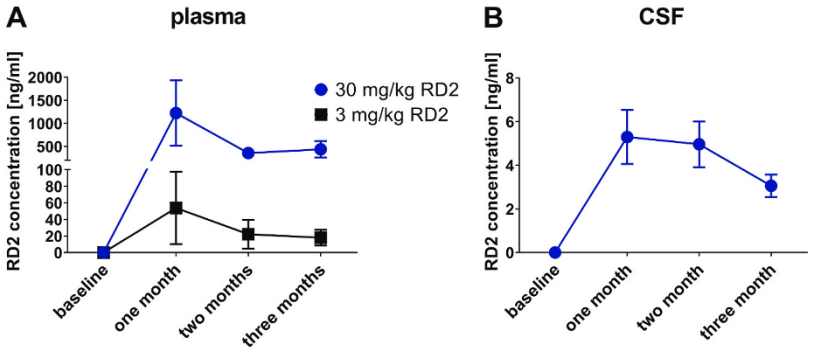


Fig. 2. Concentration-time profiles of RD2 in (A) plasma and (B) CSF following daily oral administration of 3 mg/kg or 30 mg/kg of RD2 for three months. CSF-values of 3 mg/kg treated animals were below the lower limit of quantification (LLOQ) of 0.5 ng/mg and were therefore excluded from the graph. Data is presented as mean±SEM; n = 11 to 12.

accuracy across delays (20 s and 90 s combined) was analyzed using two-way repeated-measure ANOVA with testing time-point serving as a within-subject measure (Fig. 3B). The dogs in all three cohorts exhibited a practicing effect due to the repeated performance of the test. While this seemed to be a small tendency in the placebo group, dogs in the treatment cohorts showed a significant cognitive enhancement relative to their baseline level, which even extended beyond the end of the treatment period in the high dose group. Significantly enhanced cognitive performance was reached in dogs treated for only one month with high doses (30 mg/kg) of RD2, leading to RD2 levels of 5 ng/ml on average in CSF (Fig. 2B), or two months with low doses (3 mg/kg) of RD2. The results obtained in the DNMP test suggested a benefit of RD2 on working memory. After the follow up period of one and two months after treatment end, dogs previously treated with 30 mg/kg daily maintained significant increase in performance in DNMP accuracy compared to baseline.

As second cognitive task, variable discrimination testing with variable oddity was performed in order to assess selective attention performance of the dogs during treatment. As impairment in tasks involving complex learning develops earlier than in simple discrimination learning [8,17–19], the conditions with none or one distractor were excluded from analysis. RD2 enhanced learning on the more difficult conditions (two or three distractors) of the variable discrimination task in the low dose group at two months of treatment and in the high dose group at three months of treatment compared to baseline, but had no effect on the easier conditions. Percent accuracy was analyzed using a two-way repeated-measure ANOVA with test time-points serving as within subject measures. No significant learning effect of placebo treated Beagle dogs was found (Fig. 3C).

2.2.2. Analysis of neuropathological biomarkers in CSF and plasma

Neuropathological biomarkers were longitudinally assessed by analysis of Aβ42, total tau, GFAP, NfL and β-synuclein in CSF samples and for NfL in plasma (Fig. 4). Significant differences between the treatment groups were found only in total Aβ42 concentrations. Significantly lower concentrations were observed in placebo compared to 3 mg/kg RD2 treated animals at baseline, after 3 months of treatment and two months follow up and to 30 mg/kg RD2 treated animals after 3 months of treatment.

2.2.3. Analysis of Aβ oligomers and tau oligomers in CSF

Aβ oligomer and tau oligomer levels were assessed in CSF before and after three-month treatment by means of the oligomer-specific sFIDA assay [13,20–24]. In the surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) assay, Aβ and tau oligomers were captured on a glass surface by a monoclonal anti-Aβ antibody directed against the N-terminus of Aβ and a monoclonal anti-tau antibody directed against the proline rich region P2. After immobilization, the captured oligomers were detected by the same antibodies, which were fluorescence-labeled. Therefore, fluorescence-labelling of capture-bound Aβ or tau monomers was excluded, thus rendering the assay insensitive for monomeric Aβ and tau. The assay surface was imaged by a multi-color total internal reflection

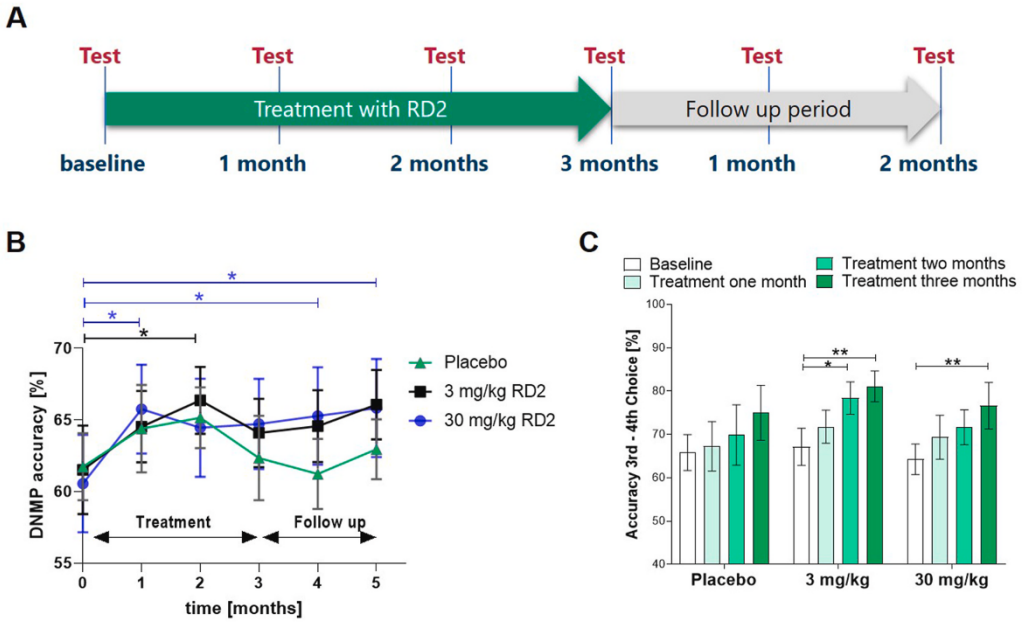


Fig. 3. Study design and cognitive testing outcomes. A: Treatment and cognitive testing time scheme of the interventional study. B: Percent mean performance accuracy in the DNMP assay combined at 20 s and 90 s delay in placebo versus low (3 mg/kg daily) and high oral RD2 dosed (30 mg/kg daily) dogs. Two-way RM-ANOVA (followed by Fisher post hoc test) revealed significantly enhanced performance ($p < 0.05$) after one month of treatment compared to baseline in the high dose cohort and after two months treatment in the low dose cohort. The significant treatment effect (*$p < 0.05$) in the high dose group was maintained two months upon treatment end. Data is presented as mean ± SEM; n = 11 to 12. C: Percent mean performance accuracy on the selective attention - variable oddity performance combined across the 2 and 3 distractor conditions in placebo vs. low dose and high dose dogs treated with RD2. A two-way RM ANOVA (followed by Fisher post hoc test) revealed a significantly enhanced cognitive performance after three months of treatment of both treatment groups (**$p < 0.01$), and 3 mg/kg after two months of treatment (*$p < 0.05$). Data is presented as mean ± SEM; n = 11 to 12.

fluorescence (TIRF) microscope. The number of pixels above a given background cutoff in each fluorescence channel directly correlates with the concentration of Aβ oligomers (Fig. 5A–C) or tau oligomers (Fig. 5D–F) in the sample.

No significant changes in Aβ oligomer concentrations were found neither between baseline and the three-month treatment time point in the treatment groups (Fig. 5A–C) nor between the treatment groups (Fig. 5D). However, the treatment with 30 mg/kg RD2 led to a stagnation, if not a reduction, of the tau oligomer concentrations ($p = 0.073$) (Fig. 5G), while tau oligomer concentrations in 3 mg/kg RD2 (Fig. 5F) and placebo treated groups (Fig. 5E) increased significantly during the three months period (3 mg/kg $p = 0.0043$; placebo $p = 0.027$). In addition, the comparison between the treatment groups showed significant differences between 30 mg/kg RD2 and both other treatment groups (Fig. 5H, $p = 0.016$ for placebo vs. 30 mg/kg RD2, $p = 0.0051$ for 3 mg/kg vs. 30 mg/kg).

2.2.4. Correlation of RD2 plasma levels with CSF Aβ oligomer and tau oligomer concentrations

Because the treatment study was designed to investigate RD2's efficacy on cognitive outcome measures as the primary endpoint, recruitment of the 36 dogs for the study was based on age and their cognitive status measured in three baseline cognitive tests (discrimination learning, delayed non-matching to position (DNMP) and attention as described in the methods). It was not based on typical human AD biomarker concentrations in CSF, like Aβ42 and tau, or brain imaging data. Thus, it must be expected that recruitment included not only dogs into the study that were cognitively impaired solely due to AD-like pathology, but also due to a reasonable fraction of other age- or non-age-related diseases or other constraints. To take this important background information into account, correlation analyses were carried out, which are able to reveal dose-response relationships based on individual drug plasma and exposure levels of the dogs.

We examined the correlations of RD2 concentrations in plasma with Aβ oligomer (Fig. 6A) and tau oligomer (Fig. 6B) concentrations in CSF after three months of treatment by performing Spearman correlation analyses. Whereas both analyses yielded inverse correlations as expected, the RD2 plasma level correlation with Aβ oligomer concentrations did not become significant (Fig. 6A, Spearman −0.234, p-value 0.170). The correlation of RD2 plasma levels with tau oligomer concentrations after three months of treatment, however, was strong and significant (Fig. 6B, Spearman −0.530, p-value 0.00090). Thus, as expected from a successful treatment, also the correlation between RD2 plasma levels and the changes of tau oligomer concentrations (three months treatment vs. baseline) was inverse, strong and significant (Fig. 6D, Spearman −0.493, p-value 0.0024).

In humans, the most reliable biomarker for AD is the longitudinal decrease of total Aβ42 in CSF. In the here described treatment study, we observed a significant difference between the 30 mg/kg dose group and the placebo group after 3 months treatment, which

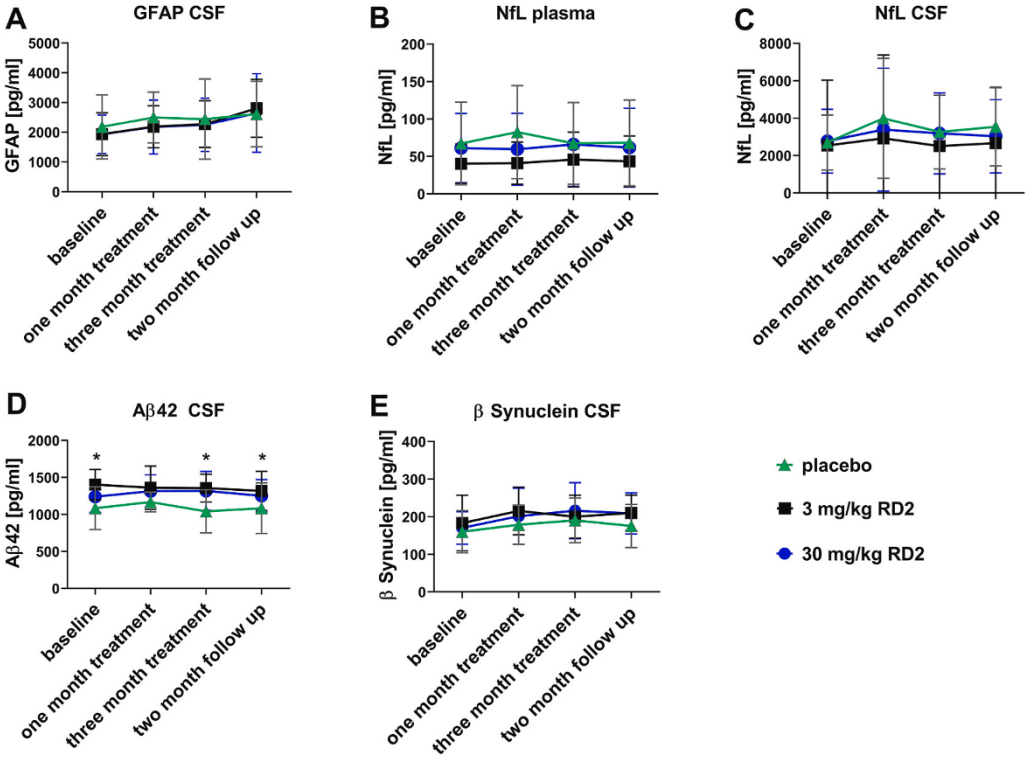


Fig. 4. CSF and blood based biomarkers. (A) Concentrations of GFAP in CSF, (B) NfL in plasma, (C) NfL in CSF (D) Aβ42 in CSF, and (E) β-synuclein concentrations in CSF of placebo, 3 mg/kg and 30 mg/kg treated animals with RD2 were longitudinally determined. Statistical calculations were conducted using a two-way RM ANOVA (followed by Fisher post hoc test). A significant difference between placebo and 3 mg/kg RD2 treated animals (marked by *) was shown for Aβ42 levels at baseline ($p = 0.004$), after 3 months of treatment ($p = 0.004$) and two months after treatment end ($p = 0.031$) and between placebo and 30 mg/kg RD2 treated after 3 months of treatment ($p = 0.009$). Data is presented as mean ± SEM; $n = 11$ to 12; *$p < 0.05$; **$p < 0.01$.

was not significant at baseline (Fig. 4D). Because groups have not been randomized for Aβ42 levels in CSF, and the 3 mg/kg dose group had Aβ42 CSF levels significantly higher than placebo already at baseline, the overall significant and positive correlation between Aβ42 CSF levels and RD2 plasma levels may be interesting (Fig. 6C, Spearman 0.407, p-value 0.017).

Most remarkably, treatment-dependent changes of DNMP accuracy were found at three months of treatment as shown by the positive and significant correlation of RD2 plasma levels with the changes of DNMP accuracy at three months treatment versus baseline (Fig. 6E, Pearson 0.37, p-value 0.0262). This positive correlation did not disappear two months after treatment end, but became even stronger and more significant (Fig. 6F, Pearson 0.457, p-value 0.0066) suggesting a disease modification.

2.2.5. Correlation of CSF Aβ oligomer concentrations and selective attention

We examined the correlation of changes (after three months treatment versus baseline) of CSF Aβ oligomer concentration with changes of selective attention (Fig. 7). Changes of CSF Aβ oligomer concentrations inversely correlated with changes of selective attention for all animals (Fig. 7D; Spearman −0.412, p-value 0.0127). Separate analyses yielded significant and negative correlations between the individual changes in absolute Aβ oligomer concentrations and individual changes in selective attention for both RD2 treated cohorts (Fig. 7 B, C), but not for the placebo cohort (Fig. 7A). Thus, the more RD2-dependent reduction or stagnation of Aβ oligomer concentrations, the more the dogs did improve in the cognitive tests. The absence of this correlation in the placebo group may indicate that cognitive deficits indeed are not solely due to Aβ pathology, but some dogs had cognition deficits due to other reasons. Treatment effects with RD2, however, may drive cognition enhancements strong enough in the responsive fraction of dogs in the treated cohorts in order to outweigh the effects of non-responders. Such an effect is, of course, not present in the placebo group.

2.2.6. Correlation between CSF Aβ oligomer and tau oligomer concentrations

We found a significant and positive correlation between Aβ oligomer and tau oligomer concentrations, at baseline (Fig. 7A, Spearman 0.505, p-value 0.0018), after three months of treatment with RD2 or placebo (Fig. 7B, Spearman 0.306, p-value 0.029), and for the individual differences between both time points (Fig. 7C, Spearman 0.371, p-value 0.026). This indicates a robust correlation between Aβ oligomer and tau oligomer concentrations in CSF. To our knowledge, this is the first report of such a correlation in dogs.

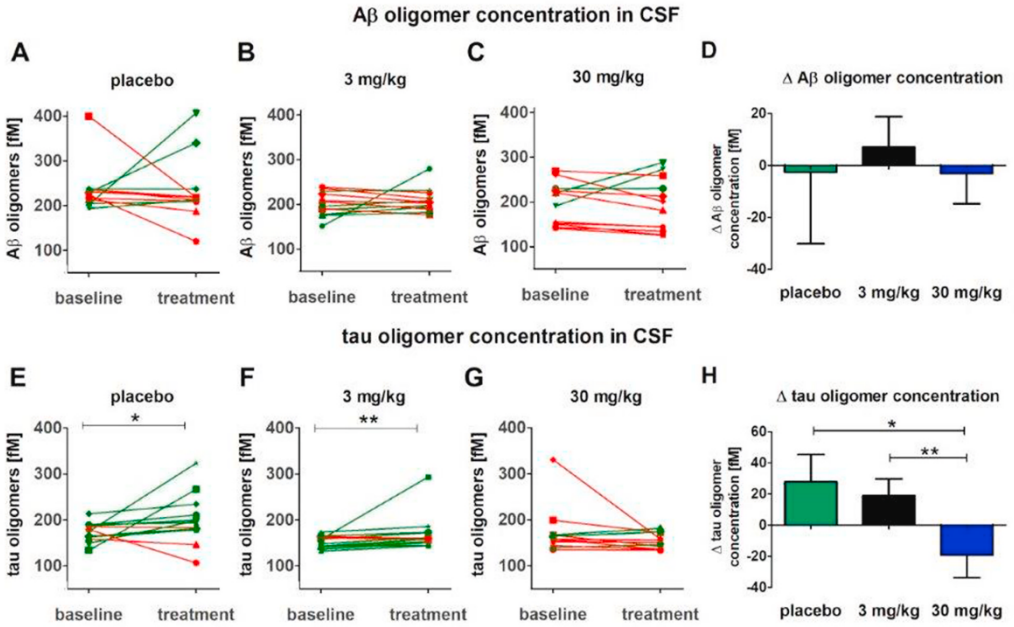


Fig. 5. Aβ oligomer and tau oligomer concentrations in CSF. Aβ oligomer (A–C) and tau oligomer concentrations (E–G) in CSF of placebo, 3 mg/kg and 30 mg/kg treated animals with RD2 were determined with sFIDA assay. A green connection line indicates a positive change and a red line indicates a negative change. Pairwise comparison with one-sided Wilcoxon signed-rank test showed no significant difference between baseline and three-month treatment in Aβ oligomer concentrations in any of the treatment groups (A–C), and in tau oligomer concentration in the 30 mg/kg RD2 group (G). In placebo (E) and 3 mg/kg RD2 (F) treated animals the tau oligomer concentration is significantly increased after three-month treatment compared to baseline. Changes (Δ) of Aβ oligomer (D) and tau oligomer (H) levels were calculated by subtracting baseline values from three-month treatment values. A negative change indicates a reduction of oligomer concentration, and a positive change indicates an increasing of oligomer concentration after treatment. A Mann-Whitney *U* test revealed a significant difference in Δ tau (H) between the 30 mg/kg RD2 group and both other treatment groups. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$. Data is presented as mean ± SEM; $n = 12$. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

3. Discussion

Among the numerous transgenic AD animal models, none is able to exert the full spectrum of human AD pathology together with typical cognition deficits observed in human AD patients. Our interventional study in cognitively impaired aged Beagle dogs is thus an unprecedented effort to show efficacy of a drug candidate, which was developed for disease modification and for beneficial effects on AD-relevant cognitive impairment, in a non-transgenic animal model of AD.

The pharmacokinetic study yielded an oral bioavailability of RD2 in blood between 2.0 and 5.5%. Elimination upon oral application was observed in two phases with a terminal half-live of about 70 h, very similar as was found for humans [9]. RD2 did cross the blood-brain-barrier with CSF-blood ratios between 2.5 and 6.6% indicating that the compound reaches its target organ, the brain. Orally administered RD2, at single doses of 20 mg/kg or 50 mg/kg in the PK study and at daily doses of 3 mg/kg and 30 mg/kg over three months in the interventional study, was well tolerated by the dogs. Also, the single intravenous dose of 3 mg/kg did not result in signs of intolerability. Laboratory investigations (hematology and blood clinical chemistry) as part of the 3-month efficacy study revealed no signs of severe adverse effects.

The interventional study was designed to investigate RD2′s efficacy on cognitive outcome measures as the primary endpoint, since cognitive decline is the major symptom in human AD patients. Recruitment of the study dogs was, therefore, based on age and the extent of cognitive deficits and not based on CSF biomarkers, like Aβ42 and tau, or brain imaging data. As a consequence, it must be expected that a reasonable fraction of dogs had their cognitive impairments due to other age- or non-age-related causes and not solely due to AD-like pathology. This is important to keep in mind, when analyzing the outcome the study. One way to deal with the unknown ratios of animals with or without AD-like pathology in the respective treatment cohorts would be to analyze only “responders” to the study drug for efficacy. For reasons of transparency, however, and because a responder analysis is not possible in the placebo group, we additionally carried out correlation analyses between several measures in order to account for potential non-responders within the treatment cohorts. Such correlation analyses can be used to explore expected dose-response relationships, because they consider the high inter-individual differences in drug exposure at a given oral dose. Thus, especially the correlations of any outcome measure with RD2 plasma levels can be expected to provide valuable results on dose-response relationships.

For assessment of deficits in working memory before and during the study, a delayed non-matching-to-position (DNMP) task was

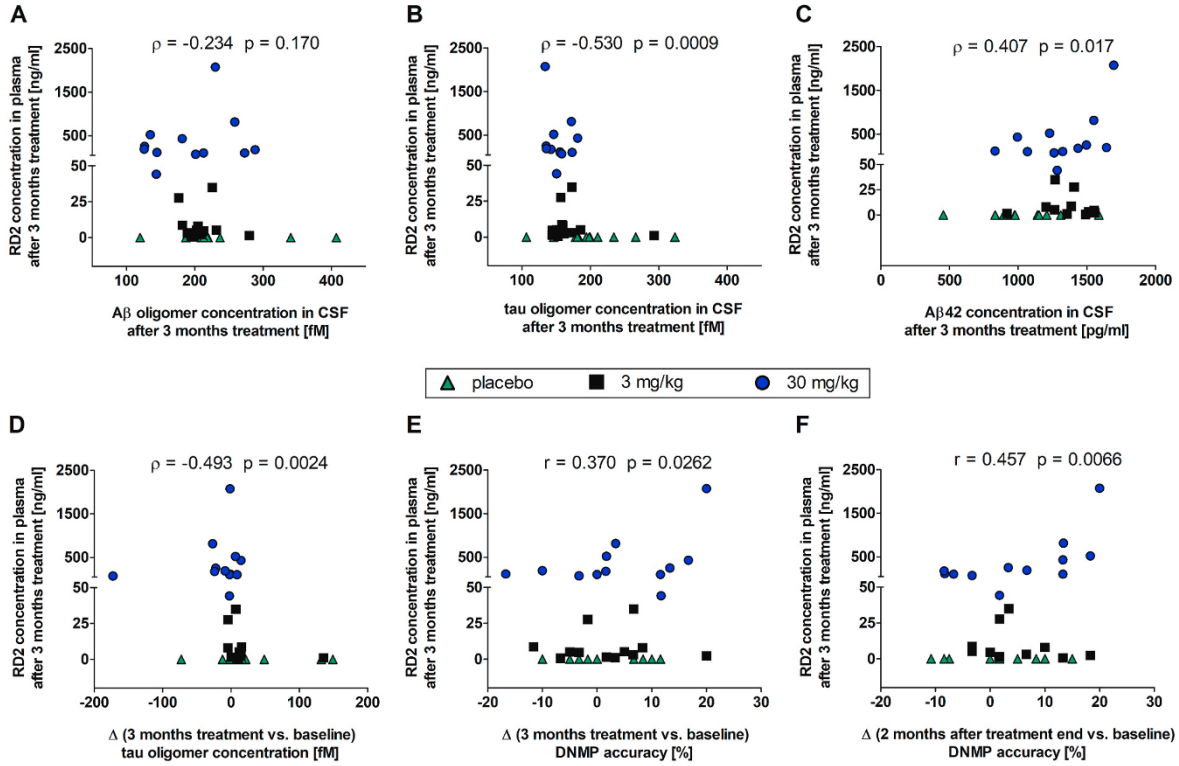


Fig. 6. Dose-response relationships. Correlations of RD2 concentration in plasma with Aβ oligomer, tau oligomer and Aβ42 concentration and with DNMP accuracy. A–C: Correlations of RD2 concentration in plasma with Aβ oligomer (A), tau oligomer (B) and Aβ42 (C) concentrations in CSF after 3 months treatment. D: Correlation of RD2 concentration in plasma with changes of tau oligomer concentration. E, F: Correlation of RD2 concentration in plasma with treatment-dependent changes of DNMP accuracy. Changes (Δ) were calculated by subtracting baseline value from three-month treatment value (D, E) or from two-month after treatment end value (F). Correlations of RD2 in plasma with all parameters except Aβ oligomer concentration were statistically significant. Correlation was performed with Pearson (r) and Spearman (ρ) analysis at alpha level 0.05 with n = 11 to 12.

performed. To assess complex learning the variable discrimination learning task was conducted. Small positive practicing effects on the DNMP outcome during the first two months were observed in all groups but did not become significant in the placebo group. Significant increase of DNMP accuracy compared to baseline was observed in the high dose (30 mg/kg once daily) and the low dose (3 mg/kg once daily) group after one or two months, respectively. The significant increase in DNMP performance in the RD2 dosed groups suggests beneficial effects of RD2 on working memory. The effect was still present one- and two-months after treatment end in dogs treated with high dose RD2. In dogs treated with the low dose a prolonged impact on cognitive performance beyond treatment stop was also visible, but did not reach statistical significance ($p = 0.06$). This suggests a dose-dependent and disease-modifying effect on neuroprotection from Aβ oligomer induced toxicity (Fig. 3B). This is further supported by the positive and significant correlation of DNMP difference (three months treatment values versus baseline values) with RD2 plasma levels at month three with respect to a dose-response relationship (Fig. 6E).

RD2 treatment enhanced learning compared to baseline in the variable discrimination task in the low and the high dose group from two and three months of treatment onward, respectively, which implies a benefit of treatment on complex learning (Fig. 3C). Because reversal learning was assessed after the three months test, which required subjects to respond to their non-preferred object, the variable discrimination task was not useable to evaluate changes in selective attention during the follow up period. We found a significant and positive correlation between the results of the DNMP and the selective attention tests in the dogs of the placebo cohort at all time points available (Fig. S3F). This indicates that both tests are robustly measuring memory and cognition deficits in dogs.

Longitudinal monitoring of neuropathological biomarkers in the different treatment groups were assessed by ELISA analysis of CSF and blood samples (Fig. 4). None of the biomarkers was significantly different between the groups, except Aβ42 levels, which were different between groups at some time points, including baseline, reflecting the high inter-individual variability of the dogs.

RD2's mode of action (MoA) is to stabilize Aβ monomers in their native intrinsically disordered protein (IDP)-like conformation, thereby destabilizing Aβ oligomers to ultimately disassemble them into Aβ monomers. This MoA was confirmed by respective successful target engagement *in vitro* [11] *ex vivo* [13] and *in vivo* in brain homogenates from RD2-treated versus placebo-treated transgenic mice using sFIDA analysis [10]. Therefore, also in the present study, Aβ oligomer, but also tau oligomer levels, were determined by sFIDA analysis in CSF from the dogs at baseline and after three months of treatment. No significant changes in Aβ

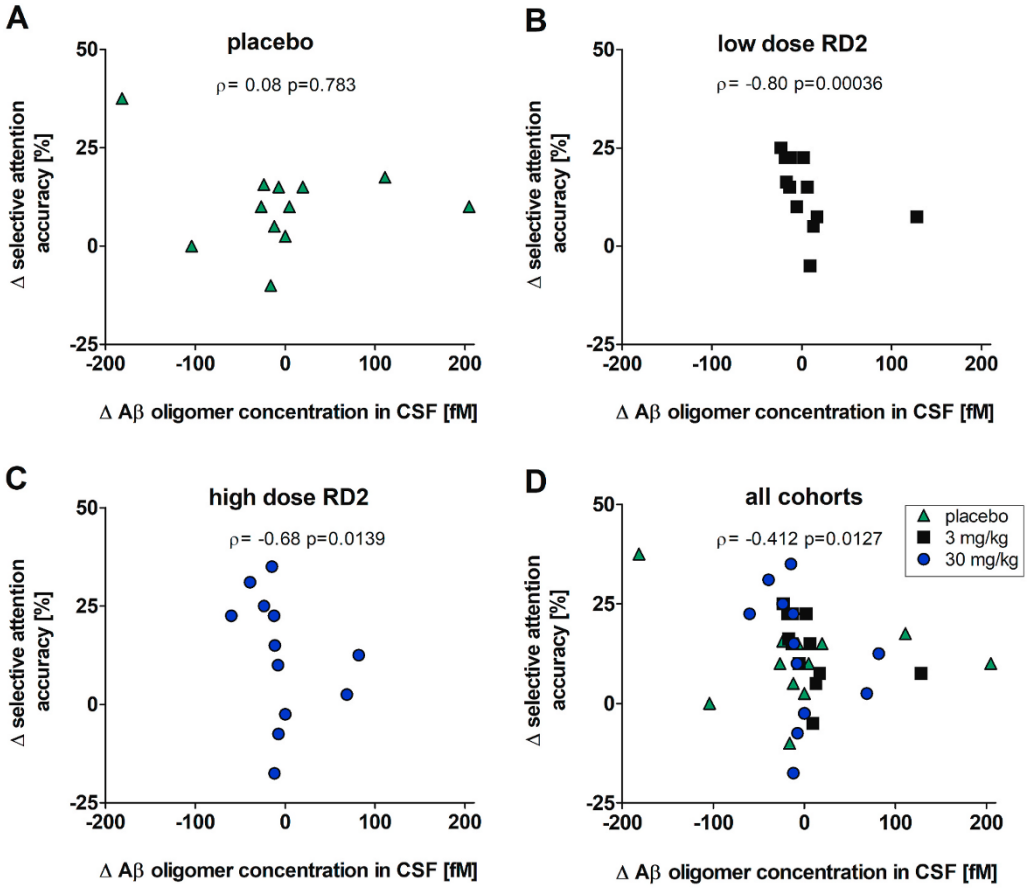


Fig. 7. RD2 treatment dependent Aβ oligomer concentration change and its correlation with selective attention outcome. Correlation of changes of CSF Aβ oligomer concentrations with changes of selective attention accuracy. A: Correlation for placebo group. B: Correlation for low dose treated animals with 3 mg/ml RD2. C: Correlation for high dose treated animals with 30 mg/ml RD2. D: Correlation for all groups (placebo, low dose and high dose) together. Changes (Δ) were calculated by subtracting baseline value from three-month treatment value. Correlations of the low dose group, high dose group and all cohorts were significant. No significant correlation was found for the placebo group. Correlation was performed with Spearman (ρ) analysis at alpha level 0.05 with n = 11 to 12.

oligomer levels, however, were observed in any of the groups during three months of treatment (Fig. 5A, B, C) or between the groups (Fig. 5D).

In contrast, tau oligomer levels in CSF increased significantly during the treatment duration in the placebo and low dose groups, while high dose treatment led to an overall stagnation of the tau oligomer levels (Fig. 5 E, F, G). Most individuals of this group showed even a reduction of tau oligomer levels in CSF upon treatment leading to statistical significance between the high dose and the other groups (Fig. 5H). There was a correlation between the Aβ and tau oligomer levels at baseline and at three months treatment (Figs. S3A and B). Why RD2 treatment in cognitively impaired Beagle dogs yielded significant reduction of tau oligomers but not of Aβ oligomers, at least under the described dosing and recruitment regime as well as the treatment duration, remains to be investigated. There are more and more data which suggest that the progression of AD may be driven by the synergistic interaction between tau and Aβ species [25,26]. Thus, targeting Aβ oligomers may possibly lead to effects on downstream targets like tau oligomers. The significant inverse correlation of RD2 plasma concentrations and tau oligomer levels after three months of treatment (Fig. 6B) supports this hypothesis.

Adding on the discussion above concerning the certainly suboptimal recruitment conditions, it is interesting to look again at the significant correlations between the individual changes in absolute Aβ oligomer concentrations (three-month treatment values minus baseline values) and individual changes in selective attention (three-month treatment values minus baseline values) for both RD2 treated cohorts (Fig. 7 B, C), but there was no such correlation for the placebo cohort (Fig. 7A). This is not only suggesting that RD2 treatment led to reduction or stagnation of CSF Aβ oligomer concentrations, but the absence of this correlation in the placebo group suggests that cognitive deficits in the recruited animals are not solely due to Aβ pathology but also due to other reasons. Treatment effects with RD2, however, may drive cognition enhancements strong enough in the responsive fraction of dogs to outweigh the effects of non-responders (Fig. 7D). Such an effect, of course, cannot be expected and was not found in the placebo group.

The here presented study, which investigated the pharmacokinetic profile and the efficacy of RD2 on cognition and AD-relevant

biomarkers, especially Aβ oligomers and tau oligomers in CSF, using aged cognitively impaired Beagle dogs as a non-transgenic model of sporadic AD has certainly limitations concerning the recruitment strategy. Anyway, we demonstrate that RD2, with its unique MoA of disassembling Aβ oligomer complexes into Aβ monomers, crosses the blood-brain barrier in dogs and exerts beneficial effects on cognition and tau oligomer levels in CSF after oral administration. This has promising implications for the ongoing clinical development of RD2. Apart from the treatment results, the study shows that tau pathology is present in cognitively impaired old Beagle dogs, even if not in the form of tau tangles, but as tau oligomers in the CSF. The fact that their levels correlate with the levels of Aβ oligomers may be another relevant finding for dogs in general, and for this animal model for sporadic AD.

4. Methods

4.1. Study compound

The all-D-peptide RD2 (sequence: ptlhthnrrrrr, CBL Patras, Patras, Greece) consists of 12 D-enantiomeric amino acid residues with its C-terminus being amidated.

4.1.1. Test article and administration

Different batches of the acetate salt of RD2 were used as the test article in the canine studies. The compound was maintained at ultracold temperatures but thawed to room temperature for preparation of the dosing formulations.

Two separate studies have been carried out. One study was designed as a pharmacokinetic study to obtain time-dependent RD2 levels in blood plasma and CSF. The second study was designed as an interventional study to investigate pharmacodynamics parameters during three months of treatment and two more months after treatment end. The latter two months period is sometimes referred to as the "follow up phase".

For oral application in the pharmacokinetic (PK) study, RD2 acetate was dissolved in sterile aqueous 0.9% NaCl, the pH was adjusted to 7.0 to 7.4 with NaOH. Solutions were prepared one day prior to dosing and kept refrigerated until 30 min prior to administration. The solutions contained 10 mg/ml or 25 mg/ml of RD2 acetate and were administered by oral gavage with a volume of 2 ml/kg (final dose 20 or 50 mg/kg). For the dosing procedure, the gavage tube was inserted into the stomach and 5 ml of tap water was flushed to ensure proper positioning. Then the test product was administered via syringe through the tube followed by 10 ml tap water.

For intravenous administration in the PK study, RD2 acetate was dissolved as described above. The solution contained 3 mg/ml and was administered by a single intravenous injection over 30 s with a dosing volume of 1 ml/kg. Injection was through a cephalic vein catheter that was flushed with 1 ml of sterile saline.

For oral application during the interventional study, RD2 acetate was administered as powder without excipients in hard gelatin/hypromellose (HPMC) capsules (Torpac, size 00). Empty capsules were used as placebo control. Amounts in the capsules were adjusted to the RD2 acetate dose of 3 or 30 mg/kg body weight (low or high dose). Prepared capsules were kept refrigerated until required for administration. On each assessment or collection day, dosing was staggered such that dogs were dosed 1 h (±15 min) prior to their cognitive assessment or 1-h (±10 min) prior to cerebrospinal fluid (CSF) collections. When none of these procedures were applied, the animals were dosed at approximately the same time daily.

4.2. Animals

Male and female Beagle dogs were obtained from the InterVivo Solutions Inc. colony. For the PK study 4 male and 4 female dogs and for the cognitive assessment study 12 male and 24 females were included. At study initiation, the age of the dogs for the PK study ranged from 1.7 to 1.8 years (1.8 ± 0.05). The age of the dogs for the interventional study ranged from 7 to 15 years (9.8 ± 2.5 years). Animals were included in the study after passing a general health evaluation.

4.2.1. Test site and approval

All animal experiments were performed at the site of InterVivo Solutions, Fergus, Canada, in accordance with principles of the Animal for Research Act of Ontario and the guidelines of Canadian Council on Animal Care (CCAC) and were approved by the Study Facility's Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) (approval number VRI108-17182-CE).

4.2.2. Pharmacokinetic (PK) study

The study was a randomized, non-blinded, preclinical study using a within-subject, incremental dose, design. The objective of the study was to evaluate the pharmacokinetic parameters of RD2, following a single intravenous or oral administration of RD2 acetate to Beagle dogs. Doses of 3 mg/kg (Day 0) were used for intravenous administration; 20 mg/kg (day 12) and 50 mg/kg (day 28 were used for oral administration. The concentration of RD2 was determined in serially collected blood plasma samples (3, 5, 10, and 20 min post dose, and 1, 4, 8, 24, 96, and 240 h post dose). Cerebrospinal fluid (CSF) samples were also serially collected (20 min post dose, and 1, 4, 8, 24, 96, and 240 h post dose) from the cisterna magna of the dogs while under isoflurane anesthesia.

A total of six (three male and three female) dogs were used to test each dose level. A washout period of at least 11 days was allowed before the same animal were treated with another dose. For serial sample collection procedures, animals were held in metabolic cages for observational purposes. Dogs were fed a standard commercial dry diet. Food consumption was not recorded. Water was provided ad libitum, except within 30 min prior to the start of anaesthetic procedures. Animal body weights were determined with a certified, verified scale prior to the beginning of each treatment arm. The recorded weights were used to determine individual treatment doses.

Dosing sequence was started with 3 mg/kg intravenous (n = 6), followed by 20 mg/kg oral (n = 6) and 50 mg/kg oral (n = 6).

4.2.3. Study for evaluation of RD2 treatment-dependent cognitive parameters and CSF levels of Aβ and tau oligomers

This blinded preclinical study employed a controlled, parallel matched-group design. Following a baseline study phase including cognitive assessment, animals were allocated to one of three treatment groups (n = 12 dogs per group) balanced for initial cognitive performance to the extent possible. One group was assigned to receive a high oral dose of RD2 acetate (30 mg/kg once daily), while a second group received a low oral dose of RD2 acetate (3 mg/kg once daily). The third group was assigned to receive placebo. RD2 acetate or the placebo were administered orally once a day for three months. Test product and placebo were washed in for 17 days prior to initiation of treatment phase cognitive assessments. Following approximately three months of administration (93 days), cognitive function tests were repeated following two and six weeks of treatment washout.

For allocation of animals to treatment groups, the baseline phase cognitive status of the dogs was used to balance cognitive groups. Animals meeting the inclusion/exclusion criteria were ranked in descending order based on the three baseline cognitive tests (discrimination learning, delayed non-matching to position (DNMP) and attention), such that the best performing animals on each test received a rank of 1, and the poorest performing animals received a rank of 36. In the event that two or more animals had the same score, these subjects were ranked equally using the median rank according to the number of animals (i.e. if two animals had an equal score for ranks 4 and 5, then both were assigned a rank of 4.5 on the test; if three animals had an equal score for ranks 4, 5 and 6, then all three animals were assigned a rank of 5 on the test). The rank scores across the three tests were summed up for each animal and the rank sum was then used to rank dogs from highest performing to lowest performing using the procedures described above for animals with identical rank sums. Subsequently, subjects were then allocated to treatment groups based on rank sums such that rank sums 1, 2 and 3 were placed into treatment groups 1, 2 and 3 and rank sums 4, 5 and 6 were placed into treatment groups 3, 2 and 1, respectively. Dogs with identical rank sums were allocated to groups based on alphabetical order. Once all subjects had been allocated to groups in this manner, the allocation of individual subjects was adjusted to ensure that treatment groups were balanced to the extent possible across all applicable cognitive tests.

The study was blinded to all personnel in the investigation with the exception of the person(s) involved in administration of the experimental product and placebo, the person responsible for performing allocation and the Scientific Director. The treatment given to each animal was not revealed to the people collecting data.

Thirty-six dogs were screened on baseline cognitive tests, physical/neurological tests, hematology and blood biochemistry and that met the inclusion criteria were selected for the treatment phase. Dogs were maintained at the animal facility and group-housed in pens or rooms in compliance with the recommendations of the Canadian Council on Animal Care. Environmental management including lighting, ventilation, temperature, and humidity regulation were maintained and controlled according to standard operating procedures. All animals were fed according to the facilities standard operating procedures, using a standard commercial diet to maintain body condition (Purina ProPlan Savor Adult, Chicken and Rice Formula). Animals were fed at the end of each day following completion of any testing or sample collection procedures. Water was provided ad libitum.

During the 3-month treatment phase of the interventional study (Fig. 1A), on day 80, one dog needed to be euthanized. Unblinding revealed that this dog was in the placebo cohort. On day 123 (30 days after treatment end), another dog needed to be euthanized. Unblinding revealed that the dog was in the low dose (3 mg/kg/day) cohort. The causes of morbidity (forelimb paralysis and progressing vestibular disease, respectively) were considered consequences of underlying age-related background diseases in these old dogs. All other dogs survived the study and were returned to the colony at study conclusion.

4.3. Behavioral assessments

4.3.1. Discrimination Learning

Discrimination learning was performed over three weeks during baseline (days −38 to −17) in order to assess learning ability and executive function as well as to prepare the subjects for cognitive tasks that would be completed during the treatment phase. Initially, on the first day of testing, animals participated in a 10-trial preference test using two objects differing in size, shape and color (i.e. green block and yellow banana). Following this test, each dog's preferred object was used as the rewarded stimulus for subsequent learning sessions during which selection of the preferred object was required in order to obtain a reward. The subsequent daily sessions consisted of 20 trials and were carried out according to standard operating procedures. Animals were tested until they successfully passed a two-stage criterion as follows: Stage 1: 90% or greater on one session or a minimum of 80% over two consecutive sessions; Stage 2: 70% or greater over two consecutive sessions.

4.3.2. Variable delayed non-matching to position (DNMP)

The DNMP task was performed in 5-day intervals in order to assess spatial working memory. Testing occurred during baseline (days −16 to −12), at three time points during the treatment phase (days 23–27, 46 to 50 and 74 to 78) and at two time points during follow up (days 114–118 and 142 to 146). Testing was performed according to standard operating procedures. Briefly, subjects were initially presented with a single object (i.e. white block) on a sliding tray. The block was positioned over one of three possible food-well locations and the animal was required to displace the block with its nose in order to uncover a food reward. The tray was then removed from the dog's sight and a delay was initiated. Following the delay, the subject was presented with two white blocks - one in the original location and one in a new location. The dog was required to select the block in the new (non-matching) location in order to obtain a reward. On each designated testing day, animals participated in a single session, regardless of score, with delays of 20 and 90 s equally divided among 12 trials. During the treatment phase, testing was performed 1 h following dosing (±15 min).

4.3.3. Variable discrimination (selective attention task)

Variable discrimination testing was performed in 4-day intervals in order to assess selective attention. Testing occurred during baseline (days −11 to −8), at three time points during the treatment phase (days 17–20, 40 to 43 and 68 to 71) and at two time points during follow up (days 107–110 and 135 to 138). Animals were tested on the designated days regardless of score. During the treatment phase testing was performed 1 h following dosing (±15 min) according to standard operating procedures. This task was similar to discrimination learning; however, the preferred object was presented with either 0, 1, 2, or 3 negative stimuli (non-preferred objects) to serve as distractors. There were 20 trials per session.

4.3.4. Discrimination reversal

Discrimination reversal testing was carried over ten days in the treatment phase (days 81–90). This task occurred following all other treatment phase testing. The task was performed as described for Discrimination Learning; however, the non-preferred object from the baseline preference test was now rewarded. Animals were tested once daily regardless of score according to standard operating procedures.

4.4. Plasma and cerebrospinal fluid (CSF) collection

Whole blood collections were performed immediately following each CSF collection time point. Approximately 4 ml of blood were collected from a suitable vein according to standard operating procedures. Blood was placed into K3EDTA tubes and within 15 min of collection, plasma was isolated by centrifugation at 1500×*g* for 15 min at 4 °C.

CSF was collected at baseline (day −2), at three time points during the treatment phase (days 28, 51, and 93) and twice after treatment end (days 120 and 148) for determination of RD2 levels and biomarkers. Using sterile techniques, samples were obtained from the cisterna magna while the animals were anesthetized. Anesthesia was induced with Propofol (8 mg/kg, intravenous) to effect. Subjects were intubated and anesthesia was maintained with an isoflurane/oxygen mixture for the duration of the procedure. If a suitable vein could not be accessed for Propofol injection, masking the animal with the isoflurane/oxygen mixture was used as an alternative. In each treatment arm, CSF was collected 1 h following dosing (±10 min). Samples were collected and subsequently processed by centrifugation (within 15 min of collection) at 2000×*g* for 10 min at 4 °C to remove potential red blood cell contamination.

RD2 plasma and CSF concentrations were quantified using an ultra-high-pressure liquid chromatography method combined with mass spectrometric detection using a QTRAP6500 in positive MRM mode (TNO, Zeist, Netherlands). The method had been validated (in accordance with the EMA guidelines on bioanalytical method validation) in terms of reproducibility, specificity, robustness and precision. The lower limit of quantification (LLOQ) was 0.5 ng/ml. Plasma concentrations for each dose level following single i.v. or oral doses of RD2 were used to calculate the following pharmacokinetic parameters: maximum concentration (C_{max}) and time to reach it (T_{max}), area under the plasma concentration versus time curve between 0 and t, and from 0 to infinity ($AUC_{0\text{-tlast}} + AUC_{0\text{-inf}}$), terminal half-life ($t_{1/2\alpha,\beta,\gamma}$), and total plasma clearance (CL_{total}) using TOPFIT 2.0 program [27].

4.5. Hematology and blood clinical chemistry

Whole blood collections were conducted on days −41 and −2 (baseline) as well as on day 93 of the treatment phase.

Complete blood count (CBC) and clinical chemistry analysis was performed by Antech Diagnostics (Mississauga, Ontario, Canada). CBC analysis included the blood parameters white blood cells (WBC), red blood cells (RBC), hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelet count, platelet estimate, neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils.

Clinical chemistry analysis included the blood parameters total protein, albumin, globulin, calculated ratio of albumin to globulin (A/G ratio), aspartate aminotransferase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyl transpeptidase (GGTP), total bilirubin, blood urea nitrogen (BUN), creatinine, BUN/creatinine ratio, phosphorus, glucose, calcium, magnesium, sodium, potassium, sodium/potassium ratio, chloride, cholesterol, triglycerides, amylase, lipase, creatine phosphokinase (CPK) and creatine kinase isozymes (CK-MM, CK-MB, and CK-BB).

4.6. Biomarker analysis

4.6.1. Aβ42 and total tau ELISA

Aβ42 and total tau ELISAs were purchased from Innotest (Fujirebio Germany GmbH, Hannover, Germany) and performed according to the manufacturer's protocol with CSF. Antibodies used for the specific detection of Aβ1-42 were 3D6, which recognizes amino acid residues 1 to 5 and 21F12, which recognizes amino acid residues 33 to 42 leading to a negligible cross reactivity for Aβ 1–40. Antibodies used for the detection of total tau were AT120, HT7 and BT2, all antibodies which are specific for the mid-domain region of the tau protein. All samples were measured in duplicates. Most of the tau concentration values were lower than the lower limit of quantification (50 pg/ml). Therefore, no further analysis of the data was performed.

4.6.2. Albumin ELISA

Albumin ELISA was purchased from Bethyl Laboratories (Montgomery, Alabama, USA) and performed according to the manufacturer's protocol with CSF and plasma. All samples were measured as duplicates.

4.6.3. GFAP and NfL single molecule array

GFAP and NfL single molecule arrays (Simoa) were purchased from Quanterix (Quanterix, Billerica, Massachusetts, USA) and performed according to the manufacturer's protocol with CSF on a Simoa HD-1 Analyzer (Quanterix, Billerica, Massachusetts, USA). All samples were measured as duplicates.

4.6.4. Surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) assay

Surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) assays were performed in 384 flat-bottom square well microplates with a glass bottom (ThermoFisher, Waltham, Germany) as previously described [19]. 2.5 μg/ml of Nab228 monoclonal antibody (mAB) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) and 2.5 μg/ml of Tau5 mAB (Biolegend, San Diego, USA) in $NaHCO_3$, pH 8 were added directly to the wells and incubated overnight at 4 °C. The plate was washed five times each with TBS (Serva, Duisburg, Germany) + 0.1 % Tween 20 (AppliChem, Darmstadt, Germany) (TBST) and TBS. Each of the wells was blocked with 1% BSA (AppliChem, Darmstadt, Germany) in TBS for 1 h at room temperature (RT). After washing the wells five times each with TBST and TBS, CSF samples and oligomer standard were added to the plate and were incubated overnight at 4 °C. The next day, after washing the excessive sample away five times with TBS, 0.2 μg/ml Nab228, labeled with CF-488 dye and 2 μg/ml Tau5, labeled with CF-633 dye, (both: Sigma-Aldrich, Missouri, USA), both ultra-centrifuged (100,000×*g*, 1 h, 4 °C), were added to the wells and incubated for 1 h. After incubation, the excessive detection antibodies were washed away five times with TBS. All washing steps were carried out by an automated microplate washer (405 LS Microplate Washer, Agilent, Santa Clara, USA). For measurement, the buffer in the wells was changed against TBS with 0.03% ProClin (Sigma Aldrich, Missouri, USA) and the plate was sealed with a plastic foil and transferred to a Leica multi-color TIRF total internal reflection fluorescence system (AMTIRF MC, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The TIRF system operated with an automated stage and a × 100 oil immersion objective (1.47 oil CORRTIRF Leica). Images were recorded consecutively with Ex/Em = 633/705 and 488/525 nm with a 1000 ms exposure time and a gain of 1000 for both color channels at a penetration depth of 200 nm. The microscope took 5 × 5 images per well in each channel, which corresponds to app. 3% of the well's surface. Each image consisted of 1000 × 1000 pixels with a lateral resolution of 116 nm (pixel to pixel) and an intensity resolution of 14 bit (gray scale). Image analysis was performed using sFIDAta, a custom-made software. The cutoff values were calculated for each channel based on the buffer blank. The software then applied the cutoff values to the sample results and counted the pixels that were higher than the cutoff for each channel (pixelcount). All samples were measured in triplicates.

The calibration standard for Aβ and tau oligomers were silica nanoparticles (SiNaPs) with a diameter of 20 nm with covalently attached epitopes for the detection antibodies, Aβ(1–15) and tau(210–230). These Aβ(1–15)-tau(210–230)-SiNaPs have been prepared as described previously [21], with the following modifications: Aβ and tau peptides, which were functionalized with cysteamine on the C-terminus (Peptides and Elephants, Henningsdorf, Germany) were crosslinked to the aminated surface of the SiNaPs by maleimido hexanoic acid (MIHA, abcr GmbH, Karlsruhe, Germany).

4.7. Statistical analysis

All statistical calculations were performed using SigmaPlot Version 11 (Systat Software, Germany) or OriginPro 2019 (OriginLab Corporation, USA). Normal distribution of data was tested using Kolmogorov-Smirnov-test. Statistical calculations were conducted using two-way RM ANOVA followed by Fisher post hoc test. Pairwise comparisons were performed with one-sided Wilcoxon signed-rank test for dependent data and Mann-Whitney *U* test for independent data. Correlations were first calculated with Pearson and then with Spearman analysis at alpha level 0.05 with n = 11 to 12.

Author contribution statement

Janine Kutzsche, Dieter Willbold: Conceived and designed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Wrote the paper.

Sarah Schemmert, Wolfgang M. Rossberg, Michael Hümpel, Antje Willuweit: Analyzed and interpreted the data.

Tuyen Bujnicki: Conceived and designed the experiments; Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Wrote the paper.

Christian Zafiu, Steffen Halbgebauer, Markus Otto, Joseph A. Araujo: Conceived and designed the experiments; Performed the experiments.

Victoria Kraemer-Schulien: Performed the experiments.

Marlene Pils, Lara Blömeke, Julia Post, Andreas Kulawik: Contributed reagents, materials, analysis tools or data.

Dagmar Jürgens, Oliver Bannach: Conceived and designed the experiments.

Data availability statement

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Dieter Willbold reports a relationship with Priavoid GmbH that includes: board membership. Dieter Willbold has patent issued to Priavoid GmbH. Co-founder and co-owner of Priavoid GmbH.

Acknowledgments

D.W. was supported by the Technology Transfer Fund of the Forschungszentrum Jülich, Germany. D.W. was supported by "Portfolio Drug Research" of the "Impuls und Vernetzungs-Fonds der Helmholtzgemeinschaft", Germany. Additional funding was received from Part the Cloud: Translational Research Funding for Alzheimer's Disease (PTC) Award Number: 18PTC-19-605853 from the Alzheimer's Association, US. We received funding from the European Union Seventh Framework Program (FP7/2007–2013), European Union, under grant agreement 602999 (SYMPATH project), the Federal Ministry of Education and Research, Germany, within the projects VIP (03V0641), KNDD (01GI1010A), JPND/BIOMARKAPD (01ED1203H), and NEUROALLIANZ (16GW0099). We were also supported by the programs "Biomarkers Across Neurodegenerative Diseases I + II" of The Alzheimer's Association, Alzheimer's Research UK and the Weston Brain Institute, Canada (11084 and BAND-19-614337). We are also grateful for support from The Michael J. Fox Foundation, US, for Parkinson's Research (14977), from the ALS Association, US, and from the Packard Center, US, (19-SI-476). We further received funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft, Germany (INST 208/616-1 FUGG, INST 208/794-1 FUGG) and the Helmholtz Association, Germany (HVF0079).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18443.

References

[1] X. Li, et al., Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2019, Front. Aging Neurosci. (2022) 14.
[2] E. Head, A canine model of human aging and Alzheimer's disease, Biochim. Biophys. Acta 1832 (9) (2013) 1384–1389.
[3] C.T. Siwak-Tapp, et al., Neurogenesis decreases with age in the canine hippocampus and correlates with cognitive function, Neurobiol. Learn. Mem. 88 (2) (2007) 249–259.
[4] C.T. Siwak-Tapp, et al., Region specific neuron loss in the aged canine hippocampus is reduced by enrichment, Neurobiol. Aging 29 (1) (2008) 39–50.
[5] P.D. Tapp, et al., Frontal lobe volume, function, and beta-amyloid pathology in a canine model of aging, J. Neurosci. 24 (38) (2004) 8205–8213.
[6] M. Pugliese, et al., Diffuse beta-amyloid plaques and hyperphosphorylated tau are unrelated processes in aged dogs with behavioral deficits, Acta Neuropathol. 112 (2) (2006) 175–183.
[7] E. Head, et al., Spatial learning and memory as a function of age in the dog, Behav. Neurosci. 109 (5) (1995) 851–858.
[8] N.W. Milgram, et al., Landmark discrimination learning in the dog, Learn. Mem. 6 (1) (1999) 54–61.
[9] J. Kutzsche, et al., Safety and pharmacokinetics of the orally available antiprionic compound PRI-002: a single and multiple ascending dose phase I study, Alzheimers Dement. (N Y) 6 (1) (2020), e12001.
[10] S. Schemmert, et al., Abeta oligomer elimination restores cognition in transgenic Alzheimer's mice with full-blown pathology, Mol. Neurobiol. 56 (3) (2019) 2211–2223.
[11] T. van Groen, et al., The Abeta oligomer eliminating D-enantiomeric peptide RD2 improves cognition without changing plaque pathology, Sci. Rep. 7 (1) (2017), 16275.
[12] T. Zhang, et al., Toward the mode of action of the clinical stage all-d-enantiomeric peptide RD2 on Aβ42 aggregation, ACS Chem. Neurosci. 10 (12) (2019) 4800–4809.
[13] B. Kass, et al., Aβ oligomer concentration in mouse and human brain and its drug-induced reduction ex vivo, Cell Rep. Med. 3 (5) (2022), 100630.
[14] J. Kutzsche, et al., Large-scale oral treatment study with the four most promising D3-derivatives for the treatment of Alzheimer's disease, Molecules 22 (10) (2017).
[15] S. Schemmert, et al., Deceleration of the neurodegenerative phenotype in pyroglutamate-Abeta accumulating transgenic mice by oral treatment with the Abeta oligomer eliminating compound RD2, Neurobiol. Dis. 124 (2019) 36–45.
[16] L. Bau-Gaudreault, C.N. Grimes, Effect of time and storage on toxic or pseudo-toxic change in canine neutrophils, Vet. Clin. Pathol. 48 (3) (2019) 400–405.
[17] N.W. Milgram, et al., Cognitive functions and aging in the dog: acquisition of nonspatial visual tasks, Behav. Neurosci. 108 (1) (1994) 57–68.
[18] P.D. Tapp, et al., Size and reversal learning in the beagle dog as a measure of executive function and inhibitory control in aging, Learn. Mem. 10 (1) (2003) 64–73.
[19] P.D. Tapp, et al., Effects of age on measures of complex working memory span in the beagle dog (Canis familiaris) using two versions of a spatial list learning paradigm, Learn. Mem. 10 (2) (2003) 148–160.
[20] Y. Herrmann, et al., sFIDA automation yields sub-femtomolar limit of detection for Aβ aggregates in body fluids, Clin. Biochem. 50 (4–5) (2017) 244–247.
[21] M. Hülsemann, et al., Biofunctionalized silica nanoparticles: standards in amyloid-β oligomer-based diagnosis of Alzheimer's disease, J. Alzheimers Dis. 54 (1) (2016) 79–88.
[22] A. Kulawik, et al., Advancements of the sFIDA method for oligomer-based diagnostics of neurodegenerative diseases, FEBS Lett. 592 (4) (2018) 516–534.
[23] L. Wang-Dietrich, et al., The amyloid-β oligomer count in cerebrospinal fluid is a biomarker for Alzheimer's disease, J. Alzheimers Dis. 34 (4) (2013) 985–994.
[24] L. Blömeke, et al., Quantitative detection of α-Synuclein and Tau oligomers and other aggregates by digital single particle counting, NPJ Parkinsons Dis. 8 (1) (2022) 68.
[25] J.P. Guo, et al., Abeta and tau form soluble complexes that may promote self aggregation of both into the insoluble forms observed in Alzheimer's disease, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103 (6) (2006) 1953–1958.
[26] Y. Miller, B. Ma, R. Nussinov, Synergistic interactions between repeats in tau protein and Aβ amyloids may Be responsible for accelerated aggregation via polymorphic states, Biochemistry 50 (23) (2011) 5172–5181.
[27] G. Heinzel, R. Woloszczak, P. Thomann, TopFit : Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis System for the PC, G. Fischer, Stuttgart, 1993.

5 Zusammenfassung und Diskussion

Proteinfehlfaltungserkrankungen basieren auf der aberranten Faltung, Aggregation sowie intra- als auch extrazellulären Akkumulation von sonst löslichen und funktionellen Proteinen zu Proteinaggregaten. Insbesondere für neurodegenerative Erkrankungen wie AD oder PD sind Proteinfehlfaltungen charakteristisch; jedoch wurden auch für chronisch mentale Erkrankungen amyloide Proteinaggregate beschrieben. Beides, sowohl der Verlust der physiologischen Funktion als auch der Erwerb toxischer Eigenschaften durch die Aggregation können die Pathogenese der jeweiligen Erkrankung auslösen. Studien haben gezeigt, dass nicht die späteren Akkumulationen, sondern die während der Aggregation gebildeten löslichen Oligomere eine starke neurotoxische Wirkung aufweisen [15, 17, 20]. Da diese bereits während der frühen Krankheitsphase gebildet werden und somit pathophysiologische Veränderungen widerspiegeln, stellen sie einen vielversprechenden Biomarker für die (Früh)Diagnose als auch für die Medikamentenentwicklung von Proteinfehlfaltungserkrankungen dar [15, 17, 20, 132].

Die Detektion als auch die Quantifizierung von Proteinoligomeren sind aufgrund der strukturellen Heterogenität sowie der geringen Konzentrationen in Körperflüssigkeiten erschwert, was hoch sensitive und Oligomer-spezifische Nachweisverfahren fordert. Derzeit finden für die Detektion sowie Quantifizierung von Proteinoligomeren verschiedene Technologien Anwendung, wobei hauptsächlich Immunoassays einschließlich ELISA, Western Blot, Bead-basierte Technologien aber auch fluoreszenzmikroskopische Verfahren zum Einsatz kommen [12, 17, 20]. Die in dieser Arbeit weiterentwickelte sFIDA-Technologie ist eine Kombination aus Sandwich-ELISA und Fluoreszenzmikroskopie und stellt im Gegensatz zu herkömmlichen Quantifizierungsverfahren wie beispielsweise Western Blot oder ELISA eine (teil-)automatisierte Hochdurchsatztechnologie dar, da sowohl Mikrotiterplatten im 384-Well-Format, ein Wasch- sowie Pipettierroboter und ein teilautomatisiertes Fluoreszenzmikroskop eingesetzt werden können.

Prinzipiell kann jede Art an Proteinaggregat mittels der sFIDA-Technologie bis in den femtomolaren Konzentrationsbereich quantifiziert werden. Voraussetzung hierfür ist jedoch eine erfolgreiche Assay-Entwicklung. Im Folgenden werden daher die Ergebnisse der in Kapitel 4 aufgeführten Studien unter Berücksichtigung der drei Phasen der Assay-Entwicklung – Verifizierung, Prozessentwicklung und Validierung – zusammengefasst und Unterschiede bzw. Zusammenhänge zwischen den einzelnen Studien diskutiert. Letztlich soll eine Bewertung über die Eignung der sFIDA-Technologie im Rahmen der Diagnostik und präklinischen Medikamentenentwicklung von Proteinfehlfaltungserkrankungen erfolgen.

5.1 Standardisierung der sFIDA-Festphasenentwicklung

Wie eingangs in Kapitel 1.3.3 erläutert, ist die analytische als auch klinische Leistung eines Assays sowohl vom Analyten, den verwendeten Assay-Antikörpern als auch den Coating-Parametern sowie verwendeten Pufferkonditionen abhängig [174, 175, 177, 181]. Um all diese Festphasenparameter zu eruieren, sollten idealerweise mehrere biologische Proben, welche unterschiedliche endogene Analytkonzentrationen aufweisen, verwendet werden [178, 183, 184]. Im Kontext von Proteinfehlfaltungserkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen ist die Bereitstellung solcher Proben für Forschungs- und Entwicklungszwecke u.a. aufgrund fehlender Therapeutika aus ethischer Sicht kritisch zu betrachten. Darüber hinaus ergeben sich aus der Invasivität der Probengewinnung insbesondere im Bereich der Liquordiagnostik weitere Limitierungen bezüglich der möglichen Probenanzahl und des Probenvolumens. Daher wurde der etablierte Verifizierungsplan aus Kapitel 3.1 so ausgelegt, dass wichtige Festphasenparameter mittels entsprechender Modellsysteme wie Kalibrationsstandards oder synthetischer Proteinaggregate eruiert und Studienpläne gegebenenfalls durch vorhandene biologische Proben erweitert werden können. Im Folgenden werden die in Kapitel 4 aufgeführten Weiterentwicklungen der SiNaPs und die Implementierung Oligomer-basierter Qualitätskontrollproben zusammengefasst und bezüglich ihres Einsatzes innerhalb der Assay-Verifizierung diskutiert.

5.1.1 Weiterentwicklung des SiNaPs-Kalibrationsstandards

Im Gegensatz zu anderen Oligomer-basierten Assays wie ELISA, RT-QuIC oder Western Blot werden innerhalb der sFIDA-Technologie proteinkonjugierte SiNaPs verwendet, um die digitalen Messwerte in molare Partikelkonzentrationen zu übersetzen [55, 143]. Im Vergleich zu synthetischen Proteinaggregaten sind diese Kalibrationsstandards hochrein, gut charakterisiert sowie stabil und können in reproduzierbarer Weise synthetisiert, funktionalisiert und mit Protein konjugiert werden [143, 159]. Des Weiteren sind SiNaPs aufgrund ihres artifiziellen Charakters weniger anfällig für endogene Bestandteile der Probenmatrix. Dies wurde anhand von Aβ sowohl für Liquor (siehe Kapitel 4.1) als auch für Plasma (siehe Kapitel 4.3) demonstriert, wobei prozentuale Wiederfindungsraten von 99.8% bzw. 92% determiniert wurden. Aufgrund dieser Unempfindlichkeit sind SiNaPs insbesondere im Bereich der Festphasenentwicklung als Ausgangspunkt geeignet, um beispielsweise die Immobilisierungstechnik oder die Coating-Parameter zu eruieren [55].

In den bisher publizierten Studien zur sFIDA-Technologie wurden lediglich SiNaPs verwendet, die aminiert, carboxyliert und mittels EDC/NHS-Chemie mit Aβ-Volllängenproteine [143] bzw. α-Synuclein-Volllängenproteine [159] konjugiert wurden. Analog zu diesem Protokoll wurden für die Studie zur Quantifizierung von Tau-Aggregaten in humanen Liquorproben SiNaPs mit Volllängen-Tau (2N4R) beschichtet (siehe Kapitel 4.2). Im Gegensatz dazu wurden innerhalb

der anderen Studien erstmals SiNaPs synthetisiert, welche mittels Maleimid-Chemie und kurzen Cysteamin-funktionalisierten Peptiden wie Aβ1-15 (siehe Kapitel 4.1, Kapitel 4.2, Kapitel 4.3, Kapitel 4.4 und Kapitel 4.8), α-Synuclein115-130 (siehe Kapitel 4.5 und 4.6), Tau210-230 (siehe Kapitel 4.6) und DISC738-778 (siehe Kapitel 4.7) konjugiert wurden.
Prinzipiell wäre sowohl mit der EDC/NHS-Chemie als auch mit der Maleimid-Chemie eine Konjugation der SiNaPs mit unterschiedlichen Peptiden bzw. Proteinen möglich. Insbesondere im Kontext von komorbiden Proteinopathien (siehe Kapitel 1.2.3) wären solch heterogene SiNaPs sowie die entsprechende Modifizierung des sFIDA-Aufbaus entscheidend für die zeitgleiche Quantifizierung einzelner Analyten als auch dem entsprechenden Heteroaggregat. So könnten nicht nur die pixelbasierten Messwerte der einzelnen Analyten (Einkanalanalyse) sondern auch die der heterogenen Proteinaggregate (Kolokalisation) in molare Partikelkonzentrationen kalibriert werden. Das dadurch ermöglichte Multiplexing könnte zudem eine Einsparung an Ressourcen wie Probenvolumen oder Materialien ermöglichen. Im Rahmen der Studie zur Quantifizierung von Aβ- und Tau-Aggregaten in caninen Liquorproben (siehe Kapitel 4.9) wurde dies erstmals umgesetzt. Hierzu wurde die aminierte SiNaPs-Oberfläche mit Maleimidgruppen funktionalisiert und diese anschließend mit Aβ1-15 sowie Tau210-230 Peptiden konjugiert, wobei äquimolare Konzentrationen der beiden Peptide eingesetzt wurden. Insbesondere für die anderen Assays, welche zwei verschiedene Analyten wie Aβ und Tau (siehe Kapitel 4.2) bzw. α-Synuclein und Tau (siehe Kapitel 4.6) quantifizierten, wäre dies eine entscheidende zukünftige Weiterentwicklung.
Da die SiNaPs im sFIDA im Vergleich zu synthetischen bzw. endogenen Proteinaggregaten tendenziell größer erscheinen, wurde die Anzahl an Epitopen auf der SiNaPs-Oberfläche in der Studie zur Quantifizierung von Aβ-Aggregaten in humanen Plasmaproben (Kapitel 4.3) erstmals reduziert. So konnte die apparente Partikelgröße angeglichen und somit die Umrechnung der pixelbasierten Messwerte in molare Partikelkonzentrationen optimiert werden. Über solch eine Optimierung sollte zukünftig insbesondere für all die Studien diskutiert werden, bei denen eine Umrechnung der pixelbasierten Messwerte in molare Partikelkonzentrationen aufgrund unzureichender Kalibrierung nicht möglich war. Beispiele hierfür wäre die Studie zur Quantifizierung von Aβ- und Tau-Aggregaten in Kapitel 4.2 sowie die Studie zur Quantifizierung von DISC1-Aggregaten in Kapitel 4.7. Neben einer zu geringen Anzahl an Kalibrationspunkten im niedrigen Konzentrationsbereich könnte auch eben diese Diskrepanz der Partikelgrößen verantwortlich für die unzureichende Kalibrierung sein, da SiNaPs im Durchschnitt mehr Pixel und somit Intensitäten höher des gesetzten Cut-offs aufweisen. Eine ausführliche Diskussion zu dieser Thematik ist in Kapitel 4.6 innerhalb der Studie zur Quantifizierung von α-Synuclein- und Tau-Aggregaten in humanen Liquorproben aufgeführt.

5.1.2 Implementierung Oligomer-basierter interner Qualitätskontrollproben

Aufgrund ihres artifiziellen Charakters wie der vorhandene Silikatkern sowie die definierte Anzahl an Epitopen auf der Oberfläche haben sich SiNaPs als geeigneten Kalibrationsstandard für die Oligomer-basierte Diagnostik qualifiziert [55, 143]. Jedoch unterscheiden sie sich daher auch von endogenen Proteinaggregaten, welche heterogene Eigenschaften bezüglich Form, Struktur, Molekulargewicht und Epitopanzahl aufweisen [12, 20]. Folglich reagieren endogene Proteinaggregate auf Matrixeffekte oder Pufferänderungen mit Konformationsänderungen sowie Epitopmaskierung, während SiNaPs gegenüber solchen Einflüssen sehr robust sind. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals synthetische Aggregate aus rekombinanten Peptiden bzw. Proteinen hergestellt und zusätzlich zu den SiNaPs als Modellsystem innerhalb der Assay-Entwicklung verwendet. Ohne dieses zusätzliche Modellsystem wären Entscheidungen über Pufferkompositionen oder Kombinationen an Detektionsantikörpern innerhalb der Assay-Verifizierung aus Kapitel 3 mit großer Wahrscheinlichkeit fehlerhaft ausgefallen, da das spezifische Signal der SiNaPs durch Änderungen der Probenpufferkomposition (Kapitel 3.2.3.2, EXP5) oder durch unterschiedliche Detektionsantikörperkombinationen (Kapitel 3.2.3.2, EXP6) nur geringfügig gesteigert werden konnte.

Darüber hinaus fanden synthetische Proteinaggregate im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals Anwendung als interne Qualitätskontrollprobe für verschiedene sFIDA-Assays. Die ermöglichten nicht nur die Überwachung der Assay-Leistung über die Zeit, sondern dienten zudem der Standardisierung als auch der Anwendbarkeit der sFIDA-Technologie für die routinemäßige Quantifizierung von Proteinaggregaten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt insbesondere auf der Implementierung einer Aβ Oligomer-basierten internen Qualitätskontrollprobe für die Quantifizierung von aggregierten Aβ-Spezies in humanen Liquorproben (siehe Kapitel 4.1), wobei diese anschließend für die Quantifizierung von Aβ-Aggregaten in humanen Plasmaproben (siehe Kapitel 4.3) und Stuhlproben (siehe Kapitel 4.4) validiert wurde.

Darüber hinaus wurden sowohl für die Quantifizierung von α-Synuclein-Aggregaten (siehe Kapitel 4.5 und Kapitel 4.6), Tau-Aggregaten (siehe Kapitel 4.2 und Kapitel 4.6) sowie DISC1-Aggregaten (siehe Kapitel 4.7) die entsprechenden synthetischen Proteinaggregate hergestellt und als interne Qualitätskontrollproben verwendet, wobei lediglich die synthetischen DISC1-Aggregate bisher ausführlich charakterisiert [221] und validiert wurden. Für die beiden anderen internen Qualitätskontrollproben stehen diese Charakterisierungen noch aus.

5.1.3 Anwendung der Physisorption als Immobilisierungstechnik

Die bisher publizierten Studien der sFIDA-Technologie nutzten eine Spacer-vermittelte kovalente Immobilisierung der Capture-Antikörper auf die Oberfläche, wobei als Spacer entweder PEG- oder Carboxymethyldextran-Moleküle (CMD) zum Einsatz kamen [143, 153, 157-160]. Wie aus Abbildung 31 ersichtlich, sind für diese Art der Capture-Immobilisierung mehrere chemische oder physikalische Vorbehandlungen der Oberfläche oder des Spacer-Moleküls von Nöten. Im Gegensatz dazu erfolgt die Immobilisierung der Capture-Antikörper mittels Physisorption rein über intermolekulare Wechselwirkungen, sodass auf solche Modifikationen verzichtet werden konnte.

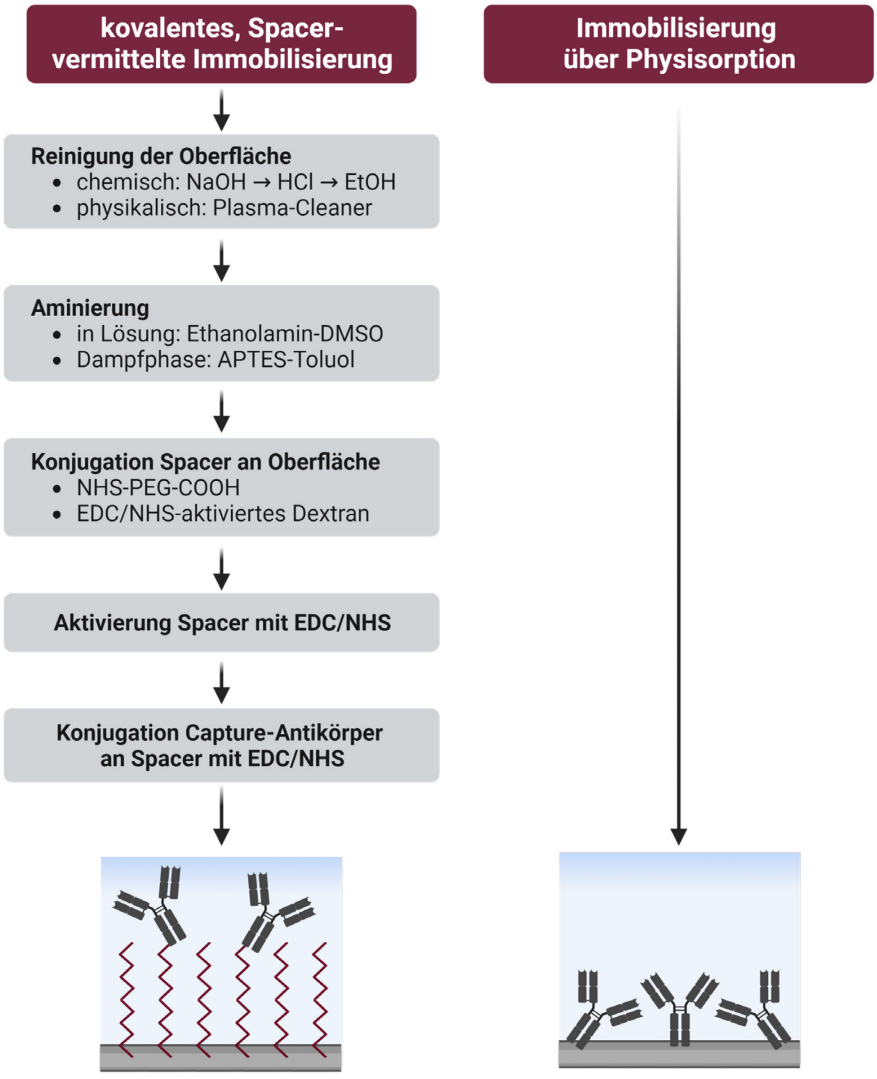


Abbildung 31 – Anwendung unterschiedlicher Immobilisierungstechniken für die Beschichtung der sFIDA-Oberfläche mit Capture-Antikörpern. Bisherige Protokolle basierten auf einer kovalenten Spacer-vermittelten Immobilisierung der Capture-Antikörper, die im Gegensatz zur in dieser Arbeit etablierten, nicht-kovalenten Immobilisierung über Physisorption mehrere Vorbehandlungsschritte benötigt. Eigene Darstellung, erstellt mit BioRender.com.

Wie für die Quantifizierung von Aβ1-15 SiNaPs sowie synthetischen Aβ1-42 Aggregaten gezeigt (siehe Kapitel 3.2.3.2, EXP1), konnte mittels Physisorption eine vergleichbare Coating-Effizienz erzielt werden, ohne solch aufwendige Vorbehandlungen durchführen zu müssen. Daher wurden die Assay-Oberflächen in den darauffolgenden Studien aus Kapitel 4 ebenfalls mit dieser Immobilisierungstechnik mit Capture-Antikörpern funktionalisiert. Lediglich in der Studie zum *ex-vivo* Target Engagement (siehe Kapitel 4.8) wurde weiterhin die Spacer-vermittelte Technik verwendet, um den Nab228-Antikörper kovalent auf der Assay-Oberfläche zu immobilisieren.

Der Großteil der in Kapitel 4 aufgeführten Studien diente der Quantifizierung von Homoaggregaten. Daher wurde die Assay-Oberfläche dementsprechend nur mit einer Sorte Capture-Antikörper wie beispielsweise mit Nab228-Antikörpern (siehe Kapitel 4.1, Kapitel 4.4), Bapineuzumab (siehe Kapitel 4.3), 211-Antikörpern (siehe Kapitel 4.5) oder 14F2-Antikörpern (siehe Kapitel 4.7) beschichtet. Dass mittels Physisorption gleichzeitig auch verschiedene Sorten an Capture-Antikörpern immobilisiert werden können, wurde in den Studien zum simultanen Nachweis von Aβ- und Tau-Aggregate (siehe Kapitel 4.2 und Kapitel 4.9) bzw. α-Synuclein- und Tau-Aggregate (siehe Kapitel 4.6) demonstriert.

5.1.4 Einfluss der Analyten und der Assay-Antikörper auf Festphasenparameter

Die Notwendigkeit, für jeden Analyten und jede Probenmatrix, Coating-Parameter wie Antikörperkonzentrationen sowie Komposition der Blockadelösung neu zu bestimmen, wurde durch die einzelnen Assay-Protokolle in den in Kapitel 4 aufgeführten Studien nochmals demonstriert. Während beispielsweise innerhalb des Assays zur Quantifizierung von DISC1-Aggregaten (siehe Kapitel 4.7) 0,1 M MES mit pH 3,5 für die Immobilisierung der Capture-Antikörper verwendet wurde, zeigte dieser Puffer für Aβ-Aggregate das geringste Signal-Rausch-Verhältnis (siehe Kapitel 3.2.3.2, EXP2), wohingegen 0,1 M Carbonatpuffer mit pH 8,4 in diesem Falle überzeugte. Auch innerhalb der verwendeten Capture-Konzentration konnten Unterschiede zwischen den einzelnen Assays determiniert werden. So wurde beispielsweise für den Nachweis von α-Synuclein-Aggregaten in humanen Stuhlproben 7,5 µg/mL 211 Antikörper für das Coating verwendet (siehe Kapitel 4.5), wohingegen bei einer äquimolaren Konzentration an Nab228 Antikörper bereits ein Signalverlust aufgrund der Ausbildung einer instabilen Multilayerschicht verzeichnet wurde (siehe Kapitel 3.2.3.2, EXP3). Darüber hinaus konnte sowohl Magermilchpulver als auch *The Blocking Solution*, die kommerziell erworbene Casein-basierte Blockadelösung der Firma Candor Bioscience GmbH, als Blocking-Agenz für die Quantifizierung von Aβ-Aggregaten in einem Vorversuch nicht überzeugen (Daten nicht gezeigt). Lediglich 0,5% BSA in TBS-ProClin ermöglichte eine Reduzierung des Hintergrunds mit simultaner Erhöhung des spezifischen Signals (siehe Kapitel 3.2.3.2, EXP4). Im Gegensatz dazu wurde noch freie Glasoberfläche innerhalb des

Assays zur Quantifizierung von fäkalen α-Synuclein-Aggregaten (siehe Kapitel 4.5 und Anhang 17) mit 0,5% Magermilchpulver gelöst in TBS-ProClin bzw. innerhalb des Assays zur Quantifizierung von DISC1-Aggregaten in humanen Liquorproben (siehe Kapitel 4.7 und Anhang 19) mit Casein-Molekülen (*The Blocking Solution*) gesättigt.

Die Eruierung eines geeigneten Probenpuffers sowie möglicher Additive für den jeweiligen Analyten und der Probenmatrix ist einer der wichtigsten Schritte innerhalb der Festphasenentwicklung [175, 176, 181, 187]. In den in Kapitel 4 aufgeführten Studien wurde meist 1× PBS (Kapitel 4.1, Kapitel 4.2, Kapitel 4.4) oder 1× TBS (siehe Kapitel 4.3, Kapitel 4.8 und Kapitel 4.9) als Basis für den Probenpuffer verwendet, wobei teilweise 0,5% BSA als Blocking-Agenz, 0,05% Tween20 als Detergenz sowie 0,03% ProClin bzw. 0,095% Natriumazid als Biozid zugesetzt wurden. Lediglich in der Studie zur Quantifizierung von DISC1-Aggregaten in humanen Liquorproben (siehe Kapitel 4.7) wurde *The Blocking Solution* nicht nur als Blockadelösung, sondern auch zur Probenverdünnung eingesetzt. Sowohl für die Studie zur Quantifizierung von Aβ-Aggregaten in murinen und humanen Hirnhomogenatproben (siehe Kapitel 4.8) als auch für die Studie zur Quantifizierung von Aβ- und Tau-Aggregaten in caninen Liquorproben (siehe Kapitel 4.9), die bisher lediglich 1× TBS zur Probenverdünnung nutzen, sollte der Einsatz von Blocking-Agenz sowie Detergenz im Probenpuffer zukünftig überprüft werden. Möglicherweise kann auch hier das Signal-Rausch-Verhältnis aufgrund reduzierter unspezifischer Bindungen der Aβ-Aggregate an die Plastikoberfläche oder aufgrund reduzierter Epitopmaskierung im Falle der komplexen Probenmatrix gesteigert werden. Im Zusammenhang mit komplexen Probenmatrices konnten in der vorliegenden Arbeit weitere kommerzielle Puffer überzeugen, wobei diese insbesondere der Reduzierung von Epitopmaskierungen dienten. Um hochaffine Protein-Protein-Interaktionen zu reduzieren, wurde beispielsweise der *LowCross-Buffer STRONG* der Firma Candor Bioscience für die Quantifizierung von Aβ-Aggregaten in humanen Plasmaproben (siehe Kapitel 4.3) oder der *EliA Calprotectin 2 Extraction Buffer* der Firma Thermo Fisher Scientific für die Quantifizierung von α-Synuclein-Aggregaten in humanen Stuhlproben (siehe Kapitel 4.5) verwendet.

Die Änderung der Detektionsantikörperkombination von Nab228 CF633 und 6E10 AF488 auf IC16 CF633 und Nab228 CF488A war eine der bedeutendsten Optimierungen innerhalb der in Kapitel 3.2 durchgeführten Assay-Verifizierung. Sowohl diese Antikörperkombination, die eingesetzten Konzentrationen von je 0,625 µg/mL als auch der etablierte Detektionssondenpuffer 1× TBS-T + 0,1% BSA wurden für weitere sFIDA-Assays, welche die Quantifizierung von aggregierten Aβ-Spezies ermöglichten, übernommen (siehe Kapitel 4.1 und Kapitel 4.8) bzw. geringfügig durch Zusatz von Biozid (siehe Kapitel 4.3) oder Verwendung einer Einkanalanalyse (siehe Kapitel 4.4) modifiziert. Innerhalb der Verifizierungsstudien der sFIDA-Assays zur Quantifizierung von fäkalen α-Synuclein-Aggregaten (siehe Kapitel 4.5 und [222])

sowie DISC1-Aggregaten in humane Liquorproben (siehe Kapitel 4.7 und [221]) konnte sowohl die ermittelte Konzentration von 0,625 µg/mL pro Sonde sowie der obengenannte Detektionssondenpuffer durch eine Steigerung des Signal-Rausch-Verhältnisses überzeugen, sodass beide Parameter als Ausgangspunkt für zukünftige Verifizierungsstudien verwendet werden können.

Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, ist eine Besonderheit der sFIDA-Technologie der Einsatz von mehreren fluoreszenzmarkierten Detektionssonden, welche sowohl die analytische Sensitivität durch Reduzierung des Hintergrundrauschens als auch die analytische Spezifität gegenüber Proteinaggregaten aufgrund einer Mindestanzahl an frei zugänglichen Epitopen erhöht [55]. Gleichzeitig können so jedoch auch unterschiedliche Proteinaggregate sowie Heteroaggregate nachgewiesen und quantifiziert werden. Dass eine Feinjustierung der Detektionssonden für vergleichbare Signalstärken in beiden Fluoreszenzkanälen essenziell ist, wurde in allen drei Studien, welche der simultanen Quantifizierung von Aβ- und Tau-Aggregaten (siehe Kapitel 4.2 und Kapitel 4.9) bzw. α-Synuclein- und Tau-Aggregaten (siehe Kapitel 4.6) dienten, demonstriert. Während bei den anderen Assays stets äquimolare Konzentrationen beider Detektionssonden eingesetzt wurden, unterschieden sich die Konzentrationen teilweise um ein Zehnfaches (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22 – Übersicht über verwendete Detektionssonden sowie deren eingesetzte Konzentration in µg/mL in verschiedenen Studien zur simultanen Quantifizierung von unterschiedlichen Proteinaggregaten aus einer Probe. Zusätzlich zu diesen Parametern sind Probenmatrix und Analyt des jeweiligen sFIDA-Assays sowie das dazugehörige Kapitel verzeichnet.

Kapitel	Probenmatrix	Analyt	Kanal	Antikörper	Konzentration [µg/ml]
4.2	Liquor	Aβ	Kanal 00	Nab228 CF633	0,156
		Tau	Kanal 01	Tau12 CF488A	0,313
4.6	Liquor	α-Synuclein	Kanal 00	211 CF633	0,4
		Tau	Kanal 01	Tau5 CF488A	4,0
4.9	Liquor	Aβ	Kanal 00	Tau5 CF633	2,0
		Tau	Kanal 01	Nab228 CF488A	0,2

Mögliche Ursachen für diese Diskrepanz wurden bereits ausführlich in Kapitel 3.2.4.2 diskutiert. Insbesondere für die fluoreszenzmarkierten Tau5-Antikörper, welche für vergleichbare Messsignale beider Fluoreszenzkanäle sowohl in Anwesenheit von anti-Aβ- als auch anti-α-Synuclein-Antikörpern im zehnfachen Überschuss eingesetzt werden mussten, sollten sowohl die Affinität als auch die Avidität sowie eine mögliche Paratopmaskierung durch die Fluoreszenzmarkierung überprüft und gegebenenfalls die Konjugationschemie substituiert werden.

5.2 Prozessentwicklung

Da aufgrund der Probenlimitierung häufig nur SiNaPs bzw. synthetische Proteinaggregate in Probenpuffer oder bestenfalls in authentischer Probenmatrix wie bovines CSF oder humanes Kontrollplasma für die Festphasenentwicklung zur Verfügung standen, war die Adaptierung des Assays unter Verwendung biologischer Proben essenziell. Insbesondere weil beispielsweise die Eruierung sowie Reduzierung von Matrixeffekten durch präanalytische Maßnahmen, die Untersuchung der Probenstabilität sowie die Beurteilung der Assay-Robustheit spätestens im Rahmen der Assay-Validierung aus regulatorischer Sicht gefordert werden [167, 178]. Im Folgenden werden diese Punkte in Bezug auf die in Kapitel 4.1 bis Kapitel 4.7 aufgeführten Studien zusammengefasst und diskutiert.

5.2.1 Eruierung und Reduzierung von Matrixeffekten

Die analytische Sensitivität sowie Spezifität des Assays wird nicht nur durch das Assay-Format, die Bindungseigenschaften der verwendeten Antikörper, die Zusammensetzung der Reagenzien, sondern auch maßgeblich durch die Matrix, in der sich der zu quantifizierende Analyt befindet, beeinflusst [223-225]. Sowohl endogene als auch exogene Bestandteile der Probenmatrix, sogenannte Matrixeffekte, können mit dem Analyten interferieren und somit sowohl die Struktur, Konformation oder posttranslationale Modifikationen verändern als auch Epitope gänzlich maskieren. Folglich werden dadurch falsch-negative oder falsch-positive Messergebnis erzeugt, was im schlimmsten Fall in einer inkorrekten Diagnosestellung und Behandlung resultieren kann (siehe Abbildung 32) [223-225]. Spätestens im Rahmen der Assay-Validierung wird daher eine Beurteilung solch eines Störers gefordert [167], wobei sowohl die kritische Konzentration innerhalb von Interferenzstudien eruiert sowie mögliche Präventionsmaßnahmen beschrieben werden sollten.

Generell lassen sich Matrixeffekte entweder in Analyt-abhängig oder Analyt-unabhängig Interferenzen unterteilen. Letztere korrelieren nicht mit der Analytkonzentration in der Probe und können daher sowohl bei gesunden Studienteilnehmern als auch bei Patienten vorhanden sein. Hierzu zählen beispielsweise Interferenzen, welche durch die Viskosität, den Salzgehalt, den pH-Wert oder durch das Vorhandensein von Lipiden, Bilirubin sowie Hämoglobin in der Probenmatrix erzeugt werden [223, 225]. Auch heterophile Antikörper oder humane anti-Maus-Antikörpern (englisch: *human anti-mouse antibody*, HAMA) können mit den verwendeten Assay-Antikörpern kreuzreagieren und zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Des Weiteren kann die Anwesenheit von Rheumafaktoren oder anderen interferierenden Proteinen in der Probe eine physische Maskierung der Antikörper oder deren Fluorophore verursachen, sodass falsch-negative Ergebnisse erzeugt werden [181, 223, 224]. Im Gegensatz dazu beziehen sich Analyt-abhängige Interferenzen auf Wechselwirkungen zwischen Probenbestandteilen und

dem Analyten. Beispiele für solche Störfaktoren sind zirkulierende Autoantikörper oder therapeutische Antikörper [225].

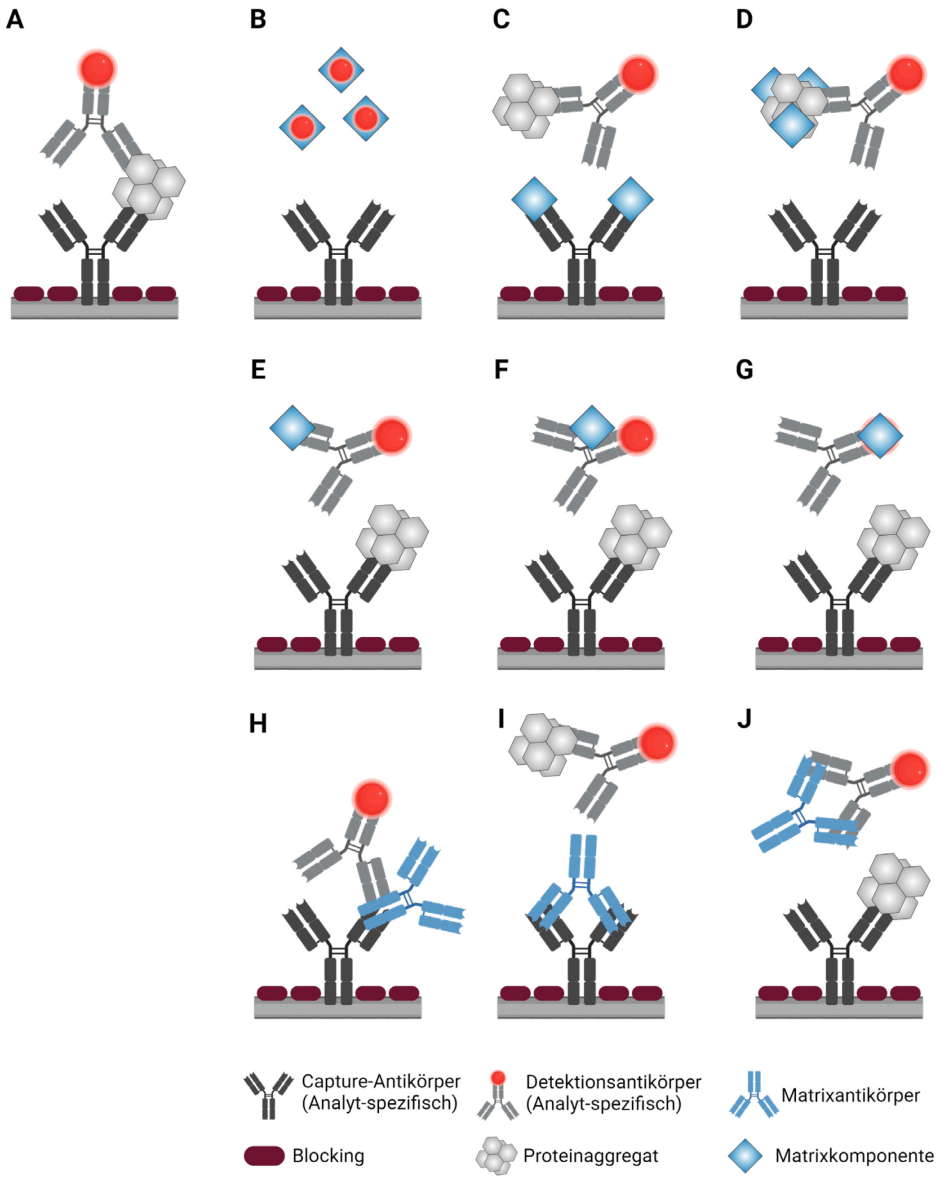


Abbildung 32 – Schematische Darstellung der sFIDA-Oberfläche bei gleichzeitiger Anwesenheit von Matrixeffekten, die aufgrund ihrer molekularen Ursache entweder falsch-positive oder falsch-negative Messsignale erzeugen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde für diese Darstellung auf die Verwendung einer zweiten Detektionssonde verzichtet. **(A)** zeigt die Markierung bereits immobilisierter Aβ-Oligomere bei Abwesenheit von interferierenden Substanzen (Sollzustand, Referenz). Falsch-positive Ergebnisse können beispielweise durch Matrixkomponenten (blaue Quadrate) mit autofluoreszierenden Eigenschaften (roter Kreis) **(B)** oder heterophilen Antikörpern, die mit Capture- sowie Detektionsantikörper kreuzreagieren **(H)**, erzeugt werden. Falsch-negative Messsignale können das Resultat einer ausbleibenden Immobilisierung des Analyten hervorgerufen durch Paratopmaskierung des Capture-Antikörpers **(C)** oder des Epitop des Analyten **(D)** durch Matrixkomponenten sein. Eine weitere Ursache für falsch-negative Messsignale kann die ausbleibende Markierung des Analyten durch den Detektionsantikörper sein, da Matrixkomponenten mit diesem kreuzreagieren und so beispielweise eine Maskierung des Paratops **(E)**, eine sterische Hinderung **(F)**, oder eine Maskierung des Fluorophors des Detektionsantikörpers **(G)** verursachen. Zusätzlich können Matrixantikörper mit anti-idiotypischen Eigenschaften entweder an das Fab-Segment des Capture-Antikörpers **(I)** oder des Detektionsantikörpers **(J)** binden, wodurch sowohl Immobilisierung als auch Markierung des Analyten verhindert werden. Modifizierte Darstellung nach Raem & Rauch [181], erstellt mit BioRender.com.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diverse Verfahren etabliert, um das Vorhandensein und die Ausprägung von Matrixeffekten zu bewerten. Eine erste Beurteilung erfolgte mittels des sogenannten Spikes & Recovery-Experiments. Da Matrixeffekte aufgrund individueller Faktoren variieren können, wurden für die Analyse mindestens drei Proben mit niedriger, mittlerer und hoher endogener Analytkonzentration verwendet. Für das Spike & Recovery-Experiment wurde eine bekannte Menge des Analyten der natürlichen Probenmatrix als auch dem Probenpuffer zugesetzt (Spike), mittels dem jeweiligen Assay quantifiziert und anhand der erfassten Messwerte die prozentuale Wiederfindungsrate (Recovery) berechnet. Lag dabei die Wiederfindungsrate außerhalb der Toleranz, meist ± 25%, indizierte dies das Vorhandensein von Matrixeffekten. Je nach prozentualer Abweichung wurde zudem eruiert, ob durch Matrixeffekte vermehrt falsch-positive (Wiederfindungsrate >125%) oder falsch-negative (Wiederfindungsrate <75%) Messsignale erzeugt wurden. Wurde solch eine Überschreitung des Toleranzbereichs verzeichnet, wurden Matrixeffekte beispielsweise durch präanalytische Maßnahmen wie Vorbehandlung, Pufferoptimierung oder Probenverdünnung reduziert. Letzteres ist im Falle von Oligomer-basierter Diagnostik kritisch zu betrachten, da durch das Verdünnen die bereits geringe Analytkonzentration ebenfalls reduziert wird, wodurch es zu Einbußen der analytischen Sensitivität kommen kann.

Im Bereich der Liquoranalytik wurden für Aβ- als auch α-Synuclein-SiNaPs lediglich vernachlässigbare Matrixeffekte determiniert (Wiederfindungsrate für Aβ-SiNaPs: 100%, siehe Kapitel 4.1, Figure 4c; Wiederfindungsrate für α-Synuclein-SiNaPs: 79%, siehe Kapitel 4.6, Figure 5a). Folglich konnte in den entsprechenden Studien zur Quantifizierung von Aβ- bzw. α-Synuclein-Aggregaten in humanen Liquorproben (siehe Kapitel 4.2, Kapitel 4.6 und Kapitel 4.9) auf präanalytischen Maßnahmen wie Verdünnen oder Pufferadaptierung verzichtet werden. Lediglich bei der Quantifizierung von Tau- sowie DISC1-Aggregaten in humanen Liquorproben wurden Wiederfindungsraten von 36% für Tau-SiNaPs (siehe Kapitel 4.6, Figure 5b) bzw. 40% für DISC1-Aggregate (Ergebnisse aus Spike & Recovery Experiment, Daten nicht gezeigt) determiniert, was das Vorhandensein von Matrixeffekten indizierte. Für DISC1-Aggregate konnten die Matrixeffekte weitestgehend durch Verwendung einer 1:2 Verdünnung in *The Blocking Solution* reduziert werden. Im Gegensatz dazu steht für die Quantifizierung von Tau-Aggregaten weiterhin eine Pufferoptimierung oder Eruierung einer geeigneten Probenverdünnung aus.

Im Gegensatz zur Quantifizierung von Aβ-Aggregaten in humanen Liquorproben wurden bei Verwendung komplexer Probenmatrices wie Plasma, Stuhl oder Hirnhomogenat Matrixeffekten determiniert. Um dennoch eine akkurate Quantifizierung der verschiedenen Proteinaggregate zu gewährleisten, wurden sowohl Plasma-, Stuhl- als auch Hirnhomogenat-proben entweder vor Applikation auf die sFIDA-Oberfläche verdünnt und/oder der

Probenpuffer dementsprechend adaptiert (siehe Kapitel 5.1.4). Während für Plasmaproben eine Inkubation im Well mit *LowCross-Buffer STRONG* genügte (siehe Kapitel 4.3), mussten sowohl humane Stuhlproben (siehe Kapitel 4.4) als auch humane Hirnhomogenatproben (siehe Kapitel 4.8) vor Applikation auf die Assay-Oberfläche 1:5 verdünnt werden. Die Diskrepanz der Interferenzstärken zwischen Aβ-Aggregaten und der jeweiligen Probenmatrix kann beispielsweise durch Analyt-unabhängige Effekte wie die Wechselwirkung mit Lipiden oder Albumin begründet werden. Insbesondere Albumin wurde bereits mehrfach als möglicher Störer in der Quantifizierung von Aβ-Spezies in Plasma beschrieben, da es sowohl mit Aβ-Monomeren als auch kleinen Aβ-Oligomeren innerhalb kürzester Zeit interferiert [212, 213, 226]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass etwa 90-95% der in Plasma vorkommenden Aβ-Spezies in Interaktion mit humanem Serumalbumin stehen [226, 227]. Folglich ist eine Interferenz und die daraus resultierende Epitopmaskierung mit einer Konzentration von 38-49 mg/g [3] an humanem Serumalbumin in Plasmaproben um ein Vielfaches höher als beispielsweise in Liquorproben, wo Konzentrationen von 0,1-0,3 mg/g beschrieben wurden [3].

5.2.2 Einfluss der Präanalytik auf die Probenstabilität

Chemische, mechanische als auch physikalische Faktoren können die Stabilität und die Konzentration des Analyten in der Probe beeinflussen und somit die späteren Messergebnisse maßgeblich verfälschen [178, 183, 184, 228]. Für eine zuverlässige Bioanalytik ist daher eine ausreichende Stabilität des Analyten in der biologischen Matrix während den verschiedenen Prozessschritten von der Probennahme über Lagerung bis hin zur Analyse obligatorisch. Folglich wird die Eruierung der Probenstabilität unter Berücksichtigung verschiedener präanalytischen Untersuchungsparametern wie Lagerungsbedingungen (z.B. Temperatur, Dauer, Tau-Gefrier-Zyklen), diversen Prozessierungen (z.B. Homogenisierung, Extraktion, Zentrifugation, Konzentrierung) und zu verwendeten Verbrauchsmaterialien (z.B. Probenentnahmehilfe, Probensammelgefäß, Gefäß zur Probenaufbereitung) auch im Rahmen des Konformitätsbewertungsverfahren gefordert [167].

Da wie zuvor beschrieben im Kontext von Proteinfehlfaltungserkrankungen bzw. neurodegenerative Erkrankungen meist nicht ausreichend Probenmaterial für alle Studien zur Verfügung steht, wird eine Reduktion der Untersuchungsparametern empfohlen, indem bereits eruierte präanalytische Parameter wie Probengefäße, Prozessierung und Lagerung in die Assay-Entwicklung und speziell in das Studiendesign der Stabilitätsuntersuchung integriert werden. Beispiele hierfür wären die *„Internationalen Leitlinien der Alzheimer-Gesellschaft für Handhabung von Liquor für klinische Routinemessungen Messungen von Amyloid β und Tau*“ [229] sowie die „*Leitlinien für die Standardisierung von präanalytischen Variablen für blutbasierte Biomarker-Studien in der Alzheimer-Forschung*“ [230] im Kontext von AD. In der vorliegenden Arbeit konnte der Einfluss verschiedener präanalytischer Faktoren auf die

Probenstabilität lediglich für Plasmaproben (siehe Kapitel 4.3) und Stuhlproben (siehe Kapitel 4.4) untersucht werden, da nur hier ausreichende Probenmaterial zur Verfügung standen.

Wie bereits mehrfach in der Literatur beschrieben, kann mehrmaliges Auftauen die messbare Konzentration von Aβ-Spezies in Liquorproben reduzieren [231-233], wohingegen für Plasmaproben teilweise lediglich nicht-signifikante Signalverluste verzeichnet wurden [234, 235]. Da sich ein Großteil dieser Studien jedoch ausschließlich auf monomeres Aβ bezieht, wurde in der Studie zur Quantifizierung von Aβ-Aggregaten in humanen Plasmaproben aus Kapitel 4.3 der Einfluss von bis zu sechs Tau-Gefrier-Zyklen auf das messbare Signal von Aβ-Aggregaten analysiert, wobei Schwankungen jedoch kein einheitlicher Trend verzeichnet wurde (siehe Kapitel 4.3, Supplementary Figure 3a). So wurden bei etwa drei der insgesamt sechs getesteten Proben eine ausreichende Stabilität selbst nach sechs Zyklen verzeichnet, wohingegen bei zwei anderen ein Anstieg und bei einer Probe eine Reduzierung des messbaren Signals an Aβ-Aggregaten determiniert wurden. Als Konsequenz sollten ein wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren der Plasmaproben für die Quantifizierung von Aβ-Aggregaten zukünftig beispielsweise durch Aliquotieren der Probe nach Entnahme vermieden werden.

Da es sich bei der Quantifizierung von Proteinaggregaten in humanen Stuhlproben um ein neuartiges Verfahren handelt, stehen in der Literatur bisher keine Studien zur Präanalytik zur Verfügung. Folglich war die Durchführung solcher Stabilitätsstudien obligatorisch. Die in der Studie aus Kapitel 4.3 verwendeten Plasmaproben wurden stets durch qualifiziertes Personal mittels minimal-invasiver Blutabnahme entnommen und anschließend analog etablierten Leitlinien behandelt und eingelagert, um eine ausreichende Probenstabilität bis zur sFIDA-Analyse zu gewährleisten. Im Gegensatz dazu wurden die in der Studie aus Kapitel 4.4 und Kapitel 4.5 verwendeten Stuhlproben im klinischen aber teilweise auch im häuslichen Umfeld gewonnen, sodass eine direkte Einlagerung der Proben bei -80°C nicht immer umgesetzt werden konnte. Stuhl besteht etwa zu 75% aus Wasser und 25% aus festen Bestandteilen, wozu sowohl Kohlenhydrate (6%), Proteine (4%) Fette (2%) sowie mikrobielle Biomasse (25-54% der festen Bestandteile) zählen [236]. Insbesondere die enzymatische Aktivität der mikrobiellen Biomasse kann die Probenstabilität stark beeinträchtigen, sodass Erkenntnisse aus den Bereichen der Liquor- sowie blutbasierten Diagnostik in diesem Falle nicht kurzerhand übernommen werden konnten. Im Rahmen der Studie zur Quantifizierung von Aβ-Aggregaten in humanen Stuhlproben (siehe Kapitel 4.4) wurden daher verschiedene Lagerungs-bedingungen wie Temperatur und Dauer bis zur Einlagerung bei -80 °C untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Temperatur von 4 °C oder kälter die Stabilität bis zu einer Dauer von 18 h nicht beeinträchtigte (siehe Kapitel 4.4, Figure S3). Des Weiteren wurde zudem der Einfluss mehrerer Tau-Gefrier-Zyklen auf die Stabilität der Aβ-Aggregate in nicht-

prozessierten und bereits homogenisierten Stuhlproben analysiert (siehe Kapitel 4.4, Figure 2). Während für nicht-prozessierte Stuhlproben ein Signalverlust der Aβ-Aggregate von bis zu 60% nach mehreren Zyklen verzeichnet wurden, konnte für Stuhlhomogenate aufgrund des etablierten Homogenisierungspuffers sowie der angewandten Homogenisierungsmethode eine ausreichende Stabilität selbst nach sieben Tau-Gefrier-Zyklen gewährleistet werden. So wurde der Anteil an mikrobieller Biomasse sowie deren enzymatische Aktivität durch den Einsatz von Biozid, Protease- sowie Phosphataseinhibitoren im Homogenisierungspuffer sowie mechanischer Separierung weitestgehend reduziert, sodass selbst nach einer Langzeitlagerung von etwa neun Monaten bei -80°C keine Stabilitätsverluste verzeichnet werden konnte.

5.2.3 Zusammenhang zwischen Präanalytik und Assay-Robustheit

Die Robustheit ist ein Maß für die Unempfindlichkeit eines Assays auf Änderungen einzelner Prozessparameter und ermöglicht eine Einschätzung der experimentellen Reproduzierbarkeit der Methode bei Anwesenheit eines unvermeidbaren Fehlers [178, 237]. Da die Einflussgrößen sowohl vom Analyten als auch von der Matrix abhängen, sollten daher innerhalb der Prozessentwicklung kritische Prozessparameter identifiziert und die Empfindlichkeit des Assays auf systematische Änderung dieser eruiert werden. Zu solchen Parametern gehören beispielweise Inkubationsbedingungen (Dauer, Temperatur, Schütteln), Puffereinstellungen (Salzgehalt und pH-Wert), präanalytische Faktoren (tageszeitliche Schwankung der Probenentnahme, Probengefäß, Aliquotierung), ein anderer Operator bzw. ein anderes Laboratorium oder auch die Verwendung unterschiedlicher Messgeräte sowie Reagenzienchargen [175, 178, 237].

Im Kontext von Proteinfehlfaltungserkrankungen wie AD oder PD beziehen sich die derzeitigen Studien meist nur auf präanalytischen Faktoren, welche die Konzentration an monomeren Proteinspezies wie Aβ1-42, tTau und pTau oder α-Synuclein beeinflussen. Über den Effekt solcher Faktoren auf aggregierte Proteinspezies ist derzeit noch wenig bekannt, wodurch die Durchführung solcher Prozessentwicklungsstudien essenziell wird. Dass von den Erkenntnissen monomerer Spezies nicht ohne Weiteres auf aggregierte Spezies geschlossen werden kann, wurde beispielsweise in der Studie von Abdi et al. demonstriert. Hier wurde für Gesamt-α-Synuclein in Liquorproben durch mehrere Überführungsschritte in neue Probenröhrchen ein Signalverlust determiniert, wohingegen das Signal von aggregierten α-Synuclein-Spezies robust war [238]. Im Rahmen der AD-Analytik wurde bereits gezeigt, dass präanalytische Faktoren wie entnommenes Probenvolumen, Punktionsstelle, Dauer bis zur Zentrifugation und Einfrieren, Dauer und Geschwindigkeit der Zentrifugation, Material des Probengefäßes sowie das Probenvolumen und weitere Überführungsschritte während der

Aliquotierung das messbare Signal an monomerem Aβ1-42, tTau und pTau in Liquorproben beeinflussen können und somit einen Einfluss auf die Assay-Robustheit nehmen [229, 231-233, 239]. So wurde beispielsweise mehrfach demonstriert, dass die Konzentration an monomerem Aβ1-42 durch geringes Lagerungsvolumen, Verwendung von Probenröhrchen aus Glas oder Polystyrol sowie durch Überführungsschritte in ein neues Probenröhrchen drastisch reduziert wird. Obwohl die Verwendung von Polypropylen-Röhrchen zwar bereits in einem geringeren Konzentrationsverlust im Vergleich zu Glas oder Polystyrol resultiert, wird dennoch empfohlen, lediglich Polypropylen-Röhrchen mit Low-Binding Eigenschaften zu verwenden. [229, 231, 233]. Um der Adsorption der Proteinaggregate an die Plastikoberfläche weitestgehend entgegenzuwirken, wurden in der vorliegenden Arbeit für alle Analyten stets Probengefäße sowie Pipettenspitzen aus Polypropylen mit Low-Binding Eigenschaften verwendet. Des Weiteren wurde in Kapitel 4.3 der Einfluss mehrerer Überführungsschritte auf die messbare Aβ-Aggregatkonzentration in Plasmaproben analysiert, wobei für den Großteil der Proben bereits nach zweimaligem Überführen ein Signalverlust von mehr als 50% verzeichnet wurde (siehe Kapitel 4.3, Supplementary Figure 3b). Um zukünftig solche Verluste zu reduzieren, könnte wie von Vanderstichele et al. [231] empfohlen, nicht-ionisches Detergenz wie Tween20, Triton X-100 oder NP-40 dem Probenpuffer, in diesem Falle dem *LowCross-Buffer STRONG,* hinzugefügt werden. Diese wirken nicht nur der Adsorption des Analyten an die Oberfläche der Probengefäße entgegen, sondern könnten die Homogenität der Proben erhöhen und somit die Intra-Assay-Varianz weiter reduzieren [174, 175, 231, 238]. Für die Analyse nativer Oligomere muss allerdings sichergestellt werden, dass durch die Detergenzbehandlung die Stabilität der Oligomere nicht beeinflusst wird.

Wie zuvor beschrieben, können neben präanalytischen Faktoren sowohl die Verwendung verschiedener Messgeräte als auch die Durchführung der Assay-Präparation durch einen anderen Operator bzw. in einem anderen Laboratorium die Assay-Robustheit beeinflussen [178, 237]. Insbesondere für die Quantifizierung einzelner Proteinaggregate ist eine hohe Vergleichbarkeit essenziell, sodass standardisierte Arbeitsanweisungen etabliert und Messgeräte regelmäßige gewartet und auf ihre Funktionalität hin überprüft werden sollten [178]. Darüber hinaus wird die Einführung verschiedener Qualitätssicherungstools wie Regelkarten, Cusum oder Shewhart Charts sowie eine ausführliche Dokumentation über verwendete Chemikalienchargen, Gerätschaften sowie Operatoren empfohlen, um Messschwankungen frühzeitig identifizieren zu können [240-242]. Für die Bewertung der Inter-Maschinen-Varianz bzw. Inter-Laboratoriums-Varianz können zum einen Korrelations-analysen als auch der direkte Vergleich der Messwerte beider Messungen verwendet werden [175, 176, 178]. Aufgrund limitiertem Probenvolumen konnten diese Faktoren in der vorliegenden Arbeit lediglich im Rahmen von zwei Studien untersucht werden. Für die

Bewertung der Inter-Maschinen-Varianz wurden Messsignale von DISC1-SiNaPs als auch von DISC1-Aggregaten mit zwei verschiedenen TIRF-Mikroskopen im selben Laboratorium erfasst. Sowohl für DISC1-SiNaPs als auch für synthetische DISC1-Aggregate wurden mit 98,7% bzw. 91,3% hohe Übereinstimmungen determiniert (siehe Kapitel 4.7, Supplementary Figure 2b). Darüber hinaus konnten innerhalb der Inter-Laboratoriumsstudie (siehe Kapitel 4.6, Figure 4a) vergleichbare Konzentrationen an aggregiertem α-Synuclein in humanen Liquorproben determiniert werden (Korrelationskoeffizient nach Pearson: r = 0,950). Im Gegensatz dazu, ergab die Präparation des Tau-Assays im Testlabor geringere Messsignale als die des Referenzlabors (siehe Kapitel 4.6, Figure 4b), sodass keine Vergleichbarkeit der Tau-Aggregatkonzentrationen erzielt werden konnte (Korrelations-koeffizient nach Pearson: r = 0,033).

5.3 Bewertung der analytischen Leistung

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, müssen für die Quantifizierung von Proteinaggregaten in Körperflüssigkeiten verschiedene technische Hürden überwunden werden, wobei sowohl eine hohe analytische Sensitivität als auch eine hohe analytische Spezifität essenziell sind. Darüber hinaus können sowohl Matrixeffekte als auch präanalytische Faktoren die Quantifizierung maßgeblich beeinflussen, sodass im Rahmen verschiedener Validierungsstudien Kriterien für die Probenhandhabung, einschließlich Transport, Lagerung und präanalytische Verfahren wie beispielsweise Homogenisieren oder Verdünnen definiert und der Einfluss endogener als auch exogener Interferenzen eruiert werden müssen, wobei dies bereits im Rahmen der Prozessentwicklung erfolgen kann (siehe Kapitel 5.2) [167].
Im Folgenden wurden die Ergebnisse der Studien aus Kapitel 4.1 bis Kapitel 4.7 zusammengefasst und die analytische Leistung der verschiedenen sFIDA-Assays auf Grundlage mehrerer Validierungsparameter diskutiert, wobei insbesondere Parameter wie Detektions- und Quantifizierungsgrenzen, der dynamische Messbereich, die Verdünnungs-linearität, die Intra- und Inter-Assay Varianz sowie verschiedenen Kontroll- und Interferenz-studien näher betrachtet werden.

5.3.1 Analytische Sensitivität

Im Vergleich zu einem herkömmlichen ELISA ist der Einsatz der Fluoreszenzmikroskopie innerhalb der sFIDA-Technologie zur Erfassung der Messsignale der wohl bedeutendste Unterschied. Folglich wird pro Well nicht ein durchschnittlicher Intensitätswert beispielsweise durch Kolorimetrie, Fluoreszenz oder Lumineszenz [175] ausgegeben, sondern die Pixelanzahl einzelner, auf der Oberfläche immobilisierten und markierten Proteinoligomere determiniert [55]. Während bei herkömmlichen ELISAs Millionen von Enzymkonjugationen pro Well benötigt werden, um spezifisches Signal von Hintergrundrauschen zu unterscheiden,

bedarf es bei sFIDA hierfür lediglich ein einzelnes auf der Assay-Oberfläche immobilisiertes und mit Detektionssonden markiertes Proteinaggregat. Diese Diskriminierung wird durch den Einsatz der TIRFM-Technologie ermöglicht, da hier lediglich Fluorophore mit einer maximalen Entfernung von 200 nm angeregt werden [163-165]. Dies erweitert nicht nur den dynamischen Messbereich, sondern steigert zudem die analytische Sensitivität. Diese ist insbesondere in Hinblick auf die geringen Konzentrationen an Proteinaggregaten in Körperflüssigkeiten wie Liquor, Blut oder Stuhl obligatorisch [20].

Die analytische Sensitivität eines Assays wird sowohl anhand der Detektionsgrenzen (LoB, LoD) sowie der unteren Quantifizierungsgrenze (LLoQ) bewertet (siehe Kapitel 3.1.2.2). In allen Studien, welche die Eignung der sFIDA-Technologie zur Diagnose von Proteinfehlfaltungserkrankungen untersuchten (Kapitel 4.1 bis Kapitel 4.7), wurde der LoD anhand des pixelbasierten Messwertes der mitgeführten Nullkontrolle (Probenpuffer oder biologische Matrix) bestimmt und mittels Kalibration in molare Konzentrationen übersetzt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit demonstrierten sFIDA-Assays fähig sind, einzelne Proteinaggregate bestehend aus Aβ-Peptid, Tau-, α-Synuclein- oder DISC1-Protein sowohl in Probenpuffer als auch in komplexen Matrices einschließlich Liquor, Plasma sowie Stuhl bis in den subfemtomolaren bzw. femotmolaren Konzentrationsbereich akkurat zu detektieren. Wie aus Tabelle 23 ersichtlich, lagen die determinierten molaren Detektionsgrenzen innerhalb der zu erwartenden Konzentrationsbereiche (Liquor: fM - pM, Plasma: aM - fM) [20], was die entwickelten sFIDA-Assays für die biofluidbasierte Diagnostik qualifizierte.

Tabelle 23 – Molare Detektionsgrenzen (LoDs) als Maß für die analytische Sensitivität verschiedener sFIDA-Assays. Neben Anmerkungen zur Berechnung der einzelnen LoDs sind zudem Probenmatrix und Analyt des jeweiligen sFIDA-Assays sowie das dazugehörige Kapitel verzeichnet, wobei die Werte zu Kapitel 4.2 selbst berechnet wurden (Daten im Manuskript nicht gezeigt).

Kapitel	Probenmatrix	Analyt	LoD [fM]	Anmerkung
4.1	Probenpuffer	Aβ	0,28	Kolokalisation, Berechnung mit 2σ
4.2	Liquor	Aβ	8,7	Einkanalanalyse, Berechnung mit 3σ
		Tau	27,1	Einkanalanalyse, Berechnung mit 3σ
4.3	Plasma	Aβ	1,8	Kolokalisation, Berechnung mit 1σ
4.4	Stuhl	Aβ	1,68	Einkanalanalyse, Berechnung mit 2σ
4.5	Stuhl	α-Synuclein	0,3	Kolokalisation, Berechnung mit 3σ
4.6	Liquor	α-Synuclein	6,74	Einkanalanalyse, Berechnung mit 2σ
		Tau	33,7	Einkanalanalyse, Berechnung mit 2σ
4.7	Liquor	DISC1	6,08	Kolokalisation, Berechnung mit 3σ

Wie bereits in Kapitel 4.1 beschrieben, ist ein direkter Vergleich der analytischen Sensitivität verschiedener Oligomer-basierter Diagnostika sowohl durch präanalytische Faktoren, angewandte Quantifizierungsmethoden als auch die Verwendung unterschiedlicher Formeln zur Bestimmung der Detektionsgrenzen sowie unterschiedlichen Kalibrationsstandards nur in limitiertem Umfang möglich. Zumindest können die angegebenen Detektionsgrenzen (meist als Massenkonzentration angegeben) unter Verwendung des Molekulargewichts der verschiedenen Kalibrationsstandards in molare Partikelkonzentrationen umgerechnet werden. So erfolgte in Kapitel 4.1 eine Gegenüberstellung verschiedener Aβ-Quantifizierungsverfahren mit Liquor als Probenmatrix, wobei Assays, welche wie sFIDA Antikörper gegen dieselben oder überlappenden Epitope nutzten, lediglich Sensitivitäten zwischen 100 fM und 1 pM aufwiesen [144, 214, 215]. Im Gegensatz dazu konnte durch den kombinierten Einsatz N-terminaler und Oligomer-spezifischer Assay-Antikörpern Sensitivitäten im niedrigen femtomolaren Konzentrationsbereich wie beispielsweise 0,08 fM [148] oder 31,4 fM [243] erzielt werden. Diese Werte sind mit den analytischen Sensitivitäten der Studien aus Kapitel 4.1 und Kapitel 4.2 vergleichbar. Da die Quantifizierung von Aβ-Aggregaten in Plasma insbesondere durch die deutlich geringere Analytkonzentration und die Interferenz von Matrixeffekten als noch herausfordernder gilt, sind bisher nur wenige Assays in der Literatur beschrieben [244-246], wobei in der Studie von Shea et al. eine mit sFIDA vergleichbare analytische Sensitivität von einem LoD von 1 fM determiniert wurde. Derzeit sind mehrere Assays in der Literatur beschrieben, welche der Quantifizierung von α-Synuclein-Aggregaten [247-250] oder Tau-Aggregaten [251] dienen, jedoch können die in Massenkonzentration angegebenen Detektionsbereiche aufgrund fehlender Informationen bezüglich des Molekulargewichts des jeweiligen Kalibrationsstandards nicht akkurat in molare Partikel-konzentrationen umgerechnet werden.

Darüber hinaus wiesen die entwickelten sFIDA-Assays aus Kapitel 4.1 bis Kapitel 4.7 nicht nur für SiNaPs und synthetische Proteinaggregate, sondern auch für biologische Proben in der jeweiligen Probenmatrix einen linearen Messbereich (Pearson's Korrelationskoeffzienten von 0.96 oder höher) von mehreren Größenordnungen auf, wobei für die untere Quantifizierungsgrenze Werte zwischen 0,3 fM und 63 fM und für die obere Quantifizierungs-grenze Werte zwischen 56 pM und 256 pM verzeichnet wurden. Innerhalb des dynamischen Messbereichs wurden molare Partikelkonzentrationen endogener Aβ-, Tau-, α-Synuclein- und DISC1-Aggregate zwischen 100 aM und 100 pM determiniert, wobei die Konzentrationen je nach Analyten und verwendeter Probenmatrix teilweise stark variierten. Um zukünftig die analytische Sensitivität der jeweiligen Assays zu steigern, muss das Signal-Rausch-Verhältnis, d.h. die Diskriminierbarkeit zwischen Hintergrundrauschen und spezifischem Messsignal weiter erhöht werden. In einigen Studien wurden für biologische Proben jedoch auch Konzentrationen unterhalb des LoDs determiniert. Dies könnte der Tatsache geschuldet sein,

dass für die LoD-Kalkulation stets der pixelbasierte Messwert der mitgeführten Nullkontrolle verwendet wird. Da in den meisten Studien als Nullkontrolle der Probenpuffer verwendet wurde, war das insbesondere im Kontext von Liquorproben problematisch. Wie in Kapitel 4.1, Figure 4 gezeigt, wurde für Probenpuffer im Vergleich zu einer Liquor-Kontrollprobe ein etwa 67% höheres Hintergrundrauschen determiniert. Folglich liegt das Signal von Proben mit sehr geringen Aggregatkonzentrationen unterhalb des Hintergrundrauschens der Pufferkontrolle, sodass diese fälschlicherweise als negativ quantifiziert wurden. Daher wäre es essenziell, die Pufferkontrolle der natürlichen Probenmatrix beispielsweise durch Erhöhung der BSA-Konzentration anzugleichen oder falls vorhanden biologische Matrix ohne Analyten zu verwenden.

Auf der anderen Seite könnte das spezifische Messsignal erhöht werden, indem präanalytische Methoden implementiert oder weitere Assay-Parameter optimiert werden. So könnte beispielsweise die Ausgangskonzentration an Proteinaggregaten in einer Probe mittels Wolframat-Fällung [252] angereichert werden oder eine durch Matrixeffekte verursachte Maskierung der Epitope mittels Immunpräzitation reduziert werden (siehe Kapitel 4.4, Anhang 16). Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, können Proteinaggregate durch Anlagerung von Monomer wachsen. Durch Inkubation der Probe mit dem entsprechenden Proteinmonomer sollte theoretisch die Anzahl an Epitopen für die spätere Immundetektion erhöht werden. Dass dieses Seeding auch in Kombination mit der sFIDA-Technologie möglich ist, wurde bereits in ersten Machbarkeitsanalysen sowohl für Aβ als auch für α-Synuclein demonstriert [216]. Wie auch für andere Immunoassays könnte die indirekte Markierung des Analyten beispielsweise mit Streptavidin-Biotin-Komplex die Amplifizierung des spezifischen Signals ermöglichen [181, 191]. Derzeit wird der Analyt im sFIDA jedoch durch fluoreszenzmarkierte Antikörper direkt markiert, wobei jedoch die Fluorophoranzahl pro Antikörper aufgrund von Affinitätsreduzierung und Quenching-Effekten nicht willkürlich erhöht werden kann und somit keine Signalamplifizierung möglich ist (siehe Kapitel 3.2.4.2).

5.3.2 Analytische Spezifität

5.3.2.1 Präzision

Wie in Kapitel 3.1.2.6 beschrieben, ist die Präzision ein Maß für die Wiederholbarkeit einer Analysemethode, wobei unterschieden wird, ob die Messwerte einer Probe innerhalb eines Assays (Intra-Assay-Varianz) oder zwischen zwei Assays (Inter-Assay-Varianz) miteinander verglichen werden [175, 176, 178].

In allen Studien, welche die Eignung der sFIDA-Technologie zur Diagnose von Proteinfehlfaltungserkrankungen untersuchten (Kapitel 4.1 bis Kapitel 4.7), wurden stets vier Replikate pro SiNaPs- bzw. Aggregatkonzentration und Probe aufgetragen, sodass die Intra-Assay-Varianz anhand des CV%-Wertes dargestellt werden konnte. Im Vergleich zu

herkömmlichen Immunoassays, wo Varianzkoeffizienten bis 10%, meist jedoch nur bis 5% toleriert werden [175], wurden für die entwickelten sFIDA-Assays teilweise deutlich höhere Werte ermittelt. Wie in Tabelle 24 verzeichnet, wurden in den vorliegenden Studien Werte zwischen 11,9% und 28,4% für SiNaPs, 7,9% und 19,1% für synthetische sowie 9,1% und 26,3% für endogene Proteinaggregate determiniert.

Tabelle 24 – Vergleich der prozentualen Varianzkoeffizienten (CV%) als Maß für die Intra-Assay-Varianz verschiedener sFIDA-Assays. Je nach Studie wurden die CV%-Werte für SiNaPs, synthetische Proteinaggregate und endogene Proteinaggregate in humanen Proben determiniert. Aufgrund des Studiendesigns fehlende CV%-Werte wurden durch - gekennzeichnet.

Kapitel	Probenmatrix	Analyt	SiNaPs	Aggregate (synthetisch)	Aggregate (endogen)
4.1	Probenpuffer	Aβ	-	18,4	-
4.2	Liquor	Aβ	13,7	-	13,0
		Tau	11,9	-	9,1
4.3	Plasma	Aβ	15,5	19,1	-
4.4	Stuhl	Aβ	13,4	11,1	18,7
4.5	Stuhl	α-Synuclein	28,4	-	26,3
4.6	Liquor	α-Synuclein	15,8	-	16,8
		Tau	19,1	-	13,0
4.7	Liquor	DISC1	15,8	7,9	-

Jedoch können die Werte aufgrund des digitalen Messwerts nicht direkt mit denen von herkömmlichen ELISAs verglichen werden, da einzelne Partikel detektiert werden. Wird beispielsweise eine Probe mit einer Proteinaggregatkonzentration von 1 fM mit einem Volumen von 20 µL auf die sFIDA-Oberfläche appliziert, sollten theoretisch pro Well etwa 12.000 Proteinaggregate bzw. 14 Proteinaggregate pro Bild quantifiziert werden können (Rechnung siehe Anhang 29). Voraussetzung hierfür ist jedoch die vollständige Immobilisierung sowie Markierung aller in der Probe befindlichen Proteinaggregate durch die verwendeten Assay-Antikörper. Jedoch ist die Effektivität der Antigen-Antikörper-Bindung beispielsweise vom Coating-Prozess, den verwendeten Assay-Puffern sowie vorhandenen Matrixeffekten abhängig [174-176]. Folglich können auch weniger Proteinaggregate beispielweise kein, ein oder zwei Aggregate pro Bild quantifiziert werden, wodurch die Varianz zwischen den Bildern einer Probe steigt. Darüber hinaus fallen Messschwankungen im femtomolaren Konzentrationsbereich höher ausfallen als beispielsweise die im pikomolaren Konzentrationsbereich. Dieses Phänomen wurde 1980 von Horwitz et al. [253] mit der sogenannten „Horwitz-Funktion“ beschrieben, die besagt, dass wenn die Analytkonzentration über zwei Größenordnungen abnimmt, die relative Standardabweichung um Faktor 2 steigt.

Obwohl teilweise sogar Analytkonzentrationen bis in den attomolaren Konzentrationsbereich verzeichnet wurden, lag die durchschnittliche Intra-Assay-Varianz in den aufgeführten Studien sowohl für SiNaPs, synthetische Proteinaggregate sowie biologische Proben dennoch unter 20% (siehe Tabelle 24).

Insbesondere bei der Quantifizierung von Proteinaggregaten, wo einzelne Ereignisse entscheidend für die Diskriminierung von spezifischem Signal und Hintergrundrauschen sein können, ist eine hohe Reproduzierbarkeit zwischen mehreren Messungen essenziell. Um die Wiederholbarkeit zwischen zwei Assays zu beurteilen, wurde in den Studien aus Kapitel 4.1 bis Kapitel 4.7 die Varianz zwischen zwei oder mehreren Messungen ermittelt. Je nach Studie wurden hierfür entweder die prozentuale Abweichung der Messwerte bzw. ein durchschnittlicher Varianzkoeffizient einer Probe im Vergleich zur Referenzmessung kalkuliert oder eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Aufgrund limitiertem Probenvolumen konnten in einzelnen Studien die Inter-Assay-Varianzen teilweise nur für SiNaPs oder synthetische Proteinaggregate bestimmt werden, wobei stets hohe Wiederholbarkeiten (prozentuale Abweichungen oder durchschnittliche CV%-Werte kleiner 20%) determiniert wurde. Für die Studien aus Kapitel 4.4, Kapitel 4.5 und Kapitel 4.6 stand ausreichend Probenmaterial zur Verfügung, sodass zumindest eine Vergleichsmessung durchgeführt werden konnte. So wurden für insgesamt 20 Liquorproben vergleichbare Konzentrationen an α-Synuclein-Aggregate (siehe Kapitel 4.6, Figure 3a, Spearman Korrelationskoeffizient r = 0,96) sowie Tau-Aggregate (siehe Kapitel 4.6, Figure 3b, Spearman Korrelationskoeffizient r = 0,92) ermittelt. Darüber hinaus konnten trotz komplexer Stuhlmatrix sowohl für Aβ-Aggregate in 13 Proben (siehe Kapitel 4.4, Figure 4, Spearman Korrelationskoeffizient r = 0,93) als auch für α-Synuclein in 50 Proben (siehe Kapitel 4.5, Figure 3a, Spearman Korrelationskoeffizient r = 0,92) vergleichbare Partikelkonzentrationen determiniert werden. Innerhalb der Studie zur Quantifizierung von Aβ-Aggregaten in humanen Plasmaproben wurde die Inter-Assay-Varianz von insgesamt sechs Proben innerhalb sechs Wiederholungsmessungen analysiert, wobei eine durchschnittliche Varianz von etwa 42% ermittelt wurde (siehe Kapitel 4.3, Figure 2b). Diese unerwartet hohe Inter-Assay-Varianz könnte durch einen noch nicht definierten präanalytischen Faktor beeinflusst worden sein, welcher zukünftig im Rahmen von Robustheitsstudien eruiert werden muss.

5.3.2.2 Implementierung technischer Assay-Kontrollen

Die analytische Spezifität bzw. Selektivität ist die Fähigkeit einer Analysemethode, den Analyten trotz Anwesenheit anderer Komponenten in der Probe zu detektieren und zu quantifizieren [178, 183, 184]. Wie bereits in Kapitel 5.2.1 beschrieben, kann die Anzahl an potenziellen Störern je nach Probenmatrix stark variieren, sodass eine schnelle Eruierung der genauen molekularen Ursache für die Interferenz selten möglich ist. Um dennoch die

analytische Spezifität einzelner sFIDA-Assays zu bewerten, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals verschiedene Kontrollmechanismen implementiert. Sowohl einfache Mechanismen wie die Fluoreszenzmarkierung verschiedener Oberflächenspezies, Capture-, Autofluoreszenz- sowie Kreuzreaktivitätskontrolle (siehe Kapitel 3.1.2.4) als auch komplexere Verfahren wie Immundepletionsexperimente oder Interferenzstudien (siehe Kapitel 4.3, Kapitel 4.4, Kapitel 4.5 und Kapitel 4.6) ermöglichen nun, vorhandene Schwachpunkte verschiedener Assay-Formate bereits zu einem frühen Zeitpunkt innerhalb der Verifizierung jedoch spätestens im Rahmen der Validierung zu determinieren. Erfolgt zudem die Berechnung der prozentualen Signalreduzierung beispielsweise durch Verzicht des Capture- oder Detektionsantikörper im Vergleich zur Referenz, kann die Güte der analytischen Spezifität quantifiziert werden.

Für einen Großteil der in Kapitel 4 aufgeführten Studien wurden stets Capture-, Autofluoreszenz- sowie Kreuzreaktivitätskontrolle analysiert; jedoch konnte aufgrund limitierter Probenanzahl bzw. limitiertem Probenvolumen komplexere Analysen wie Immundepletionsanalysen lediglich innerhalb der Studien aus Kapitel 4.3, Kapitel 4.4, Kapitel 4.5 und Kapitel 4.6 durchgeführt werden. Für die entwickelten sFIDA-Assays für die Quantifizierung von Aβ-, α-Synuclein- und DISC1-Oligomeren wurden hohe (Signalreduzierung >70%) bis sehr hohe (Signalreduzierung >95%) analytische Spezifitäten verzeichnet (siehe Tabelle 25). Jedoch wurden innerhalb der Studie zur Quantifizierung von Tau-Oligomeren aus Kapitel 4.6 lediglich geringe analytische Spezifitäten determiniert. Sowohl eine unzureichende Capture-Kontrolle (Signalreduzierung lediglich um 33%) als auch eine unzureichende Signalreduzierung durch Depletion (Signalreduzierung lediglich um 38,6%) indizierten dabei unspezifische Interaktionen zwischen Tau und der Assay-Oberfläche sowie die Bildung von Agglomeraten bestehend aus mehreren Tau-SiNaPs. Darüber hinaus scheint Plasma als Probenmatrix die analytische Spezifität des Assays zur Quantifizierung von Aβ-Oligomeren aus Kapitel 4.3 negativ zu beeinflussen. Hier wurden sowohl unspezifische Bindungen an die Assay-Oberfläche (Capture-Kontrolle, Signalreduzierung lediglich um 22,8%) als auch an die Oberfläche der magnetischen Beads im Rahmen der nicht-spezifischen Immundepletion (Signalreduzierung lediglich um 20,2%) determiniert.

Tabelle 25 – Vergleich der prozentualen Signalreduzierung als Maß für die analytische Spezifität verschiedener sFIDA-Assays.
Für die aufgeführten Studien wurde die prozentuale Signalreduzierung für die Capture-Kontrolle, Autofluoreszenzkontrolle, Kreuzreaktivitätskontrolle sowie für die Immundepletion determiniert. Werte <70% indizierten dabei eine unzureichende (rot markiert), Werte zwischen 70% und 95% eine akzeptable und Werte über 95% eine analytische Spezifität.

Kapitel	Probenmatrix	Analyt	Bemerkung	Capture-Kontrolle	Autofluoreszenz-kontrolle	Kreuzreaktivitäts-kontrolle	Immundepletion
4.1	Probenpuffer	Aβ	Synthetische Aggregate	100	100	100	-
4.2	Liquor	Aβ	SiNaPs	97,2	100	100	-
		Tau	SiNaPs	92,6	100	100	-
4.3	Plasma	Aβ	Humane Proben	**22,8**	>99	>97	94,9
4.4	Stuhl	Aβ	Humane Proben	80,8	75,7	75,2	72,6
4.5	Stuhl	α-Synuclein	Synthetische Aggregate Humane Proben (*)	97	100	98	73,0*
4.6	Liquor	α-Synuclein	SiNaPs	100	100	99,9	97
		Tau	SiNaPs	**33**	100	99,8	**38,6**
4.7	Liquor	DISC1	Synthetische Aggregate	100	100	99	-

5.3.2.3 Implementierung diverser Interferenzstudien

Innerhalb Kapitel 5.2.1 wurden bereits verschiedene Maßnahmen zur Eruierung und Reduzierung von Matrixeffekten durch präanalytische Faktoren beschrieben. Darüber hinaus werden im Rahmen der Validierung weitere Interferenzstudien gefordert, mit denen die kritische Konzentration Analyt-abhängiger bzw. Analyt-unabhängiger Störer identifiziert werden sollen [183, 224]. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit beispielweise Korrelationen zwischen Analyt- und Störerkonzentration untersucht (siehe Kapitel 4.4 oder Kapitel 4.6) oder diverse Spiking-Experimente durchgeführt (siehe Kapitel 4.1, Kapitel 4.2, Kapitel 4.3, Kapitel 4.5 und Kapitel 4.6), wobei vor allem der Einfluss von monomeren Proteinspezies, Blut sowie HAMAs im Vordergrund der verschiedenen Analysen standen.

Einfluss von Monomer auf das Messsignal

Eine Hürde von Oligomer-basierten Nachweisverfahren ist der gleichzeitige Überschuss an chemisch identischen Monomeren [20, 225]. Da die sFIDA-Technologie Assay-Antikörper, die gegen dieselben bzw. überlappenden Epitope gerichtet sind, verwendet, sollte theoretisch eine vollständige Unempfindlichkeit gegenüber monomeren Spezies gewährleistet sein. Im Falle einer unzureichenden analytischen Spezifität würde das vorhandene Monomer falsch-positive Signale erzeugen.

Um dies zu überprüfen, wurde in einem Großteil der in Kapitel 4 aufgeführten Studien Pufferkontrollen bzw. Kontrollproben mit der entsprechenden monomeren Proteinspezies versetzt und das Signal mit dem der äquimolaren Konzentration des entsprechenden Proteinaggregats verglichen. Weder für die Quantifizierung von Aβ-Aggregaten (siehe Kapitel 4.1, Kapitel 4.2 und Kapitel 4.3), α-Synuclein-Aggregaten (siehe Kapitel 4.5 und Kapitel 4.6) oder Tau-Aggregaten (siehe Kapitel 4.2 und Kapitel 4.6) wurden Interferenzen mit monomeren Proteinspezies determiniert, wobei hohe analytische Spezifitäten zwischen 98% und 100% verzeichnet wurden. Die Insensitivität gegenüber monomeren Proteinspezies ist nicht nur eine wichtige Kennzahl für die Validierung, sondern schließt falsch-positive Signale durch Monomere insbesondere im Zusammenhang mit einer unzureichenden Capture-Selektivität, wie es in der Studie zur Quantifizierung von Aβ-Aggregaten in humanen Plasmaproben (siehe Kapitel 4.3) bzw. in den Studien zur Quantifizierung von Tau-Aggregaten in humanen Liquorproben (siehe Kapitel 4.2 und Kapitel 4.6) beobachtet wurde, aus.

Um für das zukünftige Konformitätsbewertungsverfahren eine kritische Konzentration an Monomer angeben zu können, sollte diese mittels Titrationsexperimenten für die einzelnen sFIDA-Assays und den entsprechenden Probenmatrices determiniert werden. Im Kontext von komorbiden Proteinopathien sollte zudem der Einfluss anderer relevanter Proteinmonomere auf das Messsignal untersucht werden.

Einfluss von Blutkontamination auf das Messsignal

Insbesondere wenn Proben durch (teil)invasive Verfahren gewonnen werden, ist eine Kontamination der Probe mit Blut möglich. Sowohl intakte sowie bereits hämolysierte Erythrozyten als auch weitere endogene Blutbestandteile wie Albumine oder Antikörper können das Messsignal eines Immunoassays maßgeblich verfälschen [223-225, 254]. Im Kontext von blutbasierten Diagnostika können Erythrozyten während der Blutabnahme aufgrund von mechanischen oder chemischen Einflussfaktoren zerstört werden, wodurch beispielsweise Hämoglobin oder auch Proteasen freigesetzt werden. Des Weiteren werden in etwa 20% der durchgeführten Lumbalpunktionen Gefäßwände verletzt, sodass Liquor durch peripheres Blut kontaminiert wird. Insbesondere im Zusammenhang mit der Quantifizierung von α-Synuclein ist solch eine Verunreinigung durch Hämoglobin bzw. Erythrozyten kritisch zu betrachten, da Blut im Vergleich zu Liquor bekannterweise eine höhere Konzentration an Gesamt-α-Synuclein aufweist. Folglich können bereits kleinste Verunreinigung die Konzentration an α-Synuclein in der Liquorprobe verfälschen, sodass die tatsächliche Menge an α-Synuclein, die aufgrund neurodegenerativer Prozesse freigesetzt wird, nicht beurteilt werden kann [255-257].

Im Rahmen der Studie zur Quantifizierung von Aβ-Aggregaten in humanen Plasmaproben (siehe Kapitel 4.3) als auch der Studie zur Quantifizierung von α-Synuclein- sowie Tau-Aggregaten in humanen Liquorproben (siehe Kapitel 4.6) wurden verschiedene Interferenz-studien etabliert, um den Einfluss von Blut auf die Messsignale zu bewerten. Im Rahmen der erstgenannten Studie wurde eine nicht-hämolytische Kontrollprobe mit steigenden Konzentrationen an hämolytischem Kontrollplasma versetzt und anschließend die kritische Konzentration eruiert, bei der das vorhandene Blut falsch-positive Messsignale erzeugte. Wie aus Kapitel 4.3, Figure 2f ersichtlich, wurden ab 0,5% hämolytischen Plasmas in der Kontrollprobe erhöhte Hintergrundsignale determiniert. Dieser Effekt wirkte sich jedoch nicht auf das Messsignal der getesteten Aggregatkonzentration von 18 ng/mL aus. Um mögliche Effekte im Falle von niedrigeren Analytkonzentrationen ausschließen zu können, ist eine Wiederholung des Experiments mit weiteren Konzentrationen an synthetischen Aggregaten oder biologischen Plasmaproben, welche niedrigere endogene Konzentrationen an Aβ-Aggregaten aufweisen, von Nöten. Um eine Fehlinterpretation der Messergebnisse auszuschließend, sollten humane Plasmaproben, die eine rötliche Färbung aufweisen, was bei einer Konzentration von 0,5% der Fall ist, vorerst von der Analyse ausgeschlossen werden. Sollten zu den jeweiligen Proben Daten über den Grad der Kontamination mit dem jeweiligen Störer, in diesem Falle von Blut, vorhanden sein, kann der Einfluss der Interferenz zudem über Korrelationsanalysen oder weitere statistische Analyseverfahren bewertet werden. Dieses Vorgehen wurde in der zweitgenannten Studie demonstriert (siehe Kapitel 4.6, Supplementary Figure 2a und 2b), indem der Gehalt an Erythrozyten in den humanen Liquorproben

semiquantitativ mittels Combur10-Teststreifen bestimmt wurde und anschließend der Zusammenhang zu den Messsignalen von α-Synuclein- und Tau-Aggregaten analysiert wurde. In diesem Falle konnte die Erzeugung falsch-positiver Signale durch die Kontamination mit Blut für die Quantifizierung von α-Synuclein- und Tau-Aggregaten in humanen Liquorproben ausgeschlossen werden.

Insbesondere für die die Quantifizierung von fäkalen Proteinaggregaten mittels sFIDA sollte zukünftig der Einfluss von Hämoglobin bzw. Erythrozyten auf das Messergebnis überprüft werden, da chronische Entzündungen des Gastrointestinaltrakts wie sie im Zusammenhang mit AD oder PD beschrieben werden ursächlich für erhöhte Konzentrationen an Blut in Stuhlproben sein können. In der Studie aus Kapitel 4.4 wurde in einem kleinen Stichprobenumfang zwar kein Einfluss des Hämoglobingehalts auf die Konzentration an fäkalen Aβ-Aggregaten determiniert (siehe Anhang 16, Table S4), jedoch sollte diese Studie mit einer größeren Anzahl an Proben wiederholt werden. In diesem Zusammenhang sollte zudem überprüft werden, ob die semiquantitative Bestimmung von Erythrozyten bzw. Hämoglobin mittels Combur10-Teststreifen auch für Stuhlhomogenat als Probenmatrix möglich ist. Aufgrund der einfachen und schnellen Handhabung sowie des geringen Probenvolumens könnte diese Analyse standardmäßig für jede Stuhlprobe durchgeführt werden.

Einfluss von HAMAs auf das Messsignal

Neben Rheumafaktoren und Autoantiköpern sind HAMAs insbesondere bei der Nutzung von Plasma als Probenmatrix einer der bekanntesten Störer im Kontext von Immunoassays [223, 224, 254, 258]. Aufgrund der bivalenten Antiköperstruktur können HAMAs mit den aus der Maus stammenden Assay-Antikörpern quervernetzen und so auch in Abwesenheit des Analyten falsch-positive Messsignale erzeugen (siehe Abbildung 32H). Da etwa 5-40% aller Plasmaproben HAMAs mit Konzentrationen zwischen 1 und 100 ng/mL enthalten, ist das Risiko falsch-positiver Messsignale im Kontext blutbasierter Diagnostika deutlich erhöht. Jedoch können solche Interferenzen im Bereich der Liquordiagnostik nicht ausgeschlossen werden, da HAMAs, wenn auch in geringeren Konzentrationen, ebenfalls in Liquorproben zu finden sind [225, 258, 259]

Um eine Quervernetzung der Assay-Antikörpern mit HAMAs nachzuweisen und die Stärke der Interferenz zu beurteilen bzw. zu reduzieren, wurden im Rahmen der Studie zur Quantifizierung von Aβ-Aggregaten in humanen Plasmaproben (siehe Kapitel 4.3) und der Studie zur Quantifizierung von α-Synuclein- sowie Tau-Aggregaten in humanen Liquorproben (siehe Kapitel 4.6) zwei unterschiedliche Interferenzstudien etabliert. Im Rahmen der erstgenannten Studie wurde eine Kontrollprobe mit steigenden Konzentrationen an anti-Maus-Antikörpern versetzt und die Konzentration titriert, bei der sich das Messsignal der versetzten Probe signifikant von der Referenz unterschied. Wie aus Kapitel 4.3, Figure 2e ersichtlich,

resultierte die Verwendung des Maus-Antikörpers Nab228 als Capture aufgrund der Quervernetzung in falsch-positiven Messsignalen und somit in einer geringen analytischen Spezifität. Diese HAMA-Interferenz konnte mittels Substitution des Capture-Antikörpers durch den humanisierten Antikörper Bapineuzumab für physiologische Konzentrationen (1-100 ng/mL) vollständig reduziert werden.

Sollte eine Substitution der Assay-Antikörper nicht möglich sein, können Interferenzen auch durch Blockierung der HAMA-Bindestellen durch Verwendung kompetitiver Antikörper reduziert werden. Dies wurde in der zweitgenannten Studie demonstriert (siehe Kapitel 4.6, Figure 8a und 8b), wobei die Liquorproben vor Applikation auf die Assay-Oberfläche mit dem monoklonalen Maus-Antiköper MOPC versetzt wurden. So wurden die HAMA-Bindestellen während der Inkubation im Probengefäß durch Wechselwirkungen mit dem Fc-Teil der MOPC-Antikörper blockiert, sodass nach Applikation der Probe auf die Assay-Oberfläche keine Quervernetzung mehr möglich war. Im Falle der Positivkontrolle, die lediglich Probenpuffer sowie anti-Maus-Antikörper in äquimolarer Konzentration enthielt, wurde nach Vorbehandlung mit MOPC eine Reduzierung des Messsignals verzeichnet. In diesem Falle wurden HAMA-Interferenzen fast vollständig eliminiert, was durch eine Reduktion falsch-positiver Signal von 98,4% für den α-Synuclein-Assay bzw. 99,7% für den Tau-Assay indiziert wurde. Im Gegensatz dazu, unterschieden sich die Messsignale humaner Liquorproben vor und nach Vorbehandlung mit MOPC nicht voneinander, sodass in diesem Falle für die Quantifizierung von α-Synuclein- und Tau-Aggregaten falsch-positive Messsignale durch HAMA-Interferenzen ausgeschlossen werden konnten.

5.4 Bewertung der klinischen Leistung

Die Fähigkeit eines IVDs den Analyten im Zusammenhang mit einem physiologischen oder pathologischen Zustand unter Einhaltung seiner Zweckbestimmung nachzuweisen, wird als klinische Leistung definiert [167]. Im Rahmen einer umfangreichen klinischen Leistungsstudie wird diese normalerweise anhand der diagnostischen Sensitivität und Spezifität sowie weiteren Leistungsparameter durch den Hersteller bewertet, sodass anschließend zusammen mit der wissenschaftlichen Validität sowie der Analyseleistung eine Aussage über den klinischen Nutzen des IVDs getroffen werden kann [167]. Für die Planung, Durchführung, Aufzeichnung und Berichtserstattung der Studienergebnisse können Hersteller auf harmonisierte Normen wie beispielsweise die „DIN EN ISO 13612: Leistungsbewertung von *in-vitro*-Diagnostika“ [260] oder die DIN EN ISO 20916: Klinische Leistungsuntersuchungen an menschlichem Untersuchungsmaterial – Gute Studienpraxis“ [261] zurückgreifen. Der Umfang klinischer Leistungsstudien ist, wie bereits der regulatorische Aufwand des Konformitätsbewertungs-verfahrens in erster Linie von der Zweckbestimmung und der damit verbundenen Klassifizierung abhängig [167]. Da klinische Leistungsstudien sowohl zeit- und kostenintensiv

sind, werden diese für gewöhnlich erst am Ende der Assay-Entwicklung durchgeführt, wenn bereits gezeigt wurde, dass die analytische Leistung des Assays auch außerhalb des Labormaßstabs gewährleistet werden kann. Für die in Kapitel 4 aufgeführten Assays wurde dieser Transfer noch nicht bestätigt. Gleichzeitig handelte es sich bei einigen Studien um erste Machbarkeitsanalysen, welche zwar keine umfangreiche Bewertung der klinischen Leistung ermöglichten, jedoch das Verständnis über zugrundeliegenden Pathomechanismen verbesserten. Im Folgenden wurden die Ergebnisse der in Kapitel 4.1 bis Kapitel 4.7 aufgeführten Studien zusammengefasst und das Potenzial des jeweiligen Biomarkers für die Diagnose der entsprechenden Proteinfehlfaltungserkrankung diskutiert.

5.4.1 Aβ-Oligomere als diagnostischer Biomarker für AD

Während sich die ATN-Klassifizierung im Rahmen der klinischen Forschung bereits etabliert hat, basiert die Diagnosestellung von AD im Klinikalltag weiterhin auf der klinischen Erscheinung und der Symptomatik der Betroffenen. Da Symptome jedoch erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien auftreten und zudem denen anderer Krankheitsbilder gleichen, resultiert eine rein symptombasierte Betrachtung der Patienten in etwa 10 – 30% der Fälle in einer fehlerhaften Differenzialdiagnose. Dennoch werden bildgebenden Verfahren oder Liquoranalysen, welche die Diagnose aufgrund des Nachweises pathologischer Veränderungen stärken könnten, lediglich in Einzelfällen angewandt. Folglich häufen sich Fälle, in denen Betroffene trotz nicht bestätigter Amyloid-Pathologie fälschlicherweise als MCI oder AD klassifiziert werden. Im Gegensatz dazu werden Betroffene mit SCD-Symptomen und möglicherweise vorhandener Amyloid-Pathologie fälschlicherweise als gesund klassifiziert [67-69, 127]. Pathologische Veränderungen im Gehirn der Betroffenen finden bereits Jahre vor Eintreten der ersten klinischen Symptome statt. Da insbesondere die löslichen, während der Aggregation erzeugten Aβ-Oligomere die höchste Neurotoxizität aufweisen, werden diese als ein potenzieller Biomarker angesehen [20, 61, 262]. Es wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, welche die lokale Konzentration toxischer Aβ-Oligomere im Gehirn reduzieren, darunter die Akkumulation zu Plaques, Degradation durch Mikroglia sowie der Transport in die Peripherie. Folglich besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, Aβ-Oligomere auch in anderen, weniger invasiven Körperflüssigkeiten als Liquor vorzufinden [37-40].

Auf Grundlage des in Kapitel 3.1 etablierten Verifizierungsplans wurden drei verschiedene sFIDA-Assays für die Quantifizierung von Aβ-Oligomeren in Liquorproben (siehe Kapitel 4.2), in Plasmaproben (siehe Kapitel 4.3) sowie in Stuhlproben (siehe Kapitel 4.4) entwickelt. Während sich die ersten beiden Studien auf Änderungen der Aβ-Oligomerkonzentration im Zusammenhang mit dem Krankheitsverlaufs sowie möglicher Clearance-Mechanismen fokussierten, handelte es sich bei der drittgenannten Studie um eine erste Machbarkeitsstudie zum Nachweis fäkaler Aβ-Oligomere.

5.4.1.1 Kombination aus Aβ-Aggregatkonzentration, AT(N)-Klassifizierung und ApoE-ε4-Status könnte diagnostische Trennschärfe erhöhen

Prodromale Krankheitsstadien von AD wie SCD oder MCI sind für klinische Studien von besonderem Interesse, da zu diesem Zeitpunkt die Gehirnfunktion weitestgehend erhalten ist und Patienten am ehesten von einer erfolgreichen Behandlung profitieren könnten. Um das Verständnis dieser Krankheitsstadien, insbesondere SCD zu erhöhen sowie mögliche Risiko- bzw. Schutzfaktoren für frühe Demenzphasen zu identifizieren, wurden seit 2018 im Rahmen der sogenannten multizentrischen DELCODE-Studie des Deutschen Zentrums für Neurodegenerative Erkrankungen (englisch: *DZNE-Longitudinal Cognitive Impairment and Dementia Study)* Proben von insgesamt tausend Studienteilnehmern, darunter gesunde Kontrollen, Probanden mit SCD, MCI oder milder AD, gesammelt. Als explorative Risikogruppe wurden zudem Angehörige ersten Grades von AD-Patienten eingeschlossen [263, 264].

Im Rahmen der Studie aus Kapitel 4.2 wurden in insgesamt 526 Liquorproben die Aβ-Oligomerkonzentration mittels sFIDA bestimmt, wobei unter Berücksichtigung der symptombasierten Diagnose signifikante Unterschiede lediglich zwischen MCI und gesunden Kontrollen determiniert wurden. Anschließend wurden die Kohorten basierend auf vorhandenen Daten zu Aβ1-42, pTau und tTau analog der AT(N)-Klassifizierung nach Jack et al. [67] neu gruppiert. Es konnte erneut gezeigt werden, dass die diagnostische Trennschärfe unter Berücksichtigung der Amyloid-Pathologie insbesondere für MCI-Patienten prinzipiell erhöht werden kann, da etwa 28% der Fälle fehlerhaft als prodromales AD-Stadium klassifiziert wurden, obwohl keine Amyloid-Pathologie vorlag. Darüber hinaus konnten sowohl Probanden mit SCD sowie MCI-Patienten, bei denen pathologische Veränderungen des Aβ-Peptids festgestellt wurde, auf Basis der ermittelten Oligomerkonzentrationen signifikant von den gesunden Kontrollen unterschieden werden. Jedoch war eine Differenzierung zwischen AD-Patienten und gesunden Kontrollen nicht möglich (siehe Kapitel 4.2, Figure 1c). Unter gleichzeitiger Berücksichtigung des Amyloid-Status und den pathologischen Veränderungen des Tau-Proteins konnte zudem gezeigt werden, dass eine erhöhte Aβ-Oligomerkonzentration mit einem frühen Krankheitsstadium, wo noch keine Tau-Pathologie (A+T-) determiniert wurde, assoziiert ist, was die klinische Leistung bezüglich der Diagnose von prodromalen AD-Krankheitsstadien erhöht. Im Vergleich dazu wurde ein Rückgang von Aβ-Oligomeren im späteren Krankheitsverlauf (A+T+) verzeichnet (siehe Kapitel 4.2, Figure 2), was durch verschiedene Clearance-Mechanismen zur Reduzierung der lokalen Konzentration an toxischen Oligomeren begründet werden kann. Da diese Clearance-Mechanismen im Fallen eines positiven ApoE-ε4-Genstatus beeinträchtigt sein können [53, 62-64], wurden Studienteilnehmern in ApoE-ε4-Positive (mindestens ein Replikat des ApoE-ε4-Gens) und ApoE-ε4-Negative klassifiziert. Mittels Regressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass ein positiver ApoE-ε4-Status aufgrund eines eingeschränkten Abtransports in die Peripherie oder

einer eingeschränkten Mikroglia-Aktivität mit höheren Aβ-Oligomerkonzentrationen in Liquor assoziiert ist, wobei diese erst im späteren Krankheitsverlauf im Vergleich zu einem negativen APOE-ε4-Status ihr Maximum erreichen (siehe Kapitel 4.2, Figure 3 und Figure 4). Dieses Ergebnis unterstützt nicht nur die Hypothese, dass die Krankheit bei ApoE-ε4-Positiven schneller voranschreitet, sondern demonstriert zudem, dass die diagnostische Trennschärfe unter Berücksichtigung des ApoE-ε4-Status zusätzlich erhöht werden kann [265-267]. Um dies genauer zu untersuchen, sollten zukünftig entsprechende *Receiver Operating Characteristic*-Analysen mit einem größeren Stichprobenumfang pro Kohorte durchgeführt werden, um die diagnostische Sensitivität als auch Spezifität zu bestimmen.

5.4.1.2 Amyloid- und ApoE-ε4-Status haben Einfluss auf die messbare Konzentration von Aβ-Oligomeren in Plasma

Um zu überprüfen, ob erhöhte Aβ-Oligomerkonzentrationen in Plasma ebenfalls mit einem speziellen Krankheitsstadium assoziiert sind, wurden im Rahmen der Studie aus Kapitel 4.3 insgesamt 359 Plasmaproben der DELCODE-Kohorte mittels sFIDA untersucht. Da zu den 359 Plasmaproben zuvor die Aβ-Oligomerkonzentrationen in Liquor mittels sFIDA determiniert wurden, konnten zudem verschiedene Korrelationsstudien durchgeführt werden, um den Zusammenhang mit dem Clearance-Mechanismus ins Blut zu analysieren.

Analog zu der Studie aus Kapitel 4.2 wurden die Studienteilnehmer erst anhand der symptombasierten Diagnose und anschließend anhand des Amyloid-Status klassifiziert. Unerwarteterweise wiesen Betroffene mit SCD sowie AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant geringere Aβ-Oligomerkonzentrationen in Plasma auf, während sowohl Angehörige ersten Grades als auch MCI-Patienten nicht von der Kontrollgruppe differenziert werden konnten (siehe Kapitel 4.3, Fig. 3a). Diese reduzierte Aβ-Oligomerkonzentration bei AD-Patienten steht im Widerspruch mit bereits publizierten Daten [244, 246, 268]. Während der verwendete sFIDA die Gesamtheit aller in der jeweiligen Plasmaprobe vorhandenen Aβ-Oligomere quantifizierte, verwendeten die anderen Studien hingegen entweder konformationsspezifische Antikörper oder fokussierten sich auf Seeding-fähige Oligomere bzw. vorhandene α-Faltblattstrukturen, was diese Diskrepanz begründen könnte.

Um die einzelnen Kohorten anschließend anhand der zugrundeliegenden Pathologie zu klassifizieren, wurden die Studienteilnehmer anhand ihres Amyloid-Status neu gruppiert, wobei sowohl für Betroffene mit SCD sowie MCI- und AD-Patienten im Falle eines positiven Amyloid-Status signifikant geringere Aβ-Oligomerkonzentrationen in Plasma determiniert wurden. Im Gegensatz dazu war eine Unterscheidung zwischen Studienteilnehmer mit einem negativen Amyloid-Status von gesunden Kontrollen nicht möglich (siehe Kapitel 4.3, Fig. 3b). Folglich konnte die diagnostische Trennschärfe auch im Falle von Plasmaproben unter Verwendung des Amyloid-Status erhöht werden.

Da innerhalb der Studie aus Kapitel 4.2 die Liquorproben der entsprechenden Studienteilnehmer mittels sFIDA vermessen wurden, konnten anschließend Zusammenhänge zwischen den Aβ-Oligomerkonzentrationen in Liquor und in Plasma unter Berücksichtigung des Amyloids- bzw. des ApoE-ε4-Status mittels Korrelationsanalysen untersucht werden. Um hierfür die statistische Aussagekraft zu erhöhen, wurden Kontrollen, Angehörige und Betroffene mit SCD sowie MCI- und AD-Patienten als zwei getrennte Gruppen zusammengefasst. Wie aus Kapitel 4.3, Fig. 4a ersichtlich, korrelierten die Aβ-Oligomerkonzentrationen in Liquor und in Plasma für die Gesamtheit aller Kontrollen, Angehörigen und Betroffenen mit SCD, was indizierte, dass Aβ-Oligomere zumindest teilweise aus Liquor oder direkt aus dem Gehirn stammen. Folglich können erhöhte Oligomer-konzentrationen im Plasma aus einem Anstieg der Oligomerkonzentrationen im Liquor resultieren. Im Gegensatz dazu wurde für die Gesamtheit aller MCI- und AD-Patienten eine inverse Korrelation verzeichnet. Da diese Zusammenhänge für beide Gruppen interessanter-weise nur bei Fällen mit einem negativen Amyloid-Status (Kapitel 4.3, Fig. 4b) bzw. einem negativen ApoE-ε4-Status (Kapitel 4.3, Fig. 4c) nachweisbar waren, wurde der Rückgang an Aβ-Oligomeren in Plasma sowohl mit pathologischen Veränderungen des Aβ-Peptids als auch mit einer genetischbedingten Beeinträchtigung der Clearance begründet. So könnten Aβ-Oligomere im Falle eines positiven Amyloid-Status vermehrt zu Plaques akkumulieren [269], sodass andere Clearance-Mechanismen wie der Transport über die Blut-Hirn-Schranke oder die Diffusion in CSF und anschließendem Transport über die Blut-CSF-Schranke weniger beansprucht werden und keine Korrelation zwischen Aβ-Oligomeren im Liquor und Aβ-Oligomeren im Plasma besteht. Auch im Falle eines positiven ApoE-ε4-Status, bei dem Clearance-Mechanismen wie der Transport über die Blut-Hirn-Schranke oder eine Degradierung durch Mikroglia ineffizient sind [63, 265, 270], könnte die Akkumulation zu Plaques gefördert werden.

Obwohl der entwickelte sFIDA-Assay eine hohe analytische Leistung aufweist (siehe Kapitel 5.3), werden für die Bewertung der klinischen Leistung weitere Studien benötigt, da die Konzentration an Aβ-Oligomeren in Plasma durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird. Um zukünftig Aussagen über den Zusammenhang der Aβ-Oligomerkonzentration und einem bestimmten physiologischen bzw. pathologischen Zustand treffen zu können, sollte das Verständnis über den Krankheitsfortschritt sowie die Funktionsweise der Clearance-Mechanismen weiter erforscht werden. Die diagnostische Trennschärfe könnte insbesondere anhand der Quantifizierung von Aβ-Oligomeren in longitudinalen Plasmaproben in Kombination mit anderen Biomarkerdaten wie Amyloid- oder Tau-Pathologie sowie ApoE-ε4-Status erhöht werden. Darüber hinaus sollten weitere sFIDA-Assays entwickelt werden, um das Vorhandensein von Aβ-Oligomeren in weiteren Körperflüssigkeiten zu überprüfen sowie deren Konzentration zu bestimmen.

5.4.1.3 Fäkale Aβ-Aggregate könnten zukünftig als nicht-invasiven Biomarker zur AD-Diagnostik eingesetzt werden

Das Vorhandensein von Aβ-Aggregaten in Stuhlproben kann aufgrund verschiedener Aspekte wie Störungen entlang der Gehirn-Darm-Mikrobiom-Achse [271-274], lebervermittelte Aβ-Clearance und Elimination durch die Galle [39, 40, 275] sowie die Folgen einer beeinträchtigen Blut-Hirn-Schranke und einer durchlässigen Darmbarriere [272, 273, 276, 277] vermutet werden. Darüber hinaus haben erste Studien bereits einen Zusammenhang zwischen AD und erhöhten intestinalen oder fäkalen Aβ-Konzentrationen demonstriert, wobei nicht zwischen monomeren oder aggregierten Aβ-Spezies differenziert wurde [278-280].

Daher sollte im Rahmen einer Machbarkeitsanalyse (siehe Kapitel 4.4) überprüft werden, ob aggregierte Aβ-Spezies in Stuhlproben vorhanden sind und ob deren Konzentrationen mit einem bestimmten pathophysiologischen Zustand assoziiert sind. Hierzu wurden Stuhlproben von 26 AD-Patienten sowie von 31 gesunden Kontrollen in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Köln gesammelt. Wie auch in den vorherigen Studien aus Kapitel 4.2 und Kapitel 4.3 wurden die Studienteilnehmer anhand ihrer Symptomatik diagnostiziert, jedoch wurde in Fällen einer kognitiven Beeinträchtigung der Amyloid-Status mittels Liquoranalytik oder bildgebenden Verfahren überprüft. Folglich wurden für die Studie ausschließlich Probanden mit vorhandener Amyloid-Pathologie eingeschlossen, wobei 22 als MCI und vier als dement eingestuft wurden. Anschließend wurden die Stuhlproben mittels sFIDA analysiert, wobei niedrige femtomolare bis niedrige pikomolare Aβ-Aggregatkonzentrationen determiniert wurden (siehe Kapitel 4.4, Figure 5B). Im Vergleich zu gesunden Kontrollen wiesen AD-Patienten in Stuhl signifikant höhere Konzentrationen an Aβ-Aggregaten auf, was mit bisherigen Erkenntnissen über die Konzentration an Aβ-Aggregaten in Liquor übereinstimmt (siehe Kapitel 4.2 und [144, 147, 148, 153, 281, 282]).

Aufgrund der hohen Spezifität für aggregierte Aβ-Spezies konnte der entwickelte sFIDA-Assay gesunde Kontrollen in etwa 90% der Fälle von AD-Patienten differenzieren (siehe Kapitel 4.4, Figure 5C). In einzelnen Fällen wurden für Kontrollen ebenfalls erhöhte Aβ-Aggregat-konzentrationen determiniert, was jedoch mit einer unzureichenden Klassifizierung dieser Kohorte begründet werden konnte. Da der Ausschluss einer kognitiven Beeinträchtigung der Kontrollprobanden lediglich anhand einer subjektiven Einschätzung erfolgte, können an dieser Stelle erste Defizite sowie das Vorhandensein einer Amyloid-Pathologie als auch einer genetischen Prädisposition für AD nicht ausgeschlossen werden. Die diagnostische Sensitivität betrug lediglich 54% (siehe Kapitel 4.4, Figure 5C), da AD-Patienten teilweise auch niedrigere fäkale Aβ-Aggregatkonzentrationen aufwiesen. Wie bereits in Kapitel 4.3 erörtert, könnte dies sowohl einer beeinträchtigen Clearance aus dem Gehirn als auch genetischer Faktoren geschuldet sein.

Da jedoch für AD-Patienten höhere Aβ-Aggregatkonzentrationen im Vergleich zu gesunden Kontrollen determiniert wurden, scheinen weitere Mechanismen bzw. Einflussfaktoren zu greifen, was die Bewertung als Biomarker weitaus komplexer macht. So könnte eine ineffiziente periphere Clearance erhöhte Konzentrationen in Stuhl erklären. Aβ gelangt normalerweise über den Blutkreislauf zur Leber, wo es anschließend in Hepatozyten degradiert, über die Galle in den Darm sezerniert und letztlich mit dem Stuhl ausgeschieden wird [39, 40, 275]. Sollte eine eingeschränkte Leberfunktion vorliegen, wäre somit die Degradierung beeinträchtigt und folglich auch die messbaren Aβ-Aggregatkonzentrationen in Stuhl erhöht. Um die diagnostische Trennschärfe zu erhöhen, sollten Serummarker zur Beurteilung der Leberfunktion wie Bilirubin, Albumin, alkalische Phosphatase, Alanin-Aminotransferase und Aspartat-Aminotransferase untersucht werden. Insbesondere ein erhöhtes Verhältnis der beiden Aminotransferasen wurde bereits mit der AD-Pathologie, sprich mit einem kognitiven Verfall, einer reduzierten Konzentration von Aβ1-42 sowie einer vorhandenen Tau-Pathologie in Liquor und erhöhtem Plaque-Vorkommen in Verbindung gebracht [275, 283-285].

Derzeit ist die Funktionsweise der bidirektionalen Kommunikation zwischen Gehirn, Darm und Mikrobiom noch nicht vollständig untersucht. Jedoch wurde bereits mehrfach demonstriert, dass Veränderungen des Darmmikrobioms eine Immunaktivierung verursachen können, was in einer systematischen Entzündung resultiert, die wiederum die Integrität der Darmbarriere sowie der Blut-Hirn-Schranke beeinträchtigt [272-274, 276]. So könnten Aβ-Aggregate aus dem Gehirn direkt in das Darmlumen gelangen, indem sie sowohl die Blut-Hirn-Schranke als auch die Darmbarriere passieren. Darüber hinaus könnten sich Aβ-Aggregate mittels Neuron-Neuron-Transport oder zellulären Transport mittels Astrozyten, Fibroblasten, Mikroglia und Zellen des Immunsystems vom Gehirn aus in die Peripherie einschließlich des enterischen Nervensystems verbreiten. Sowohl im zentralen als auch im enterischen Nervensystem produzierte Aβ-Aggregate könnten von dort aus ebenfalls in das Darmlumen gelangen und so die Konzentration in Stuhl weiter erhöhen. Darüber hinaus wird eine große Menge an amyloiden Proteinen vom Darmmikrobiom produziert. Da diese amyloiden Proteine ebenfalls Cross-β-Struktur aufweisen, könnten Prion-artige Mechanismen greifen, welche sowohl die Fehlfaltung, Aggregation und Akkumulation von Aβ induzieren und somit ebenfalls in erhöhten Aggregatkonzentrationen in Stuhl resultieren [286, 287]. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass periphere amyloide Proteine wie von *E. coli* (Curli), *Bacillus subtilis* (TasA), *Salmonella Typhimurium* (CsgA), *Pseudomonas fluorescens* (FapC) und *Staphylococcus aureus* (phenollösliche Moduline) zur AD-Pathologie beitragen, indem sie die Aβ-Oligomerisierung und Fibrillogenese fördern [287-289].

Um das Verständnis zwischen der Gehirn-Darm-Mikrobiota-Achse sowie fäkalen Aβ-Aggregaten zu erhöhen, sollten in zukünftigen Studien weitere Biomarkerdaten erhoben

werden, welche sowohl systematische Entzündungen, eine erhöhte Durchlässigkeit der Darmbarriere sowie Stoffwechselprodukte des Mikrobioms abbilden. Biomarker, die bereits im Kontext von AD untersucht wurden, sind beispielsweise fäkales Calprotectin [272, 286, 290], kurzkettige Fettsäuren [288, 291, 292], sekundäre Gallensäuren [285, 289, 291, 293], ribosomale Ribonukleinsäureprofile [294] und Lipopolysaccharide [271, 273, 275, 276, 288, 294].

Während in den Studien aus Kapitel 4.2 und Kapitel 4.3 Aussagen über die Änderung der Aβ-Aggregatkonzentration im Zusammenhang mit dem Krankheitsstadium getroffen werden konnten, war dies in Bezug auf fäkale Aβ-Aggregate aufgrund der geringen Anzahl an Studienteilnehmer mit einer durch AD-Pathologie erzeugte Demenz zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Daher sollten zukünftig longitudinale Proben von einer weitaus größeren Anzahl an Studienteilnehmern einschließlich gesunder Kontrollen, Betroffene mit SCD sowie MCI- und AD-Patienten gesammelt und insbesondere auf tages(zeit)abhängige Konzentrationsänderungen sowie der Einfluss der Ernährung hin untersucht werden. Sollten auch bei einem größeren Stichprobenumfang höhere Aβ-Aggregatkonzentrationen mit einem pathophysiologischen Zustand und insbesondere mit einem prodromalen Krankheitsstadium assoziiert sein, wäre dies ein bedeutender Fortschritt für eine nicht-invasiven Diagnose von AD.

5.4.1 Tau-Oligomere als diagnostischer Biomarker für Tauopathien

Neurodegenerative Erkrankungen, die durch die Fehlfaltung, Aggregation und Akkumulation des Tau-Proteins sowohl in Neuronen, Gliazellen oder im extrazellulären Raum gekennzeichnet sind, werden als Tauopathien definiert. Derzeit sind mehr als 26 Krankheitsbilder beschrieben, wobei vor allem Symptome wie Demenz oder Parkinsonismus vorherrschend sind. In der Regel erfolgt die Diagnose im Klinikalltag anhand der Symptomatik, wodurch Patienten insbesondere in frühen Krankheitsstadien häufig fehldiagnostiziert werden. Auf molekularer Ebene unterscheiden sich Tauopathien jedoch anhand der zugrundeliegenden Pathologie (primäre oder sekundäre Form), der vorherrschenden Isoform (3R, 4R, 3R/4R) oder der Lokalisation sowie des Aussehens der Tau-Akkumulationen, sodass für Biomarker-basierte Diagnostika ein hohes Potenzial besteht [46, 70, 71, 73-75, 295]. Sowohl bildgebende Verfahren wie MRT, FDG-PET oder Tau-PET als auch die Konzentrationsbestimmung von pTau und tTau in CSF könnten dem Nachweis einer Tau-Pathologie bzw. neurodegenerativer Prozesse dienen und somit die diagnostische Genauigkeit erhöhen. Jedoch werden diese Verfahren derzeit in der Routinediagnostik noch nicht angewandt [12, 20, 55].

Um zukünftig die diagnostische Genauigkeit weiter zu erhöhen und Auskunft über den klinischen Verlauf der Erkrankung sowie das Ansprechen auf medikamentöse Therapien zu

erlangen, sollte ein sFIDA-Assay zum quantitativen Nachweis von Tau-Aggregaten in humanen Liquorproben auf Grundlage des in Kapitel 3.1 etablierten Verifizierungsplans entwickelt und dessen klinische Leistung bezüglich der Diagnose von Tauopathien eruiert werden (siehe Kapitel 4.2 und Kapitel 4.6). Insbesondere Patienten mit einer progressiven supranukleären Blickparese, einer schnell voranschreitenden primären 4R-Tauopathie, wiesen signifikant höhere Tau-Aggregatkonzentrationen als gesunde Kontrollen oder AD-Patienten auf (siehe Kapitel 4.6, Fig. 9b). Um zu überprüfen, ob zukünftig die Differenzierung zu α-Synucleinopathien auf Grundlage von Tau-Aggregatkonzentrationen verbessert werden könnte, wurden in der Studie aus Kapitel 4.6 zusätzlich Liquorproben von PD-Patienten bzw. von Patienten mit einer Demenz mit Lewy-Körperchen analysiert. Im Vergleich zur untersuchten primären Tauopathie wurden für beide Krankheitsbilder signifikant geringere Aggregatkonzentrationen nachgewiesen. Folglich können Patienten mit progressiver supranukleären Blickparese trotz einer möglichen symptomatischen Überlappung mit α-Synucleinopathien mittels sFIDA diagnostisch differenziert werden.
Obwohl extrazelluläre Neurofibrillenbündel bestehend aus aggregierten Tau-Spezies sowie erhöhte Konzentrationen an monomerem tTau und pTau Kennzeichen für AD sind, wurden für AD-Patienten sowohl in dieser Studie (Kapitel 4.6, Fig 9b) als auch in der Studie aus Kapitel 4.2, Fig. 1b keine erhöhten Tau-Aggregatkonzentrationen im Vergleich zu gesunden Kontrollen determiniert. Da es sich bei AD um eine sekundäre Tauopathie handelt, könnte dies mit den erst zum Zeitpunkt einer mittelschweren oder schweren Demenz einsetzenden pathologischen Veränderungen des Tau-Proteins begründet werden [251, 296]. Diese Hypothese trifft insbesondere für die Studie aus Kapitel 4.2 zu, da hier mehrheitlich Patienten, welche sich in einer prodromalen AD-Krankheitsphase wie SCD oder MCI befanden bzw. eine milde Demenz aufwiesen, eingeschlossen wurden. Um zukünftig eine Auskunft über den klinischen Verlauf einer Tauopathie im Zusammenhang mit der Tau-Aggregatkonzentrationen in Liquor geben zu können und dadurch insbesondere die Differenzialdiagnose in frühen Krankheitsstadien zu verbessern, sollten Liquorproben über einen Zeitraum von mehreren Jahren gesammelt und analysiert werden.

5.4.2 α-Synuclein-Oligomere als diagnostischer Biomarker für α-Synucleinopathien

PD, Parkinson mit Demenz, Demenz mit Lewy-Körperchen sowie multiple Systematrophie werden aufgrund der Fehlfaltung, Aggregation und Akkumulationen des α-Synuclein-Proteins als α-Synucleinopathien definiert. Insbesondere die idiopathische REM-Schlafstörung wird mittlerweile als prodromale Krankheitsphasen angesehen, da Betroffene im späteren Stadium solch eine Krankheiten entwickeln. Derzeit basiert die Diagnose von α-Synucleinopathien auf der klinischen Beurteilung sowie bildgebenden Verfahren, wobei letztere entweder kostspielig

sind oder insbesondere in frühen Krankheitsstadien eine unzureichende Sensitivität aufweisen [46, 62, 86, 93, 97, 99, 100].

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einen sFIDA-Assays zum quantitativen Nachweis von α-Synuclein-Aggregaten in humanen Liquorproben auf Grundlage des in Kapitel 3.1 etablierten Verifizierungsplans zu entwickeln und dessen klinische Leistung an einem umfangreichen Probenpanel, welches unteranderem sowohl Proben von Patienten mit PD, Demenz mit Lewy-Körperchen als auch eine neurologisch gesunde Kontrollgruppe umfasste, zu eruieren (siehe Kapitel 4.6). Wie erwartet wurden teilweise Überlappungen zwischen den getesteten Gruppen verzeichnet, jedoch waren α-Synucleinopathie-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe mit höheren α-Synuclein-Aggregatkonzentrationen assoziiert [247, 249, 250]. Bezogen auf die Gesamtheit an α-Synucleinopathie-Patienten wurde eine diagnostische Sensitivität von 64,9% sowie eine diagnostische Spezifität von 73,3% verzeichnet, wohingegen PD-Patienten bzw. Patienten mit Demenz mit Lewy-Körperchen von gesunden Kontrollen mit einer diagnostischen Sensitivität von 64,3% bzw. 84,2% sowie einer diagnostischen Spezifität von 73,3% bzw. 60,0% diskriminiert werden konnten. Diese Werte sind mit bisher veröffentlichten Studien vergleichbar (Majbour et al.: Sensitivität 89%, Spezifität 52% [247]; Tokuda et al.: Sensitivität 75%, Spezifität 88% [249]). Dennoch sollte die diagnostische Trennschärfe zukünftig beispielsweise durch Kombination weiterer Biomarker-daten wie die Gesamtkonzentration an α-Synuclein die Konzentration an phosphoryliertem α-Synuclein erhöht werden [247, 248, 257].

Obwohl sich pathophysiologische Prozesse im Gehirn anhand von verändernden Biomarkerkonzentrationen in Liquor widerspiegeln, wären periphere Biomarker im Kontext von α-Synucleinopathien beispielsweise aufgrund des beschriebenen Zusammenhangs zwischen Gehirn, Darm, Mikrobiom und enterischen Nervensystem besonders interessant [89, 297-301]. Daher wurde ein sFIDA-Assay zur quantitativen Bestimmung fäkaler α-Synuclein-Aggregate unter Berücksichtigung des in Kapitel 3.1 etablierten Verifizierungsplans entwickelt [222] und im Rahmen der in Kapitel 4.5 aufgeführten Studie anhand eines umfangreichen Probenpanels, welches sowohl Stuhlproben von gesunden Kontrollen, PD-Patienten sowie Patienten mit einer REM-Schlafstörung umfasste, validiert. Hierbei konnte nicht nur demonstriert werden, dass α-Synuclein-Aggregate vom Körper in das Lumen des Gastrointestinaltraktes sezerniert und mit dem Stuhl ausgeschieden werden, sondern auch, dass sich deren Konzentrationen während des Krankheitsfortschritts verändern. Während sich die Konzentrationen an fäkalen α-Synuclein-Aggregaten von PD-Patienten nicht von gesunden Kontrollen unterschieden (diagnostische Sensitivität: 6,4%, diagnostische Spezifität: 96,1%), waren die Proben von Patienten mit einer REM-Schlafstörung mit signifikant höheren Konzentrationen an fäkalen α-Synuclein-Aggregaten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (diagnostische Sensitivität: 76,4%, diagnostische Spezifität: 49,0%) als auch PD-Patienten (diagnostische Sensitivität:

80,6%, diagnostische Spezifität: 52,1%) assoziiert. Da ein Großteil der Patienten mit einer REM-Schlafstörung zu einem späteren Zeitpunkt der Pathogenese eine α-Synucleinopathie entwickelt, weisen fäkale α-Synuclein-Aggregate demnach ein hohes Potenzial als möglichen Biomarker für die Frühdiagnose von prodromalen α-Synucleinopathien auf. Um dies zu beurteilen und um das Verständnis über die Dynamik der Sezernierung von α-Synuclein-Aggregaten in Stuhl zu erhöhen, sollten zukünftig die Konzentrationen in Longitudinalproben sowohl von Patienten mit einer REM-Schlafstörung als auch PD-Patienten untersucht werden. Würden in diesem Kontext zudem die Konzentration an α-Synuclein-Aggregaten in Liquorproben derselben Patienten quantifiziert werden, könnten neue Erkenntnisse über den Ursprungsort von α-Synucleinopathien gewonnen werden, da beispielsweise für PD das Gehirn und für REM-Schlafstörungen der Darm als Ursache diskutiert werden [297-299]. Darüber hinaus wurde das Vorhandensein von α-Synuclein-Aggregaten in anderen Körperflüssigkeiten wie Speichel, Tränenflüssigkeit, Urin und Blut bereits durch einige Studien demonstriert [302-308]. Um die Zweckbestimmung des entwickelten sFIDA-Assays dahingehend zu erweitern, sollte das Assay-Setup unter Berücksichtigung des etablierten Verifizierungsplans (siehe Kapitel 3.1) und weiterer Studien zur Eruierung und Reduzierung von Matrixeffekten sowie Studien zur Beurteilung der Probenstabilität für die jeweilige Matrix (siehe Kapitel 5.2) adaptiert werden.

5.4.3 Quantifizierung von DISC1-Oligomeren – Erster Schritt in Richtung einer Biomarker-basierten Diagnostik von chronisch mentalen Erkrankungen

Derzeit leiden etwa 800 Millionen Menschen weltweit an einer chronisch mentalen Erkrankung, welche sich klinisch beispielsweise als Schizophrenie, bipolare Störung oder unipolare Depression manifestiert. Trotz jahrzehntelanger wissenschaftlicher Bemühungen stehen derzeit immer noch keine validierten Biomarker-basierten Verfahren zur Diagnose zur Verfügung, sodass die Diagnose im Klinikalltag weiterhin auf einer subjektiven Einschätzung des Psychiaters basiert. Stattdessen werden biologisch fundierte Diagnostika lediglich zum Ausschluss bestimmter Erkrankungen als Ursache für die Psychose wie Traumata, Drogenintoxikation oder neurodegenerative Prozesse angewandt. Aufgrund von zeitlich variierenden Krankheitsschüben, die darüber hinaus durch unterschiedliche klinische Ausprägungen sowie Symptomstärken gekennzeichnet sind, müssen Patienten meist über Jahre hinweg beobachtet werden, damit eine fundierte Differenzialdiagnose anhand der DSM-IV bzw. ICD-10 Kriterien gestellt werden kann [43, 62, 112, 121]. Nichtsdestotrotz ist die Validierung eines zuverlässigen Biomarkers angesichts der lebenslangen Morbidität für diagnostische Zwecke und für die Entwicklung krankheitsverändernder Therapeutika von entscheidender Bedeutung. Erste Studien identifizierten unlösliche DISC1-Aggregate in *post mortem* Gehirnen als potenziellen Biomarkerkandidaten, da deren Anwesenheit eine

pathophysiologische Einteilung psychisch Erkrankter in die Subgruppe der „DISC1opathie“ ermöglichte, wobei hierzu sowohl Fälle von Schizophrenie als auch schizoaffektive Störungen zählen [43, 103, 105, 107, 112, 113, 119, 121]. Jedoch ist der Nachweis unlöslicher DISC1-Aggregate als diagnostisches Verfahren aufgrund der extremen Invasivität zur Gewinnung von Hirnproben *ante mortem* nicht möglich.

Daher wurde im Rahmen der in Kapitel 4.7 aufgeführten Studie mittels sFIDA untersucht, ob lösliche DISC1-Aggregate prinzipiell in Liquorproben vorhanden sind und ob eine quantitative Diskriminierung zwischen Erkrankten und Gesunden möglich ist bzw. eine Differenzialdiagnose gestellt werden kann. Hierzu wurde auf Grundlage des in Kapitel 3.1 ausgearbeiteten Verifizierungsplan und der Nutzung von DISC1-SiNaPs bzw. synthetischen DISC1-Aggregaten ein sFIDA-Assay entwickelt, welcher eine hohe analytische Sensitivität sowie Spezifität des sFIDA-Assay aufwies und eine akkurate sowie präzise Quantifizierung aggregierte DISC1-Spezies bis in den niedrigen femtomolaren Konzentrationsbereich ermöglichte (siehe Anhang 19, Supplementary Fig. 1, Fig. 2 und Fig.3). In der vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass sich in Liquor lösliche DISC1-Aggregate befinden und dass Patienten mit einer ersten psychotischen Episode (englisch: *first-episode psychosis*, FEP) von Gesunden basierend auf erhöhten DISC1-Konzentrationen unterschieden werden konnten (siehe Kapitel 4.7, Fig. 2a). Wie auch im Klinikalltag wurde in diesem Probenset die Differenzialdiagnostik von FEP-Patienten nachträglich neu gestellt. Unter der Annahme, dass es sich bei dieser Diagnose nach 18 Monaten um eine solidere handelt, wären in diesem Zusammenhang Patienten mit schizoaffektiven Störungen sowie für Patienten mit einer nicht spezifizierten Schizophrenie mit signifikant erhöhte DISC1-Aggregatkonzentrationen assoziiert (siehe Kapitel 4.7, Fig. 2d). Im Umkehrschluss würde das bedeuten, dass die Differenzialdiagnose bereits bei der Erstaufnahme der Patienten anhand der DISC1-Aggregatkonzenration gestellt werden könnte. Da jedoch die Anzahl der klinischen Subgruppen insbesondere die der schizoaffektiven Störungen in der vorliegenden Studie zu gering war, sind sowohl die diagnostische Sensitivität von 69.2% und die diagnostische Spezifität von 89.4% ein vorläufiges Ergebnis (siehe Kapitel 4.7, Fig. 3), welches mit einem größeren Stichprobenumfang revalidiert werden muss. Sollte dadurch die klinische Leistung des entwickelten sFIDA-Assays gesteigert werden, könnte die Quantifizierung löslicher DISC1-Aggregate aus Liquorproben nicht nur für diagnostische Zwecke verwendet werden, sondern die Entwicklung krankheitsverändernder Therapeutika maßgeblich vorantreiben, indem so Wirkungs-mechanismus als auch Target Engagement beurteilt werden könnten. Die Einteilung in DISC1-positive bzw. DISC1-negative Fälle anhand der ermittelten Aggregatkonzentrationen könnte nicht nur der Patientenstratifizierung im Rahmen von (prä-) klinischen Studien dienen, sondern im Klinikalltag zudem die Identifizierung der Patienten, die mit größter Wahrscheinlichkeit von einer Behandlung profitieren würden, ermöglichen. Die

Adaptierung des Assays auf weniger invasive Probenmatrices wie Serum oder Plasma könnte die routinemäßige Anwendung in allen Bereichen zudem verbessern [101, 103, 106, 110, 119].

5.4.4 Anwendung der sFIDA-Technologie innerhalb der präklinischen Medikamentenentwicklung

Wie eingangs in Kapitel 1.2.4 beschrieben, ist die Reduzierung und Eliminierung von Oligomeren eine vielversprechende Strategie für die Entwicklung von Medikamenten für Proteinfehlfaltungserkrankungen [2, 15]. In den letzten Jahren hat die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Willbold den vielversprechenden Protease-resistenten und nicht immunogenen Wirkstoffkandidaten RD2 entwickelt, der zum einen Aβ-Monomere in ihrer nativen, ungeordneten Konformation stabilisiert und gleichzeitig Aβ-Aggregate zu nativen Aβ-Monomeren dissoziiert (siehe Abbildung 33) [201, 309, 310]. Im Rahmen der Arzneimittelentwicklung muss solch ein Wirkstoffkandidat sowohl die präklinische Phase als auch mehrere klinische Phasen erfolgreich durchlaufen [311]. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Studien aufgeführt, welche die Anwendung von sFIDA im Rahmen der präklinischen Phase demonstrieren. Hierbei wurde sowohl der Wirkungsmechanismus sowie das Target Engagement untersucht.

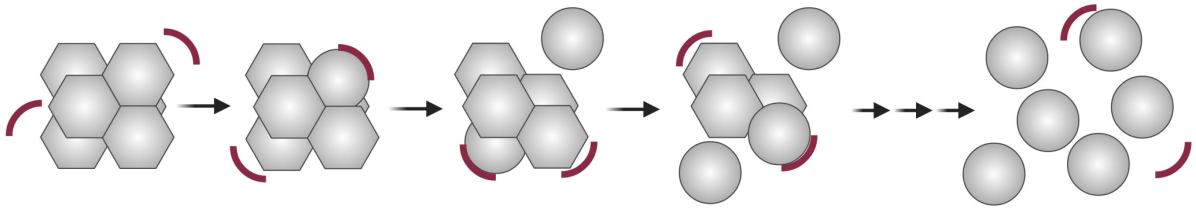


Abbildung 33 – Theoretische Wirkungsweise des Wirkstoffkandidaten RD2. Durch Anwesenheit von RD2 (Kreissegment) sollen Aβ-Aggregate (Sechsecke) destabilisiert und zurück in ihre native, intrinsisch ungeordneten monomere Konformation (Kreis) überführt werden. Aufgrund ihrer Affinität zu Aβ-Monomeren interagiert jedes RD2-Molekül mit einer der Untereinheit des Aβ-Oligomers und verschiebt dadurch deren Konformation in Richtung der intrinsisch ungeordneten Monomerkonformation, wodurch das Oligomer destabilisiert wird. Durch Anwesenheit weiterer RD2-Moleküle wird das Aβ-Oligomer zunehmend destabilisiert, bis es letztlich vollständig zu Aβ-Monomeren zerfällt. Vermutlich ist die Wirkung von RD2 in hohem Maße kooperativ, eindeutig substöchiometrisch (im Verhältnis zur Anzahl der Aβ-Monomer-Untereinheiten) und möglicherweise sogar katalytisch, da die RD2-Moleküle während der Oligomer-Destabilisierung nicht verbraucht werden. Modifizierte Darstellung nach Willbold & Kutzsche [132].

Im Rahmen der Studie aus Kapitel 4.8 wurde demonstriert, dass sFIDA erfolgreich für die Beurteilung beider präklinischen Parametern angewandt werden kann, da die Effektivität der Eliminierung von Aβ-Oligomeren durch RD2 als Signalverlust im sFIDA quantifiziert werden konnte. Zudem wurde gezeigt, dass Schwankungen zwischen den Replikaten einer Probe trotz der komplexen Probenmatrix von Hirnhomogenatproben gering waren. In der aufgeführten Studie wurde eine dosis- und inkubationszeitabhängige Reduktion von Aβ-Oligomeren in murinen als auch humanen Gehirnproben durch *ex-vivo* Behandlung mit R2D demonstriert. Zusätzlich wurde der kombinierte Einsatz von sFIDA und Dichtegradientenzentrifugation

verwendet, um die in den Hirnhomogenaten vorhandenen Aβ-Oligomeren anhand ihrer Größe zu fraktionieren und zu quantifizieren. Interessanterweise variierten die absoluten Oligomerkonzentrationen zwischen AD-Patienten und den verwendeten Mausmodellen, jedoch zeigte sich eine ähnliche Größenverteilung der quantifizierten Proteinaggregate. Sowohl in den murinen als auch in den humanen Proben war eine Mehrheit an Aβ-Aggregate mit einer kalibrierten Größe von 400 kDa in Fraktion 9 oder 10 zu finden (siehe Kapitel 4.8, Fig. 1 und Fig. 2). Bedauerlicherweise standen für die Studie nur eine limitierte Anzahl an humanen Gehirnproben zur Verfügung, sodass die Ergebnisse zu einem späteren Zeitpunkt mit einem größeren Probenumfang nochmals bestätigt werden sollten.

Des Weiteren wurde im Rahmen einer tierexperimentellen Studie aus Kapitel 4.9 demonstriert, dass die sFIDA-Technologie zusätzlich zu Target Engagement zudem für die Beurteilung der Wirkung von Placebo bzw. geringer sowie höherer RD2-Dosierung auf Aβ- und Tau-Oligomertiter über einen Zeitraum von drei Monaten eingesetzt werden kann. Obwohl zwischen beiden Analyten sowohl zu Beginn der Studie als auch zum Ende starke Korrelationen determiniert wurden, veränderten sich die Oligomertiter unterschiedlich. Hierbei wurden für Aβ-Oligomere in keiner der Behandlungsgruppen signifikante Unterschiede erfasst (siehe Kapitel 4.9, Fig. 5). Im Gegensatz dazu wurden bei unbehandelten Tieren oder Tieren, die nur eine geringe RD2-Dosis erhielten, ein signifikanter Anstieg an Tau-Oligomeren in caninen Liquorproben determiniert. Die Behandlung mit einer hohen RD2-Dosis resultierte hingegen in einer stagnierenden oder reduzierten Tau-Oligomerkonzentration, sodass eine Differenzierung zwischen beiden Behandlungsgruppen möglich war. Ob dieser Effekt auch über einen längeren Behandlungszeitraum oder einer noch höheren Dosierung bestätigt bzw. verstärkt werden kann, muss in weiteren Studien überprüft werden.

Beide Studien zeigten zwar keine vollständige diagnostische Genauigkeit, dennoch bestätigen sie die Anwendbarkeit der sFIDA-Technologie im Rahmen präklinischer Studien sowie in der späteren Medikamentenentwicklung beispielsweise um Probanden für klinische Studien zur selektieren oder um die Oligomertiter von Probanden während der Behandlung zu überwachen. Darüber hinaus ermöglicht die sFIDA-Technologie die Identifizierung von Patienten, die aufgrund erhöhter Oligomertiter potenziell von einer Behandlung mit RD2 profitieren, sodass sFIDA zukünftig auch als therapiebegleitendes Diagnostikum angewandt werden könnte.

6 Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein Verifizierungsplan für die Festphasenentwicklung der sFIDA-Technologie etabliert und mit dessen Hilfe eine Vielzahl an verschiedenen sFIDA-Assays entwickelt. Diese wurden anschließend in diversen Studien für verschiedene Indikationen und Matrices erfolgreich angewendet und anhand von biologischen Proben validiert. Theoretisch könnte aufgrund des biochemischen Prinzips und des digitalen Messwertes jede Art an Proteinaggregat mittels der sFIDA-Technologie im femtomolaren Konzentrationsbereich quantifiziert werden. Um dieses Potenzial auch für diagnostische Zwecke nutzen zu können, muss die sFIDA-Technologie zukünftig aus dem Forschungsbereich in den regulierten Bereich der IVDs transferiert werden, wofür verschiedene Hürden überwunden werden müssen.

Sowohl der etablierte Verifizierungsplan aus Kapitel 3 als auch die Entwicklung und Implementierung einer internen Qualitätskontrollprobe aus Kapitel 4.1 sind essenzielle Bestandteile des Qualitätsmanagementsystems für IVDs nach ISO:13485 und somit auch Teil des späteren Konformitätsbewertungsverfahrens analog der IVDR. Mittels des etablierten Verifizierungsplan können nun verschiedene Festphasenparameter innerhalb weniger Experimente eruiert und angepasst werden. Somit kann das Repertoire der sFIDA-Technologie zukünftig stetig erweitert und sowohl der klinische Nutzen als auch das Potenzial der Technologie im Rahmen der Medikamentenwicklung vorangetrieben werden. Beispiele für potenzielle zukünftige Biomarker könnten TDP-43- oder Superoxiddismutase 1-Aggregate zur Diagnose von amyotropher Lateralsklerose oder aggregiertes Insel-Amyloid-Polypeptid zur Diagnose von Typ II Diabetes sein.

Obwohl in einigen der aufgeführten Studien einzelne Kohorten nicht voneinander differenziert werden konnten, besitzt die sFIDA Technologie aufgrund der Einzelpartikelsensitivität, der hohen analytischen Spezifität für aggregierte Spezies und gleichzeitiger Unempfindlichkeit gegenüber Proteinmonomer selbst bei Verwendung komplexer Matrices wie Plasma (siehe Kapitel 4.3) oder Stuhl (siehe Kapitel 4.4 und Kapitel 4.5) ein hohes Potenzial für die Anwendung im Bereich der Diagnostik und Medikamentenentwicklung. Um den Übergang aus der Forschung in das regulierte Umfeld der IVD erfolgreich umzusetzen, müssen die entwickelten sFIDA-Assays hinsichtlich ihrer klinischen Leistung in weiteren Studien validiert werden, da eine ausführliche Bewertung aufgrund verschiedener Faktoren wie Anzahl an Proben, Probenvolumen oder Anzahl an Patienten pro Kohorte technisch limitiert waren. Dennoch dienten alle in Kapitel 4 aufgeführten Studien dem besseren Verständnis der zugrundeliegenden Pathologie verschiedener Proteinopathien, wobei insbesondere die Quantifizierung fäkaler Aβ-Aggregate als auch die Quantifizierung von DISC1-Aggregaten in Liquor als Neuheiten besonders hervorzuheben sind.

Darüber hinaus erwies sich die Komplexität der zu analysierenden Proteinaggregate im Kontext der jeweiligen Erkrankung auch in der vorliegenden Arbeit als herausfordernd. Da sich einzelne Proteinfehlfaltungserkrankungen in ihrer klinischen Ausprägung ähneln, resultiert eine rein symptombasierte Diagnosestelle häufig in einer fehlerhaften Differenzialdiagnose. Dies wurde ebenfalls in den Studien aus Kapitel 4.2 und Kapitel 4.3 demonstriert und unterstrich die Notwendigkeit einer Biomarker-basierten Diagnostik zur Verbesserung der Differenzierung verschiedener Proteinopathien bzw. verschiedener Krankheitsstadien. Wie in Kapitel 4.6 demonstriert, kann die diagnostische Trennschärfe jedoch auch aufgrund von komorbiden Krankheitsformen limitiert sein. So wurden beispielsweise erhöhte Konzentrationen an aggregiertem α-Synuclein in AD-Patienten oder erhöhte Konzentrationen an Tau-Aggregaten in Patienten mit Demenz mit Lewy-Körperchen determiniert. Zum jetzigen Stand kann die alleinige Quantifizierung der Proteinaggregate mittels sFIDA zwar die Zuordnung zu einer bestimmten Proteinopathie ermöglichen, jedoch gewährleistet erst die Kombination mit weiteren Biomarkern wie beispielsweise Amyloid- oder Tau-Pathologie sowie ApoE-ε4-Status eine Steigerung der klinischen Leistung.

Wie in den Studien aus Kapitel 4.2, Kapitel 4.3 und Kapitel 4.5 ausführlich beschrieben, scheinen die Konzentrationen an Proteinaggregaten insbesondere in frühen Krankheitsstadien erhöht zu sein, wodurch zukünftige Analysen longitudinaler Proben obligatorisch werden. Bestenfalls werden hierfür Proteinaggregate in unterschiedlichen Probenmatrices wie Liquor, Plasma und Stuhl mittels der entwickelten sFIDA-Assays aus Kapitel 4 quantifiziert, um das Verständnis über die Herkunft und Transition der Proteinaggregate im gesamten Körper zu verbessern. Daher sollte insbesondere die Entwicklung weiterer Assays zur Quantifizierung nicht invasiver bzw. weniger invasiver Biomarker wie Proteinaggregate in Urin, Speichel, Nasensekret oder Tränenflüssigkeit weiterverfolgt werden. Durch die geringe oder nicht vorhandene Invasivität der Probenentnahme werden nicht nur Risiken bzw. Unannehmlichkeiten für den Patienten reduziert, sondern auch die Medikamentenentwicklung vorangetrieben sowie regulatorischen Hürden für die spätere Zulassung als IVD gesenkt.

Eine weitere wichtige Optimierung der sFIDA-Technologie wäre die Implementierung einer größenbasierten Differenzierung der Proteinaggregate, da diese bezüglich ihrer Form, Struktur, ihrem Molekulargewicht sowie ihrem dynamischen Verhalten stark heterogen sind. Insbesondere in der präklinischen Phase der Medikamentenentwicklung wäre dies besonders für die Beurteilung des Wirkungsmechanismus sowie Target Engagement von großer Bedeutung, da sich manche Medikamente nur gegen bestimmte Aggregatspezies wie niedermolekulare Oligomere oder hochmolekulare amyloide Fibrillen richten. Derzeit werden mittels sFIDA alle Arten an Aggregaten einschließlich kleiner Oligomere als auch größere, noch lösliche Ansammlungen wie Protofibrillen oder Seeding-fähige Oligomere und Fibrillen erkannt. Zum einen können Proteinaggregate aus einem Gemisch mittels präanalytischer

Methoden beispielsweise durch den kombinierten Einsatz von Dichtegradientenzentrifugation und sFIDA anhand ihrer Größe fraktioniert und im Anschluss quantifiziert werden. Zum anderen wäre eine Analyse der Partikelgrößenverteilung von Aggregaten mit einer Größe von mehr als 200 nm auch auf Basis der Bilddaten möglich. Theoretisch sollten größere Aggregate aufgrund der höheren Anzahl an Epitopen von mehr Detektionsantikörper markiert und somit im sFIDA durch eine höhere Anzahl an ausgeleuchteten Pixeln abgebildet werden. Da sowohl die Anzahl an Partikeln sowie deren Intensität quantifiziert werden, kann im Anschluss die durchschnittliche Größe in Pixeln pro Partikel determiniert werden und eine Größenverteilung erstellt werden. Diese Partikelanalyse insbesondere im Bereich von Aggregaten mit einer Größe kleiner der Auflösungsgrenze, wäre eine Erweiterung der bisher angedachten Zweckbestimmung, wodurch sie sich die sFIDA-Technologie weiter von anderen Oligomer-basierte Diagnostika abheben und sich somit ein Alleinstellungsmerkmal als IVD sichern könnte.

Literaturverzeichnis

[1] Linnemann, M., et al., *Biochemie für Mediziner: ein Lern- und Arbeitsbuch mit klinischem Bezug ; mit 186 Tabellen*. 2004: Springer Berlin Heidelberg.

[2] Jucker, M. and L.C. Walker, *Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases.* Nature, 2013. **501**(7465): p. 45-51.

[3] Löffler, G. and P.E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*. 2019: Springer Berlin Heidelberg.

[4] Dobson, C.M., A. Šali, and M. Karplus, *Protein Folding: A Perspective from Theory and Experiment.* Angew Chem Int Ed Engl, 1998. **37**(7): p. 868-893.

[5] Jahn, T.R. and S.E. Radford, *The Yin and Yang of protein folding.* Febs j, 2005. **272**(23): p. 5962-70.

[6] Martinelli, A.H.S., et al., *Modulation of Disordered Proteins with a Focus on Neurodegenerative Diseases and Other Pathologies.* Int J Mol Sci, 2019. **20**(6).

[7] Uversky, V.N. and A.V. Finkelstein, *Life in Phases: Intra- and Inter- Molecular Phase Transitions in Protein Solutions.* Biomolecules, 2019. **9**(12).

[8] Jahn, T.R. and S.E. Radford, *Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways.* Arch Biochem Biophys, 2008. **469**(1): p. 100-17.

[9] Pham, N.B. and W.S. Meng, *Protein aggregation and immunogenicity of biotherapeutics.* Int J Pharm, 2020. **585**: p. 119523.

[10] Sweeney, P., et al., *Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies.* Transl Neurodegener, 2017. **6**: p. 6.

[11] Lotz, G.P. and J. Legleiter, *The role of amyloidogenic protein oligomerization in neurodegenerative disease.* J Mol Med (Berl), 2013. **91**(6): p. 653-64.

[12] Jin, Y., et al., *The Diagnostic Potential of Amyloidogenic Proteins.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(8).

[13] Chiti, F. and C.M. Dobson, *Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade.* Annu Rev Biochem, 2017. **86**: p. 27-68.

[14] Ross, C.A. and M.A. Poirier, *Protein aggregation and neurodegenerative disease.* Nat Med, 2004. **10 Suppl**: p. S10-7.

[15] Eisele, Y.S., et al., *Targeting protein aggregation for the treatment of degenerative diseases.* Nat Rev Drug Discov, 2015. **14**(11): p. 759-80.

[16] Jahn, T.R., et al., *The Common Architecture of Cross-β Amyloid.* Journal of Molecular Biology, 2010. **395**(4): p. 717-727.

[17] Soto, C. and S. Pritzkow, *Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases.* Nat Neurosci, 2018. **21**(10): p. 1332-1340.

[18] Willbold, D., et al., *Amyloid-type Protein Aggregation and Prion-like Properties of Amyloids.* Chemical Reviews, 2021. **121**(13): p. 8285-8307.

[19] Rahman, M.A., et al., *Autophagy Modulation in Aggresome Formation: Emerging Implications and Treatments of Alzheimer's Disease.* Biomedicines, 2022. **10**(5).

[20] Kulenkampff, K., et al., *Quantifying misfolded protein oligomers as drug targets and biomarkers in Alzheimer and Parkinson diseases.* Nature Reviews Chemistry, 2021. **5**(4): p. 277-294.

[21] Eisele, Y.S., *From Soluble Aβ to Progressive Aβ Aggregation: Could Prion-Like Templated Misfolding Play a Role?* Brain Pathology, 2013. **23**(3): p. 333-341.

[22] Prusiner, S.B., *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie.* Science, 1982. **216**(4542): p. 136-44.

[23] Winklhofer, K.F., J. Tatzelt, and C. Haass, *The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases.* Embo j, 2008. **27**(2): p. 336-49.

[24] Törnquist, M., et al., *Secondary nucleation in amyloid formation.* Chemical Communications, 2018. **54**(63): p. 8667-8684.

[25] Höhn, A., A. Tramutola, and R. Cascella, *Proteostasis Failure in Neurodegenerative Diseases: Focus on Oxidative Stress.* Oxid Med Cell Longev, 2020. **2020**: p. 5497046.

[26] Brettschneider, J., et al., *Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies.* Nature Reviews Neuroscience, 2015. **16**(2): p. 109-120.

[27] Soto, C., *Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy.* FEBS Lett, 2001. **498**(2-3): p. 204-7.

[28] Lim, Y.-J. and S.-J. Lee, *Are exosomes the vehicle for protein aggregate propagation in neurodegenerative diseases?* Acta Neuropathologica Communications, 2017. **5**(1): p. 64.

[29] Bondarev, S.A., et al., *Protein Co-Aggregation Related to Amyloids: Methods of Investigation, Diversity, and Classification.* Int J Mol Sci, 2018. **19**(8).

[30] Johnston, J.A., C.L. Ward, and R.R. Kopito, *Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins.* J Cell Biol, 1998. **143**(7): p. 1883-98.

[31] Hipp, M.S., P. Kasturi, and F.U. Hartl, *The proteostasis network and its decline in ageing.* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019. **20**(7): p. 421-435.

[32] Hommen, F., S. Bilican, and D. Vilchez, *Protein clearance strategies for disease intervention.* J Neural Transm (Vienna), 2022. **129**(2): p. 141-172.

[33] Dobson, C.M., *Principles of protein folding, misfolding and aggregation.* Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(1): p. 3-16.

[34] Sherman, M.Y. and A.L. Goldberg, *Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases.* Neuron, 2001. **29**(1): p. 15-32.

[35] Nassar, R., et al., *The Protein Folding Problem: The Role of Theory.* J Mol Biol, 2021. **433**(20): p. 167126.

[36] Boronat, S., M. Cabrera, and E. Hidalgo, *Spatial sequestration of misfolded proteins as an active chaperone-mediated process during heat stress.* Curr Genet, 2021. **67**(2): p. 237-243.

[37] Deleidi, M. and W. Maetzler, *Protein clearance mechanisms of alpha-synuclein and amyloid-Beta in lewy body disorders.* Int J Alzheimers Dis, 2012. **2012**: p. 391438.

[38] Yoon, S.S. and S.A. Jo, *Mechanisms of Amyloid-β Peptide Clearance: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease.* Biomol Ther (Seoul), 2012. **20**(3): p. 245-55.

[39] Cheng, Y., D.-Y. Tian, and Y.-J. Wang, *Peripheral clearance of brain-derived Aβ in Alzheimer's disease: pathophysiology and therapeutic perspectives.* Translational Neurodegeneration, 2020. **9**(1): p. 16.

[40] Wang, J., et al., *A systemic view of Alzheimer disease - insights from amyloid-β metabolism beyond the brain.* Nat Rev Neurol, 2017. **13**(10): p. 612-623.

[41] Morimoto, R.I., *The heat shock response: systems biology of proteotoxic stress in aging and disease.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2011. **76**: p. 91-9.

[42] Hartl, F.U., *Protein Misfolding Diseases.* Annu Rev Biochem, 2017. **86**: p. 21-26.

[43] Bradshaw, N.J. and C. Korth, *Protein misassembly and aggregation as potential convergence points for non-genetic causes of chronic mental illness.* Mol Psychiatry, 2019. **24**(7): p. 936-951.

[44] Denny, R.A., L.K. Gavrin, and E. Saiah, *Recent developments in targeting protein misfolding diseases.* Bioorg Med Chem Lett, 2013. **23**(7): p. 1935-44.

[45] Gámez, A., et al., *Protein misfolding diseases: Prospects of pharmacological treatment.* Clin Genet, 2018. **93**(3): p. 450-458.

[46] Dugger, B.N. and D.W. Dickson, *Pathology of Neurodegenerative Diseases.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017. **9**(7).

[47] Zhu, S., et al., *Transfer of disrupted-in-schizophrenia 1 aggregates between neuronal-like cells occurs in tunnelling nanotubes and is promoted by dopamine.* Open Biol, 2017. **7**(3).

[48] Tanaka, M., et al., *Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences.* Nature, 2004. **428**(6980): p. 323-8.

[49] Otzen, D. and R. Riek, *Functional Amyloids.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019. **11**(12).

[50] Dogan, A., *Amyloidosis: Insights from Proteomics.* Annu Rev Pathol, 2017. **12**: p. 277-304.

[51] Chen, G.F., et al., *Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development.* Acta Pharmacol Sin, 2017. **38**(9): p. 1205-1235.

[52] Zhang, Y.-w., et al., *APP processing in Alzheimer's disease.* Molecular Brain, 2011. **4**(1): p. 3.

[53] Hampel, H., et al., *The Amyloid-β Pathway in Alzheimer's Disease.* Mol Psychiatry, 2021. **26**(10): p. 5481-5503.

[54] Long, J.M. and D.M. Holtzman, *Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies.* Cell, 2019. **179**(2): p. 312-339.

[55] Kulawik, A., et al., *Advancements of the sFIDA method for oligomer-based diagnostics of neurodegenerative diseases.* FEBS Letters, 2018. **592**(4): p. 516-534.

[56] Soscia, S.J., et al., *The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide.* PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9505.

[57] d'Abramo, C., L. D'Adamio, and L. Giliberto, *Significance of Blood and Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease: Sensitivity, Specificity and Potential for Clinical Use.* J Pers Med, 2020. **10**(3).

[58] Spitzer, P., et al., *Amyloidogenic amyloid-β-peptide variants induce microbial agglutination and exert antimicrobial activity.* Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 32228.

[59] Megur, A., et al., *The Microbiota-Gut-Brain Axis and Alzheimer's Disease: Neuroinflammation Is to Blame?* Nutrients, 2020. **13**(1).

[60] Shea, D. and V. Daggett, *Amyloid-β Oligomers: Multiple Moving Targets.* Biophysica, 2022. **2**(2): p. 91-110.

[61] Cline, E.N., et al., *The Amyloid-β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade.* J Alzheimers Dis, 2018. **64**(s1): p. S567-s610.

[62] Förstl, H., M. Hautzinger, and G. Roth, *Neurobiologie psychischer Störungen*. 2006: Springer Berlin Heidelberg.

[63] Kanekiyo, T., H. Xu, and G. Bu, *ApoE and Aβ in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners?* Neuron, 2014. **81**(4): p. 740-54.

[64] Husain, M.A., B. Laurent, and M. Plourde, *APOE and Alzheimer's Disease: From Lipid Transport to Physiopathology and Therapeutics.* Frontiers in Neuroscience, 2021. **15**.

[65] Goedert, M., *NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled Aβ, tau, and α-synuclein.* Science, 2015. **349**(6248): p. 1255555.

[66] Braak, H. and E. Braak, *Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes.* Acta Neuropathol, 1991. **82**(4): p. 239-59.

[67] Jack, C.R., Jr., et al., *NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease.* Alzheimers Dement, 2018. **14**(4): p. 535-562.

[68] Jessen, F., et al., *The characterisation of subjective cognitive decline.* Lancet Neurol, 2020. **19**(3): p. 271-278.

[69] *2023 Alzheimer's disease facts and figures.* Alzheimers Dement, 2023. **19**(4): p. 1598-1695.

[70] Zhang, Y., et al., *Tauopathies: new perspectives and challenges.* Mol Neurodegener, 2022. **17**(1): p. 28.

[71] Kovacs, G.G., *Chapter 25 - Tauopathies*, in *Handbook of Clinical Neurology*, G.G. Kovacs and I. Alafuzoff, Editors. 2018, Elsevier. p. 355-368.

[72] Siano, G., et al., *Non-Canonical Roles of Tau and Their Contribution to Synaptic Dysfunction.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(18).

[73] Chung, D.-e.C., et al., *Cellular and pathological heterogeneity of primary tauopathies.* Molecular Neurodegeneration, 2021. **16**(1): p. 57.

[74] Guo, T., W. Noble, and D.P. Hanger, *Roles of tau protein in health and disease.* Acta Neuropathol, 2017. **133**(5): p. 665-704.

[75] Arendt, T., J.T. Stieler, and M. Holzer, *Tau and tauopathies.* Brain Res Bull, 2016. **126**(Pt 3): p. 238-292.

[76] Zhang, T., L. Nagel-Steger, and D. Willbold, *Solution-Based Determination of Dissociation Constants for the Binding of Aβ42 to Antibodies.* ChemistryOpen, 2019. **8**(7): p. 989-994.

[77] Barbier, P., et al., *Role of Tau as a Microtubule-Associated Protein: Structural and Functional Aspects.* Front Aging Neurosci, 2019. **11**: p. 204.

[78] Hernández, F., et al., *Tau Aggregation.* Neuroscience, 2022.

[79] Reid, M.J., et al., *Astrocytes in Tauopathies.* Front Neurol, 2020. **11**: p. 572850.

[80] Jie, C., et al., *Tauvid™: The First FDA-Approved PET Tracer for Imaging Tau Pathology in Alzheimer's Disease.* Pharmaceuticals (Basel), 2021. **14**(2).

[81] Meraz-Ríos, M.A., et al., *Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease.* J Neurochem, 2010. **112**(6): p. 1353-67.

[82] Orr, M.E., A.C. Sullivan, and B. Frost, *A Brief Overview of Tauopathy: Causes, Consequences, and Therapeutic Strategies.* Trends Pharmacol Sci, 2017. **38**(7): p. 637-648.

[83] Josephs, K.A., *Chapter 53 - Tauopathies: Classification, Clinical Features, and Genetics*, in *Movement Disorders (Second Edition)*, M.S. LeDoux, Editor. 2015, Academic Press: Boston. p. 815-828.

[84] Zhang, X., et al., *Tau Pathology in Parkinson's Disease.* Frontiers in Neurology, 2018. **9**.

[85] Pan, L., et al., *Tau in the Pathophysiology of Parkinson's Disease.* J Mol Neurosci, 2021. **71**(11): p. 2179-2191.

[86] Uversky, V.N., *Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation.* J Neurochem, 2007. **103**(1): p. 17-37.

[87] Marques, O. and T.F. Outeiro, *Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death.* Cell Death Dis, 2012. **3**(7): p. e350.

[88] Emamzadeh, F.N., *Alpha-synuclein structure, functions, and interactions.* J Res Med Sci, 2016. **21**: p. 29.

[89] Ma, L.Y., et al., *Alpha-Synuclein in Peripheral Tissues in Parkinson's Disease.* ACS Chem Neurosci, 2019. **10**(2): p. 812-823.

[90] Moussaud, S., et al., *Alpha-synuclein and tau: teammates in neurodegeneration?* Mol Neurodegener, 2014. **9**: p. 43.

[91] Fan, T.S., S.C. Liu, and R.M. Wu, *Alpha-Synuclein and Cognitive Decline in Parkinson Disease.* Life (Basel), 2021. **11**(11).

[92] Gómez-Benito, M., et al., *Modeling Parkinson's Disease With the Alpha-Synuclein Protein.* Frontiers in Pharmacology, 2020. **11**.

[93] Poewe, W., et al., *Parkinson disease.* Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17013.

[94] Ingelsson, M., *Alpha-Synuclein Oligomers—Neurotoxic Molecules in Parkinson's Disease and Other Lewy Body Disorders.* Frontiers in Neuroscience, 2016. **10**.

[95] Bengoa-Vergniory, N., et al., *Alpha-synuclein oligomers: a new hope.* Acta Neuropathol, 2017. **134**(6): p. 819-838.

[96] Hijaz, B.A. and L.A. Volpicelli-Daley, *Initiation and propagation of α-synuclein aggregation in the nervous system.* Mol Neurodegener, 2020. **15**(1): p. 19.

[97] Malfertheiner, K., N. Stefanova, and A. Heras-Garvin, *The Concept of α-Synuclein Strains and How Different Conformations May Explain Distinct Neurodegenerative Disorders.* Frontiers in Neurology, 2021. **12**.

[98] Mahul-Mellier, A.L., et al., *The process of Lewy body formation, rather than simply α-synuclein fibrillization, is one of the major drivers of neurodegeneration.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(9): p. 4971-4982.

[99] Kovacs, G.G., *Molecular pathology of neurodegenerative diseases: principles and practice.* J Clin Pathol, 2019. **72**(11): p. 725-735.

[100] Coon, E.A. and W. Singer, *Synucleinopathies.* Continuum (Minneap Minn), 2020. **26**(1): p. 72-92.

[101] Korth, C., *DISCopathies: Brain Disorders Related to DISC1 Dysfunction.* Reviews in the Neurosciences, 2009. **20**(5-6): p. 321-330.

[102] Cukkemane, A., et al., *Conformational heterogeneity coupled with β-fibril formation of a scaffold protein involved in chronic mental illnesses.* Transl Psychiatry, 2021. **11**(1): p. 639.

[103] Leliveld, S.R., et al., *Insolubility of disrupted-in-schizophrenia 1 disrupts oligomer-dependent interactions with nuclear distribution element 1 and is associated with sporadic mental disease.* J Neurosci, 2008. **28**(15): p. 3839-45.

[104] Millar, J.K., et al., *Genomic structure and localisation within a linkage hotspot of Disrupted In Schizophrenia 1, a gene disrupted by a translocation segregating with schizophrenia.* Mol Psychiatry, 2001. **6**(2): p. 173-8.

[105] Soares, D.C., et al., *DISC1: Structure, Function, and Therapeutic Potential for Major Mental Illness.* ACS Chem Neurosci, 2011. **2**(11): p. 609-632.

[106] Tomoda, T., T. Hikida, and T. Sakurai, *Role of DISC1 in Neuronal Trafficking and its Implication in Neuropsychiatric Manifestation and Neurotherapeutics.* Neurotherapeutics, 2017. **14**(3): p. 623-629.

[107] Ottis, P., et al., *Convergence of two independent mental disease genes on the protein level: recruitment of dysbindin to cell-invasive disrupted-in-schizophrenia 1 aggresomes.* Biol Psychiatry, 2011. **70**(7): p. 604-10.

[108] Taylor, M.S., et al., *Evolutionary constraints on the Disrupted in Schizophrenia locus.* Genomics, 2003. **81**(1): p. 67-77.

[109] Yerabham, A.S.K., et al., *A structural organization for the Disrupted in Schizophrenia 1 protein, identified by high-throughput screening, reveals distinctly folded regions, which are bisected by mental illness-related mutations.* J Biol Chem, 2017. **292**(16): p. 6468-6477.

[110] Brandon, N.J., et al., *Understanding the role of DISC1 in psychiatric disease and during normal development.* J Neurosci, 2009. **29**(41): p. 12768-75.

[111] Narayanan, S., et al., *Molecular characterization of disrupted in schizophrenia-1 risk variant S704C reveals the formation of altered oligomeric assembly.* J Biol Chem, 2011. **286**(51): p. 44266-44276.

[112] Ochneva, A., et al., *Protein Misfolding and Aggregation in the Brain: Common Pathogenetic Pathways in Neurodegenerative and Mental Disorders.* Int J Mol Sci, 2022. **23**(22).

[113] Korth, C., *Aggregated proteins in schizophrenia and other chronic mental diseases: DISC1opathies.* Prion, 2012. **6**(2): p. 134-41.

[114] Trossbach, S.V., et al., *Misassembly of full-length Disrupted-in-Schizophrenia 1 protein is linked to altered dopamine homeostasis and behavioral deficits.* Mol Psychiatry, 2016. **21**(11): p. 1561-1572.

[115] Leliveld, S.R., et al., *Oligomer assembly of the C-terminal DISC1 domain (640-854) is controlled by self-association motifs and disease-associated polymorphism S704C.* Biochemistry, 2009. **48**(32): p. 7746-55.

[116] Bader, V., et al., *Generation, purification, and characterization of cell-invasive DISC1 protein species.* J Vis Exp, 2012(66): p. e4132.

[117] Atkin, T.A., N.J. Brandon, and J.T. Kittler, *Disrupted in Schizophrenia 1 forms pathological aggresomes that disrupt its function in intracellular transport.* Hum Mol Genet, 2012. **21**(9): p. 2017-28.

[118] Tölle, R. and K. Windgassen, *Psychiatrie: einschließlich Psychotherapie*. 2009: Springer Berlin Heidelberg.

[119] Korth, C. and H. Fangerau, *Blood tests to diagnose schizophrenia: self-imposed limits in psychiatry.* Lancet Psychiatry, 2020. **7**(10): p. 911-914.

[120] Remschmidt, H. and F. Theisen, *Schizophrenie*. 2011: Springer Berlin Heidelberg.

[121] Trossbach, S.V., et al., *Dysregulation of a specific immune-related network of genes biologically defines a subset of schizophrenia.* Transl Psychiatry, 2019. **9**(1): p. 156.

[122] Park, J.M., et al., *CHAPTER 64 - Chronic Mental Illness*, in *Massachusetts General Hospital Comprehensive Clinical Psychiatry*, T.A. Stern, et al., Editors. 2008, Mosby: Philadelphia. p. 887-893.

[123] Sengupta, U. and R. Kayed, *Amyloid β, Tau, and α-Synuclein aggregates in the pathogenesis, prognosis, and therapeutics for neurodegenerative diseases.* Progress in Neurobiology, 2022. **214**: p. 102270.

[124] Robinson, J.L., et al., *Neurodegenerative disease concomitant proteinopathies are prevalent, age-related and APOE4-associated.* Brain, 2018. **141**(7): p. 2181-2193.

[125] Ribe, A.R., et al., *Long-term Risk of Dementia in Persons With Schizophrenia: A Danish Population-Based Cohort Study.* JAMA Psychiatry, 2015. **72**(11): p. 1095-101.

[126] Uversky, V.N., *Looking at the recent advances in understanding α-synuclein and its aggregation through the proteoform prism.* F1000Res, 2017. **6**: p. 525.

[127] Arvanitakis, Z., R.C. Shah, and D.A. Bennett, *Diagnosis and Management of Dementia: Review.* Jama, 2019. **322**(16): p. 1589-1599.

[128] Cummings, J., et al., *Alzheimer's disease drug development pipeline: 2022.* Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions, 2022. **8**(1): p. e12295.

[129] McFarthing, K., et al., *Parkinson's Disease Drug Therapies in the Clinical Trial Pipeline: 2022 Update.* J Parkinsons Dis, 2022. **12**(4): p. 1073-1082.

[130] Eisenberg, D. and M. Jucker, *The amyloid state of proteins in human diseases.* Cell, 2012. **148**(6): p. 1188-203.

[131] Nevone, A., G. Merlini, and M. Nuvolone, *Treating Protein Misfolding Diseases: Therapeutic Successes Against Systemic Amyloidoses.* Front Pharmacol, 2020. **11**: p. 1024.

[132] Willbold, D. and J. Kutzsche, *Do We Need Anti-Prion Compounds to Treat Alzheimer's Disease?* Molecules, 2019. **24**(12): p. 2237.

[133] Chaturvedi, S.K., et al., *Protein misfolding and aggregation: Mechanism, factors and detection.* Process Biochemistry, 2016. **51**(9): p. 1183-1192.

[134] Cohen, F.E. and J.W. Kelly, *Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases.* Nature, 2003. **426**(6968): p. 905-9.

[135] Folstein, M.F., S.E. Folstein, and P.R. McHugh, *"Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician.* J Psychiatr Res, 1975. **12**(3): p. 189-98.

[136] Kalbe, E., et al., *DemTect: a new, sensitive cognitive screening test to support the diagnosis of mild cognitive impairment and early dementia.* Int J Geriatr Psychiatry, 2004. **19**(2): p. 136-43.

[137] Nasreddine, Z.S., et al., *The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment.* J Am Geriatr Soc, 2005. **53**(4): p. 695-9.

[138] Kalyoncu, A. and A.S. Gonul, *The Emerging Role of SPECT Functional Neuroimaging in Schizophrenia and Depression.* Front Psychiatry, 2021. **12**: p. 716600.

[139] Bidesi, N.S.R., et al., *The role of neuroimaging in Parkinson's disease.* J Neurochem, 2021. **159**(4): p. 660-689.

[140] Akdemir, Ü., A. Bora Tokçaer, and L. Atay, *Dopamine transporter SPECT imaging in Parkinson's disease and parkinsonian disorders.* Turk J Med Sci, 2021. **51**(2): p. 400-410.

[141] Paraskevaidi, M., et al., *Diagnostic Biomarkers for Alzheimer's Disease Using Non-Invasive Specimens.* J Clin Med, 2020. **9**(6).

[142] Teunissen, C.E., et al., *Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease: towards clinical implementation.* Lancet Neurol, 2022. **21**(1): p. 66-77.

[143] Hülsemann, M., et al., *Biofunctionalized Silica Nanoparticles: Standards in Amyloid-β Oligomer-Based Diagnosis of Alzheimer's Disease.* J Alzheimers Dis, 2016. **54**(1): p. 79-88.

[144] Hölttä, M., et al., *Evaluating amyloid-β oligomers in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease.* PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66381.

[145] Kasai, T., et al., *Utilization of a multiple antigenic peptide as a calibration standard in the BAN50 single antibody sandwich ELISA for Aβ oligomers.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012. **422**(3): p. 375-380.

[146] Yang, T., et al., *New ELISAs with high specificity for soluble oligomers of amyloid β-protein detect natural Aβ oligomers in human brain but not CSF.* Alzheimer's & Dementia, 2013. **9**(2): p. 99-112.

[147] Yang, T., et al., *A highly sensitive novel immunoassay specifically detects low levels of soluble Aβ oligomers in human cerebrospinal fluid.* Alzheimers Res Ther, 2015. **7**(1): p. 14.

[148] Savage, M.J., et al., *A sensitive aβ oligomer assay discriminates Alzheimer's and aged control cerebrospinal fluid.* J Neurosci, 2014. **34**(8): p. 2884-97.

[149] Kulawik, A., et al., *Advancements of the sFIDA method for oligomer-based diagnostics of neurodegenerative diseases.* FEBS Lett, 2018. **592**(4): p. 516-534.

[150] Birkmann, E., et al., *Counting of single prion particles bound to a capture-antibody surface (surface-FIDA).* Veterinary Microbiology, 2007. **123**(4): p. 294-304.

[151] Birkmann, E., et al., *Detection of prion particles in samples of BSE and scrapie by fluorescence correlation spectroscopy without proteinase K digestion.* Biol Chem, 2006. **387**(1): p. 95-102.

[152] Birkmann, E., et al., *A highly sensitive diagnostic assay for aggregate-related diseases, including prion diseases and Alzheimer's disease.* Rejuvenation Res, 2008. **11**(2): p. 359-63.

[153] Wang-Dietrich, L., et al., *The amyloid-β oligomer count in cerebrospinal fluid is a biomarker for Alzheimer's disease.* J Alzheimers Dis, 2013. **34**(4): p. 985-94.

[154] Funke, S.A., et al., *Single-particle detection system for Abeta aggregates: adaptation of surface-fluorescence intensity distribution analysis to laser scanning microscopy.* Rejuvenation Res, 2010. **13**(2-3): p. 206-9.

[155] Funke, S.A., et al., *An ultrasensitive assay for diagnosis of Alzheimer's disease.* Rejuvenation Res, 2008. **11**(2): p. 315-8.

[156] Funke, S.A., et al., *Single particle detection of Abeta aggregates associated with Alzheimer's disease.* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **364**(4): p. 902-7.

[157] Kühbach, K., et al., *Application of an Amyloid Beta Oligomer Standard in the sFIDA Assay.* Frontiers in Neuroscience, 2016. **10**.

[158] Herrmann, Y., et al., *sFIDA automation yields sub-femtomolar limit of detection for Aβ aggregates in body fluids.* Clin Biochem, 2017. **50**(4-5): p. 244-247.

[159] Herrmann, Y., et al., *Nanoparticle standards for immuno-based quantitation of α-synuclein oligomers in diagnostics of Parkinson's disease and other synucleinopathies.* Clin Chim Acta, 2017. **466**: p. 152-159.

[160] Kravchenko, K., et al., *Analysis of anticoagulants for blood-based quantitation of amyloid β oligomers in the sFIDA assay.* Biol Chem, 2017. **398**(4): p. 465-475.

[161] Schemmert, S., et al., *Aβ Oligomer Elimination Restores Cognition in Transgenic Alzheimer's Mice with Full-blown Pathology*. Mol Neurobiol, 2019. **56**(3): p. 2211-2223.

[162] Wild, D. and C. Sheehan, *Chapter 3.5 - Standardization and Calibration*, in *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*, D. Wild, Editor. 2013, Elsevier: Oxford. p. 315-322.

[163] Fish, K.N., *Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy.* Curr Protoc, 2022. **2**(8): p. e517.

[164] Kudalkar, E.M., T.N. Davis, and C.L. Asbury, *Single-Molecule Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy.* Cold Spring Harb Protoc, 2016. **2016**(5): p. pdb.top077800.

[165] Mulisch, M. and U. Welsch, *Romeis - Mikroskopische Technik*. 2010: Spektrum Akademischer Verlag.

[166] Verveer, P.J., *Advanced Fluorescence Microscopy: Methods and Protocols*. 2014: Springer New York.

[167] *Verordnung (EU) 2017/746 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 5. April 2017 über In-vitro-Diagnostika und zur Aufhebung der Richtlinie 98/79/EG und des Beschlusses 2010/227/EU der Kommission*. 2017.

[168] *Verordnung (EU) 2017/745 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 5. April 2017 über Medizinprodukte, zur Änderung der Richtlinie 2001/83/EG, der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 und der Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 und zur Aufhebung der Richtlinien 90/385/EWG und 93/42/EWG des Rates*. 2017.

[169] *Gesetz zur Durchführung unionsrechtlicher Vorschriften betreffend Medizinprodukte (Medizinprodukterecht-Durchführungsgesetz - MPDG) vom 28.04.2020*. 2020.

[170] *International Organization for Standardization: DIN EN ISO 13485:2016: Medizinprodukte – Qualitätsmanagementsysteme – Anforderungen für regulatorische Zwecke, Deutsche Fassung EN ISO 13485:2016 + AC:2018 + A11:2021*. 2021.

[171] *International Organization for Standardization: DIN EN ISO 14971:2022-04: Medizinprodukte - Anwendung des Risikomanagements auf Medizinprodukte (ISO 14971:2019), Deutsche Fassung EN ISO 14971:2019 + A11:2021*. 2022.

[172] TÜV Süd. *Konformitätsbewertungsverfahren nach IVDR*.

[173] Johner Institut. *Klassifizierung von In-vitro-Diagnostika: Wie Sie eine zu hohe Einstufung vermeiden*.

[174] He, J., *Chapter 5.1 - Practical Guide to ELISA Development*, in *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*, D. Wild, Editor. 2013, Elsevier: Oxford. p. 381-393.

[175] Minic, R. and I. Zivkovic, *Optimization, Validation and Standardization of ELISA*. 2020.

[176] Crowther, J.R., *The ELISA Guidebook*. 2009: Humana Press.

[177] Kim, D. and A.E. Herr, *Protein immobilization techniques for microfluidic assays.* Biomicrofluidics, 2013. **7**(4): p. 041501.

[178] Andreasson, U., et al., *A Practical Guide to Immunoassay Method Validation.* Front Neurol, 2015. **6**: p. 179.

[179] Wild, D. and J. He, *Chapter 6.5 - Immunoassay Troubleshooting Guide*, in *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*, D. Wild, Editor. 2013, Elsevier: Oxford. p. 469-506.

[180] Wilde, C., et al., *Chapter 6.1 - Sample Collection, Including Participant Preparation and Sample Handling*, in *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*, D. Wild, Editor. 2013, Elsevier: Oxford. p. 427-440.

[181] Raem, A. and P. Rauch, *Immunoassays*. 2006: Spektrum Akademischer Verlag.

[182] Davies, C., *Chapter 9.1 - Clinical Concepts11This chapter is extracted from the first edition of The Immunoassay Handbook, with few changes, because of the high regard in which Chris Davies' original -material is held*, in *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*, D. Wild, Editor. 2013, Elsevier: Oxford. p. 661-672.

[183] Food and Drug Administration. *M10 Bioanalytical method validation and study sample analysis - Guidance for industry*.

[184] European Medicines Agency. *Guideline on bioanalytical method validation*.

[185] Clinical and Laboratory Institute of Standards. *Method Evaluation*.

[186] Gering, J.P., L. Quaroni, and G. Chumanov, *Immobilization of antibodies on glass surfaces through sugar residues.* J Colloid Interface Sci, 2002. **252**(1): p. 50-6.

[187] SeraCare Life Science. *Technical Guide for ELISA: Protocols, Troubleshooting*.

[188] Welch, N.G., et al., *Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review).* Biointerphases, 2017. **12**(2): p. 02d301.

[189] Gao, S., J.M. Guisán, and J. Rocha-Martin, *Oriented immobilization of antibodies onto sensing platforms - A critical review.* Anal Chim Acta, 2022. **1189**: p. 338907.

[190] Shen, M., J. Rusling, and C.K. Dixit, *Site-selective orientated immobilization of antibodies and conjugates for immunodiagnostics development.* Methods, 2017. **116**: p. 95-111.

[191] Thermo Fisher Scientific. *Thermo Scientific Pierce Assay Development Technical Handbook, Version 2*.

[192] Liddell, E., *Chapter 3.1 - Antibodies*, in *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*, D. Wild, Editor. 2013, Elsevier: Oxford. p. 245-265.

[193] R&D Systems. *ELISA Development Guide - a guide for the use of antibodies in ELISA development*.

[194] Corning Incorporated, Life S. *Effective Blocking Procedures in ELISA Assays*.

[195] Algar, W.R., *A Brief Introduction to Traditional Bioconjugate Chemistry*, in *Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions*. 2017. p. 1-36.

[196] Weeks, I., L.J. Kricka, and D. Wild, *Chapter 3.2 - Signal Generation and Detection Systems (Excluding Homogeneous Assays)*, in *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*, D. Wild, Editor. 2013, Elsevier: Oxford. p. 267-285.

[197] Xing, Y. and E. Borguet, *Specificity and sensitivity of fluorescence labeling of surface species.* Langmuir, 2007. **23**(2): p. 684-8.

[198] Armbruster, D.A. and T. Pry, *Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation.* Clin Biochem Rev, 2008. **29 Suppl 1**(Suppl 1): p. S49-52.

[199] Becker, H. and L.E. Locascio, *Polymer microfluidic devices.* Talanta, 2002. **56**(2): p. 267-287.

[200] Greiner Bio-One GmbH. *Customer Drawing Sensoplate plus, 384 well, black, 175 µm glass bottom, Item-No: 781856*.

[201] Brener, O., et al., *QIAD assay for quantitating a compound's efficacy in elimination of toxic Aβ oligomers.* Scientific Reports, 2015. **5**(1): p. 13222.

[202] Stine, W.B., et al., *Preparing synthetic Aβ in different aggregation states.* Methods Mol Biol, 2011. **670**: p. 13-32.

[203] Novo, M., S. Freire, and W. Al-Soufi, *Critical aggregation concentration for the formation of early Amyloid-β (1–42) oligomers.* Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 1783.

[204] Ryan, D.A., et al., *An improved method for generating consistent soluble amyloid-beta oligomer preparations for in vitro neurotoxicity studies.* J Neurosci Methods, 2010. **190**(2): p. 171-9.

[205] Kotler, S.A. and A. Ramamoorthy, *Preparation of Stable Amyloid-β Oligomers Without Perturbative Methods.* Methods Mol Biol, 2018. **1777**: p. 331-338.

[206] Sigma-Aldrich. *Product Information - CF633, Succinimidyl Ester*.

[207] Thermo Fisher Scientific. *Alexa Fluor, Pacific Blue, and Pacific Orange Antbody Labeling Kits*.

[208] Wiseman, M.E. and C.W. Frank, *Antibody adsorption and orientation on hydrophobic surfaces.* Langmuir, 2012. **28**(3): p. 1765-74.

[209] Schroeder, B., et al., *Preactivation Crosslinking – An Efficient Method for the Oriented Immobilization of Antibodies*. 2019: Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM).

[210] Corning Incorporated, Life S. *Optimizing the Immobilization of Protein and Other Biomolecules for ELISA Assays*.

[211] Ma, G.J., et al., *Conformational flexibility of fatty acid-free bovine serum albumin proteins enables superior antifouling coatings.* Communications Materials, 2020. **1**(1): p. 45.

[212] Wang, W., X. Dong, and Y. Sun, *Modification of Serum Albumin by High Conversion of Carboxyl to Amino Groups Creates a Potent Inhibitor of Amyloid β-Protein Fibrillogenesis.* Bioconjug Chem, 2019. **30**(5): p. 1477-1488.

[213] Milojevic, J., A. Raditsis, and G. Melacini, *Human serum albumin inhibits Abeta fibrillization through a "monomer-competitor" mechanism.* Biophys J, 2009. **97**(9): p. 2585-94.

[214] Kasai, T., et al., *Utilization of a multiple antigenic peptide as a calibration standard in the BAN50 single antibody sandwich ELISA for Aβ oligomers.* Biochem Biophys Res Commun, 2012. **422**(3): p. 375-80.

[215] Esparza, T.J., et al., *Amyloid-β oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls.* Ann Neurol, 2013. **73**(1): p. 104-19.

[216] Dybala, A., *Einzelpartikelanalyse zur Diagnose von Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät*. 2022, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

[217] Ramakrishnan, M., et al., *Surface plasmon resonance binding kinetics of Alzheimer's disease amyloid beta peptide-capturing and plaque-binding monoclonal antibodies.* Biochemistry, 2009. **48**(43): p. 10405-10415.

[218] Dornieden, S., et al., *Characterization of a single-chain variable fragment recognizing a linear epitope of aβ: a biotechnical tool for studies on Alzheimer's disease?* PLoS One, 2013. **8**(3): p. e59820.

[219] Dent, A.H., *Chapter 3.4 - Conjugation Methods*, in *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*, D. Wild, Editor. 2013, Elsevier: Oxford. p. 301-313.

[220] Sigma-Aldrich. *CF633 Dye - The best dye for 633/635 nm laser lines*.

[221] Rutsch, J., *Masterarbeit - Quantitative Detektion von DISC1 Oligomeren in Körperflüssigkeiten mittels sFIDA*. 2019, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: nichtveröffentlichte Quelle.

[222] Anja Schaffrath, *Entwicklung eines diagnostischen Assays zum Nachweis von alpha-Synuclein-Aggregaten*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät*. 2023, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

[223] Tate, J. and G. Ward, *Interferences in immunoassay.* Clin Biochem Rev, 2004. **25**(2): p. 105-20.

[224] Dimeski, G., *Interference testing.* Clin Biochem Rev, 2008. **29 Suppl 1**(Suppl 1): p. S43-8.

[225] Vanderstichele, H., et al., *Potential sources of interference on Abeta immunoassays in biological samples.* Alzheimer's Research & Therapy, 2012. **4**(5): p. 39.

[226] Kuo, Y.M., et al., *Amyloid-beta peptides interact with plasma proteins and erythrocytes: implications for their quantitation in plasma.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **268**(3): p. 750-6.

[227] Stanyon, H.F. and J.H. Viles, *Human serum albumin can regulate amyloid-β peptide fiber growth in the brain interstitium: implications for Alzheimer disease.* J Biol Chem, 2012. **287**(33): p. 28163-8.

[228] van de Merbel, N., et al., *Stability: recommendation for best practices and harmonization from the Global Bioanalysis Consortium Harmonization Team.* Aaps j, 2014. **16**(3): p. 392-9.

[229] Hansson, O., et al., *The Alzheimer's Association international guidelines for handling of cerebrospinal fluid for routine clinical measurements of amyloid β and tau.* Alzheimers Dement, 2021. **17**(9): p. 1575-1582.

[230] O'Bryant, S.E., et al., *Guidelines for the standardization of preanalytic variables for blood-based biomarker studies in Alzheimer's disease research.* Alzheimers Dement, 2015. **11**(5): p. 549-60.

[231] Vanderstichele, H.M., et al., *Optimized Standard Operating Procedures for the Analysis of Cerebrospinal Fluid Aβ42 and the Ratios of Aβ Isoforms Using Low Protein Binding Tubes.* J Alzheimers Dis, 2016. **53**(3): p. 1121-32.

[232] Schoonenboom, N.S., et al., *Effects of processing and storage conditions on amyloid beta (1-42) and tau concentrations in cerebrospinal fluid: implications for use in clinical practice.* Clin Chem, 2005. **51**(1): p. 189-95.

[233] Hansson, O., et al., *The impact of preanalytical variables on measuring cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis: A review.* Alzheimers Dement, 2018. **14**(10): p. 1313-1333.

[234] Liu, H.C., et al., *Stability of Plasma Amyloid-β 1-40, Amyloid-β 1-42, and Total Tau Protein over Repeated Freeze/Thaw Cycles.* Dement Geriatr Cogn Dis Extra, 2020. **10**(1): p. 46-55.

[235] Keshavan, A., et al., *Stability of blood-based biomarkers of Alzheimer's disease over multiple freeze-thaw cycles.* Alzheimers Dement (Amst), 2018. **10**: p. 448-451.

[236] Rose, C., et al., *The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology.* Crit Rev Environ Sci Technol, 2015. **45**(17): p. 1827-1879.

[237] Lee, J.W., et al., *Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement.* Pharm Res, 2006. **23**(2): p. 312-28.

[238] Abdi, I.Y., et al., *Preanalytical Stability of CSF Total and Oligomeric Alpha-Synuclein.* Front Aging Neurosci, 2021. **13**: p. 638718.

[239] Toombs, J., et al., *Amyloid-beta 42 adsorption following serial tube transfer.* Alzheimers Res Ther, 2014. **6**(1): p. 5.

[240] Blacksell, S.D., et al., *Implementation of internal laboratory quality control procedures for the monitoring of ELISA performance at a regional veterinary laboratory.* Vet Microbiol, 1996. **51**(1-2): p. 1-9.

[241] Sturgeon, C.M., *Chapter 6.2 - Quality Assurance*, in *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*, D. Wild, Editor. 2013, Elsevier: Oxford. p. 441-454.

[242] Lock, R.J., *My approach to internal quality control in a clinical immunology laboratory.* J Clin Pathol, 2006. **59**(7): p. 681-4.

[243] IBL-International. *Human Amyloid β Toxic Oligomer Assay Kit - IBL. Instruction for Use Code No. 27709*.

[244] Shea, D., et al., *SOBA: Development and testing of a soluble oligomer binding assay for detection of amyloidogenic toxic oligomers.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2022. **119**(50): p. e2213157119.

[245] Babapour Mofrad, R., et al., *Plasma amyloid-β oligomerization assay as a pre-screening test for amyloid status.* Alzheimers Res Ther, 2021. **13**(1): p. 133.

[246] Wang, M.J., et al., *Oligomeric forms of amyloid-β protein in plasma as a potential blood-based biomarker for Alzheimer's disease.* Alzheimers Res Ther, 2017. **9**(1): p. 98.

[247] Majbour, N.K., et al., *Oligomeric and phosphorylated alpha-synuclein as potential CSF biomarkers for Parkinson's disease.* Mol Neurodegener, 2016. **11**: p. 7.

[248] Parnetti, L., et al., *Differential role of CSF alpha-synuclein species, tau, and Aβ42 in Parkinson's Disease.* Front Aging Neurosci, 2014. **6**: p. 53.

[249] Tokuda, T., et al., *Detection of elevated levels of α-synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease.* Neurology, 2010. **75**(20): p. 1766-72.

[250] Park, M.J., et al., *Elevated levels of α-synuclein oligomer in the cerebrospinal fluid of drug-naive patients with Parkinson's disease.* J Clin Neurol, 2011. **7**(4): p. 215-22.

[251] Sengupta, U., et al., *Tau oligomers in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease.* Ann Clin Transl Neurol, 2017. **4**(4): p. 226-235.

[252] Henke, F., *Dissertation - Nachweis einzelner krankheits-assoziierter Proteinaggregate als diagnostische Methode für Prionkrankheiten*. 2009, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

[253] Horwitz, W., L.R. Kamps, and K.W. Boyer, *Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents.* J Assoc Off Anal Chem, 1980. **63**(6): p. 1344-54.

[254] Park, J.Y. and L.J. Kricka, *Chapter 5.3 - Interferences in Immunoassay*, in *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*, D. Wild, Editor. 2013, Elsevier: Oxford. p. 403-416.

[255] Barkovits, K., et al., *Blood Contamination in CSF and Its Impact on Quantitative Analysis of Alpha-Synuclein.* Cells, 2020. **9**(2).

[256] Barbour, R., et al., *Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood.* Neurodegener Dis, 2008. **5**(2): p. 55-9.

[257] Mollenhauer, B., et al., *α-Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study.* Lancet Neurol, 2011. **10**(3): p. 230-40.

[258] Sehlin, D., et al., *Interference from heterophilic antibodies in amyloid-β oligomer ELISAs.* J Alzheimers Dis, 2010. **21**(4): p. 1295-301.

[259] Ishii, R., et al., *Decrease in plasma levels of α-synuclein is evident in patients with Parkinson's disease after elimination of heterophilic antibody interference.* PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0123162.

[260] *International Organization for Standardization: DIN EN ISO 13612: Leistungsbewertung von In-vitro-Diagnostika, Deutsche Fassung ISO EN 13612:2002*. 2002.

[261] *International Organization for Standardization: DIN EN ISO 20916: In-vitro-Diagnostika - Klinische Leistungsuntersuchungen an menschlichem Untersuchungsmaterial - Gute Studienpraxi, Deutsche Fassung ISO EN 20916:2019*. 2019.

[262] Mroczko, B., et al., *Amyloid β oligomers (AβOs) in Alzheimer's disease.* J Neural Transm (Vienna), 2018. **125**(2): p. 177-191.

[263] Jessen, F., et al., *Design and first baseline data of the DZNE multicenter observational study on predementia Alzheimer's disease (DELCODE).* Alzheimers Res Ther, 2018. **10**(1): p. 15.

[264] Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen. *DZNE - Longitudinale Studie zu Kognitiven Beeinträchtigungen und Demenz*.

[265] Yamazaki, Y., et al., *Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies.* Nat Rev Neurol, 2019. **15**(9): p. 501-518.

[266] Leoni, V., *The effect of apolipoprotein E (ApoE) genotype on biomarkers of amyloidogenesis, tau pathology and neurodegeneration in Alzheimer's disease.* Clin Chem Lab Med, 2011. **49**(3): p. 375-83.

[267] Liu, C.C., et al., *Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy.* Nat Rev Neurol, 2013. **9**(2): p. 106-18.

[268] Xia, W., et al., *A specific enzyme-linked immunosorbent assay for measuring beta-amyloid protein oligomers in human plasma and brain tissue of patients with Alzheimer disease.* Arch Neurol, 2009. **66**(2): p. 190-9.

[269] Fagan, A.M., et al., *Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans.* Ann Neurol, 2006. **59**(3): p. 512-9.

[270] Xin, S.H., et al., *Clearance of Amyloid Beta and Tau in Alzheimer's Disease: from Mechanisms to Therapy.* Neurotox Res, 2018. **34**(3): p. 733-748.

[271] Sun, M., et al., *A Review of the Brain-Gut-Microbiome Axis and the Potential Role of Microbiota in Alzheimer's Disease.* J Alzheimers Dis, 2020. **73**(3): p. 849-865.

[272] Leblhuber, F., et al., *Elevated fecal calprotectin in patients with Alzheimer's dementia indicates leaky gut.* J Neural Transm (Vienna), 2015. **122**(9): p. 1319-22.

[273] Kowalski, K. and A. Mulak, *Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease.* J Neurogastroenterol Motil, 2019. **25**(1): p. 48-60.

[274] Fink, A., G. Doblhammer, and G. Tamgüney, *Recurring Gastrointestinal Infections Increase the Risk of Dementia.* J Alzheimers Dis, 2021. **84**(2): p. 797-806.

[275] Ullah, R., et al., *Abnormal amyloid beta metabolism in systemic abnormalities and Alzheimer's pathology: Insights and therapeutic approaches from periphery.* Ageing Res Rev, 2021. **71**: p. 101451.

[276] Jiang, C., et al., *The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease.* J Alzheimers Dis, 2017. **58**(1): p. 1-15.

[277] Wu, S., et al., *Excretion of Amyloid-β in the Gastrointestinal Tract and Regulation by the Gut Microbiota.* J Alzheimers Dis, 2022. **90**(3): p. 1153-1162.

[278] Pellegrini, C., et al., *Prodromal Intestinal Events in Alzheimer's Disease (AD): Colonic Dysmotility and Inflammation Are Associated with Enteric AD-Related Protein Deposition.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(10).

[279] Manocha, G.D., et al., *Temporal progression of Alzheimer's disease in brains and intestines of transgenic mice.* Neurobiol Aging, 2019. **81**: p. 166-176.

[280] Puig, K.L., G.D. Manocha, and C.K. Combs, *Amyloid precursor protein mediated changes in intestinal epithelial phenotype in vitro.* PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0119534.

[281] Fukumoto, H., et al., *High-molecular-weight beta-amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients.* Faseb j, 2010. **24**(8): p. 2716-26.

[282] Herskovits, A.Z., et al., *A Luminex assay detects amyloid β oligomers in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid.* PLoS One, 2013. **8**(7): p. e67898.

[283] Han, S.W., et al., *Implications of Liver Enzymes in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease.* J Alzheimers Dis, 2022. **88**(4): p. 1371-1376.

[284] Li, W., et al., *An Increased Aspartate to Alanine Aminotransferase Ratio Is Associated With a Higher Risk of Cognitive Impairment.* Front Med (Lausanne), 2022. **9**: p. 780174.

[285] Nho, K., et al., *Association of Altered Liver Enzymes With Alzheimer Disease Diagnosis, Cognition, Neuroimaging Measures, and Cerebrospinal Fluid Biomarkers.* JAMA Netw Open, 2019. **2**(7): p. e197978.

[286] Kowalski, K. and A. Mulak, *Small intestinal bacterial overgrowth in Alzheimer's disease.* J Neural Transm (Vienna), 2022. **129**(1): p. 75-83.

[287] Friedland, R.P. and M.R. Chapman, *The role of microbial amyloid in neurodegeneration.* PLoS Pathog, 2017. **13**(12): p. e1006654.

[288] Varesi, A., et al., *The Potential Role of Gut Microbiota in Alzheimer's Disease: From Diagnosis to Treatment.* Nutrients, 2022. **14**(3).

[289] Kesika, P., et al., *Role of gut-brain axis, gut microbial composition, and probiotic intervention in Alzheimer's disease.* Life Sci, 2021. **264**: p. 118627.

[290] Stadlbauer, V., et al., *Dysbiosis, gut barrier dysfunction and inflammation in dementia: a pilot study.* BMC Geriatr, 2020. **20**(1): p. 248.

[291] Wu, L., et al., *Altered Gut Microbial Metabolites in Amnestic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Signals in Host-Microbe Interplay.* Nutrients, 2021. **13**(1).

[292] Qian, X.H., et al., *Mechanisms of Short-Chain Fatty Acids Derived from Gut Microbiota in Alzheimer's Disease.* Aging Dis, 2022. **13**(4): p. 1252-1266.

[293] Mulak, A., *Bile Acids as Key Modulators of the Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease.* J Alzheimers Dis, 2021. **84**(2): p. 461-477.

[294] Vogt, N.M., et al., *Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease.* Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 13537.

[295] Holper, S., R. Watson, and N. Yassi, *Tau as a Biomarker of Neurodegeneration.* Int J Mol Sci, 2022. **23**(13).

[296] Selkoe, D.J. and J. Hardy, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years.* EMBO Mol Med, 2016. **8**(6): p. 595-608.

[297] Berg, D., et al., *Prodromal Parkinson disease subtypes - key to understanding heterogeneity.* Nat Rev Neurol, 2021. **17**(6): p. 349-361.

[298] Borghammer, P. and N. Van Den Berge, *Brain-First versus Gut-First Parkinson's Disease: A Hypothesis.* J Parkinsons Dis, 2019. **9**(s2): p. S281-s295.

[299] Horsager, J., et al., *Brain-first versus body-first Parkinson's disease: a multimodal imaging case-control study.* Brain, 2020. **143**(10): p. 3077-3088.

[300] Weis, S., et al., *Association between Parkinson's disease and the faecal eukaryotic microbiota.* NPJ Parkinsons Dis, 2021. **7**(1): p. 101.

[301] Kleine Bardenhorst, S., et al., *Gut microbiota dysbiosis in Parkinson disease: A systematic review and pooled analysis.* Eur J Neurol, 2023.

[302] Nam, D., et al., *Detection and Assessment of α-Synuclein Oligomers in the Urine of Parkinson's Disease Patients.* J Parkinsons Dis, 2020. **10**(3): p. 981-991.

[303] Vivacqua, G., et al., *Salivary alpha-synuclein in the diagnosis of Parkinson's disease and Progressive Supranuclear Palsy.* Parkinsonism Relat Disord, 2019. **63**: p. 143-148.

[304] Luan, M., et al., *Diagnostic Value of Salivary Real-Time Quaking-Induced Conversion in Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy.* Mov Disord, 2022. **37**(5): p. 1059-1063.

[305] Wang, Z., et al., *Skin α-Synuclein Aggregation Seeding Activity as a Novel Biomarker for Parkinson Disease.* JAMA Neurol, 2020. **78**(1): p. 1-11.

[306] De Luca, C.M.G., et al., *Efficient RT-QuIC seeding activity for α-synuclein in olfactory mucosa samples of patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy.* Transl Neurodegener, 2019. **8**: p. 24.

[307] Kluge, A., et al., *Detection of neuron-derived pathological α-synuclein in blood.* Brain, 2022. **145**(9): p. 3058-3071.

[308] Bongianni, M., et al., *Olfactory swab sampling optimization for α-synuclein aggregate detection in patients with Parkinson's disease.* Transl Neurodegener, 2022. **11**(1): p. 37.

[309] Zhang, T., et al., *Toward the Mode of Action of the Clinical Stage All-d-Enantiomeric Peptide RD2 on Aβ42 Aggregation.* ACS Chemical Neuroscience, 2019. **10**(12): p. 4800-4809.

[310] Wiesehan, K., et al., *Selection of D-Amino-Acid Peptides That Bind to Alzheimer's Disease Amyloid Peptide Aβ1–42 by Mirror Image Phage Display.* ChemBioChem, 2003. **4**(8): p. 748-753.

[311] *Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz - AMG) vom 24.08.1976*. 1976.

[312] Lu, B., M.R. Smyth, and R. O'Kennedy, *Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors.* Analyst, 1996. **121**(3): p. 29r-32r.

[313] Xing, Y., N. Dementev, and E. Borguet, *Chemical labeling for quantitative characterization of surface chemistry.* Current Opinion in Solid State and Materials Science, 2007. **11**(5): p. 86-91.

[314] BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH. *Auswahl von Fluoreszenzfarbstoffen und -konjugaten*.

[315] BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH. *Fluoreszenzfarbstoffe für Sekundärantikörper*.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dieter Willbold für die Möglichkeit, dieses spannende Thema am Institut für Strukturbiochemie am Forschungszentrum in Jülich erarbeiten zu dürfen, bedanken. Danke für die wissenschaftliche und konstruktive Unterstützung, die ausgezeichnete Laborausrüstung und die tolle Arbeitsatmosphäre. Vielen Dank für die Möglichkeit, mein Wissen und Interesse in den Bereichen Qualitätsmanagement und Regulatory Affairs erweitern zu dürfen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Jun.-Prof. Dr. Wolfgang Hoyer und bei Herrn Prof. Dr. Peter Bayer für die Übernahme des Zweit- bzw. Drittgutachtens bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Oliver Bannach für die tolle und stets motivierende Betreuung, die zahlreichen fachlichen Ratschläge, seine optimistische Art und für das Korrekturlesen dieser Arbeit. An dieser Stelle gilt mein Dank außerdem allen Mitgliedern und ehemaligen Mitarbeitern der AG Bannach! Es hat sehr viel Spaß gemacht, in einer so teamorientierten Umgebung zu arbeiten. Bei Dr. Yvonne Herrmann, Dr. Tuyen Bujnicki, Dr. Andreas Kulawik, Dr. Christian Zafiu und Loreano Peters bedanke ich mich für die gute Einarbeitung in die sFIDA-Thematik, TIRF-Mikroskopie und Datenanalyse. Mein besonderer Dank gilt meinen ehemaligen Bürokolleginnen Dr. Yvonne Herrmann, Victoria Kraemer-Schulien, Lara Blömeke, Alexandra Schmitz und Dr. Alexandra Dybala für die gute Zusammenarbeit, die vielen motivierenden Gespräche und die vielen schönen Momente, die wir außerhalb des Labors zusammen erlebt haben. Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten suFIDA-Gruppe unter Leitung von Dr. Tuyen Bujnicki, der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Erdem Tamgüney sowie der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Carsten Korth für die gute Zusammenarbeit innerhalb verschiedener Projekte bedanken.

Mein Dank gilt zudem allen, die den Arbeitsalltag im Büro und Labor in vielerlei Hinsicht erleichterten: Danke an alle technischen Assistenten, an das Bestellteam, an die lieben Kollegen aus dem Sekretariat, der Verwaltung und der IT.

Abschließend bedanke ich mich bei allen weiteren Mitgliedern des Instituts für Strukturbiochemie am Forschungszentrum Jülich als auch des Instituts der Physikalischen Biologie für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren.

Anhang

Weitere Informationen zu Kapitel 3

Weitere Informationen zu Kapitel 4

Weitere Informationen zu Kapitel 5

Weitere Informationen zu Kapitel 3

Anhang 1 – Tabellarischer Verifizierungsplan für die Festphasenentwicklung von sFIDA-Assays.

EXP1	Immobilisierungstechnik
Testvarianten	Obligatorisch: Auswahl Immobilisierungstechnik ▪ Physisorption ▪ Kovalent: z.B. Kopplung über Amine, Thiole, Kohlenhydrate, Carbonsäuren oder Spacer-vermittelt z.B. über PEG, Dextran ▪ Bioaffine Wechselwirkungen: z.B. Avidin/Streptavidin-Biotin-System, Protein A, Protein G, Polyhistidin-Tag, Aptamere Optional: ▪ Optimierung Oberflächenreinigung, Oberflächenfunktionalisierung ▪ Optimierung der Orientierung der Capture-Antikörper
Analyten	▪ Modellsysteme für FLOSS: z.B. fluoreszenzmarkierte Antikörper / Amine, reaktive Fluoreszenzfarbstoffe, bioaffine Sondenproteine ▪ Nullkontrolle ▪ SiNaPs: mindestens 5 Konzentrationen ▪ Synthetische Aggregate: mindestens 3 Konzentrationen ▪ falls möglich biologische Proben: mindestens 3 Proben (mit niedriger, mittlerer und hoher endogener Analytkonzentration)
Kenngrößen	▪ Effektivität der Oberflächenbeschichtung (Überprüfung Immobilisierungstechnik mittels FLOSS) ▪ Hintergrundrauschen (prozentualer Cut-off oder Pixel Count bzw. sFIDA Readout der Nullkontrolle bei einheitlichem Cut-off) ▪ Amplifikation spezifisches Signal (Signal-Rausch-Verhältnis) ▪ Analytische Spezifität (Capture-Kontrolle)
Limitierungen	▪ Chemische oder physikalische Modifikationen können aufgrund von Spezifikationen der Mikrotiterplatte limitiert sein
Weiterführende Literatur	➢ Immobilisierungstechnik allgemein: [177, 181, 187, 189, 192] ➢ Orientierung der Antikörper: [186, 188-190, 208, 312] ➢ FLOSS: [197, 313]

EXP2	Coating-Puffer
Testvarianten	<u>Obligatorisch: Auswahl Basis-Puffer</u> ▪ Kommerzieller Coating-Puffer: z.B. *Coating Buffer 10×* (Candor Bioscience), *ELISA Phosphate Coating Buffer* (Thermo Fisher Scientific) oder ▪ Eruierung Basis-Puffer: saures Puffersystem (MES, Citratpuffer), neutrales Puffersystem (TBS, PBS, Natriumphosphatpuffer), basisches Puffersystem (Tris-Puffer, $NaHCO_3$) <u>Optional:</u> ▪ Feinjustierung pH-Wert, Salzkonzentration, Ionenstärke
Analyten	▪ Nullkontrolle ▪ SiNaPs: mindestens 5 Konzentrationen ▪ Synthetische Aggregate: mindestens 3 Konzentrationen ▪ falls möglich biologische Proben: mindestens 3 Proben (mit niedriger, mittlerer und hoher endogener Analytkonzentration)
Kenngrößen	▪ Hintergrundrauschen (prozentualer Cut-off oder Pixel Count bzw. sFIDA Readout der Nullkontrolle bei einheitlichem Cut-off) ▪ Amplifikation spezifisches Signal (Signal-Rausch-Verhältnis) ▪ Analytische Spezifität (Capture-Kontrolle)
Limitierungen	▪ Auswahl Puffer bei kovalenter Immobilisierung je nach angewandter Chemie limitiert z.B. Verwendung von Tris oder Glycin Puffer bei Kopplung über Amine nicht möglich ▪ Variation pH-Wert bei kovalenter Immobilisierung durch angewandte Immobilisierungschemie limitiert ▪ Kommerzielle Coating-Puffer: Additive wie Detergenz oder Blocking-Agenz vermeiden, da diese kompetitiven Coating-Effekte verursachen können
Weiterführende Literatur	➢ [174, 176, 177, 181, 187, 191]

EXP3	Auswahl Capture-Antikörper und Eruierung Capture-Konzentration
Testvarianten	Obligatorisch: ▪ Auswahl Antikörper (z.B. Antikörperklasse; Gewinnung: monoklonal / polyklonal / rekombinant; Spezies; Modifikationen; Epitop: linear, strukturspezifisch; Affinität und Avidität) ▪ Eruierung der Capture-Konzentration mittels Stufencoating: abhängig von Analyten, Probenmatrix, Qualität Detektionsantikörper z.B. 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10 µg/mL Optional: ▪ Schachbrett-Titration: Eruierung der Capture- und Detektionsantikörperkonzentrationen ▪ Je nach Immobilisierungstechnik: Funktionalisierung des Capture-Antikörpers
Analyten	▪ Nullkontrolle ▪ SiNaPs: mindestens 5 Konzentrationen ▪ Synthetische Aggregate: mindestens 3 Konzentrationen ▪ falls möglich biologische Proben: mindestens 3 Proben (mit niedriger, mittlerer und hoher endogener Analytkonzentration)
Kenngrößen	▪ Hintergrundrauschen (prozentualer Cut-off oder Pixel Count bzw. sFIDA Readout der Nullkontrolle bei einheitlichem Cut-off) ▪ Amplifikation spezifisches Signal (Signal-Rausch-Verhältnis) ▪ Analytische Spezifität (Capture-Kontrolle) ▪ Optional: Kritische Capture-Konzentration: unzureichende Signalamplifikation bei zu geringen Konzentrationen oder bei zu hohen Konzentrationen (Ausbildung einer instabilen Multilayerschicht)
Limitierungen	▪ Capture- und Detektionsantikörper müssen gegen gleiches oder überlappendes Epitop gerichtet sein ▪ Stock muss frei von Fremdprotein oder Detergenz sein, ansonsten kompetitive Coating-Effekte ▪ Kreuzreaktivität: endogenen Antikörpern z.B. HAMAs in Plasmaproben können mit Maus-Antikörper als Capture interferieren und falsch-positive Messsignale erzeugen
Weiterführende Literatur	➢ Wahl Antikörper, Konzentration: [174-176, 181, 187, 192, 193] ➢ Mögliche Kreuzreaktivitäten: [181, 223, 224, 254]

EXP4	Komposition der Blockadelösung
Testvarianten	<u>Obligatorisch: Eruierung Puffer, Blocking-Agenz</u> ▪ Kommerzielle Blockadelösungen: z.B. *The Blocking Solution* (Casein-Basis, Candor Bioscience), *Smart Block* (auf Basis synthetischer Peptidfragmente, Candor Bioscience) oder ▪ Eruierung Basis-Puffer: abhängig von Analyten und Probenmatrix z.B. TBS, PBS ▪ Eruierung Blocking-Agenz: z.B. Proteine (BSA, Casein, Gelatine, humanes Serumalbumin, fetales Kälberserum), nicht-ionisches Detergenzien (Tween20, Tween80, Triton X-100), Sonstiges (Dextransulfat, Magermilchpulver) ▪ Eruierung Konzentrationen: abhängig von Qualität des Blocking-Agenz, Analyten, Probenmatrix und Probenverdünnung z.B. 0,5 - 5% BSA, 1 - 5% Casein, 1 - 5% Gelatine, 0,1 - 5% Magermilchpulver, 0,01% - 0,1% Tween20 <u>Optional:</u> ▪ Test weiterer Additive wie nicht-ionisches Detergenz zur Reduzierung Intra-Assay-Varianz, Biozid zur Vermeidung von Autofluoreszenz
Analyten	▪ Nullkontrolle ▪ SiNaPs: mindestens 5 Konzentrationen ▪ Synthetische Aggregate: mindestens 3 Konzentrationen ▪ falls möglich biologische Proben: mindestens 3 Proben (mit niedriger, mittlerer und hoher endogener Analytkonzentration)
Kenngrößen	▪ Hintergrundrauschen (prozentualer Cut-off oder Pixel Count bzw. sFIDA Readout der Nullkontrolle bei einheitlichem Cut-off) ▪ Signalamplifikation (Signal-Rausch-Verhältnis) ▪ analytische Spezifität (Capture-Kontrolle) und optional: CV%
Limitierungen	▪ Hohe Lot-zu-Lot Varianz proteinbasierter Blocking-Agenzien: Qualität muss mittels Robustheitsstudie validiert werden ▪ Verwendetes BSA sollte frei von IgG und Lipiden sein, um Lot-zu-Lot-Varianz zu reduzieren ▪ Detergenzien aufgrund von Desorption der Capture-Antikörper nicht für Assays mit Physisorption als Immobilisierungstechnik geeignet ▪ Milchpulver enthält Biotin und ist daher aufgrund von Interferenzen nicht für Assays mit Avidin/Streptavidin-Biotin-System geeignet ▪ Fetales Kälberserum aufgrund von Interferenzen nicht für Assays mit Protein A-Komponenten geeignet
Weiterführende Literatur	➢ [174-176, 181, 187, 194]

EXP5	Eruierung Probenpuffer
Testvarianten	<u>Obligatorisch: Eruierung Basis-Puffer sowie Additive</u> ▪ Kommerzieller Probenpuffer: z.B. *LowCross-Buffer* (Candor Bioscience), *Assay Defender* (Candor Bioscience), *EliA Sample Diluent* (Thermo Fisher Scientific), *EliA Calprotectin 2 Extraction Buffer* (Thermo Fisher Scientific) oder ▪ Eruierung Basis-Puffer: abhängig von Analyten und Probenmatrix z.B. TBS, PBS, HEPES ▪ Eruierung Additive: abhängig von Analyten und Probenmatrix z.B. geringkonzentrierte Blocking-Agenzien (BSA), geringkonzentrierte Detergenzien (Tween20, Sarkosyl, Triton X-100 oder CHAPS), Biozide (Azid, ProClin), Inhibitoren (Phosphatase- oder Protease-Inhibitoren), Stabilisatoren (Glycerol) <u>Optional:</u> ▪ Feinjustierung Basis-Puffer: pH-Wert, Ionenstärke, Salzgehalt ▪ Feinjustierung Additive: Konzentration
Analyten	▪ Nullkontrolle ▪ SiNaPs: mindestens 5 Konzentrationen ▪ Synthetische Aggregate: mindestens 5 Konzentrationen ▪ falls möglich biologische Proben: mindestens 6 Proben (jeweils 2 mit niedriger, mittlerer und hoher endogenen Analytkonzentration)
Kenngrößen	▪ Hintergrundrauschen (prozentualer Cut-off oder Pixel Count bzw. sFIDA Readout der Nullkontrolle bei einheitlichem Cut-off) ▪ Signalamplifikation (Signal-Rausch-Verhältnis) ▪ Präzision (Intra-Assay-Varianz CV%) ▪ Optional: dynamischer Messbereich (ULOQ, Verdünnungslinearität)
Limitierungen	Kommerzielle Puffer können Farbstoffe enthalten, die im sFIDA stören
Weiterführende Literatur	➢ [174-176, 181, 187, 194]

EXP6	Detektionssystem
Testvarianten	<u>Obligatorisch: Auswahl Detektionsantikörper</u> ▪ Kommerzielle Detektionsantikörper oder ▪ Auswahl Antikörper (z.B. Antikörperklasse; Gewinnung: monoklonal / polyklonal / rekombinant; Spezies; Modifikationen; Epitop: linear, strukturspezifisch; Affinität und Avidität), Fluoreszenzfarbstoff (Quantenausbeute; Photostabilität; Anregungswellenlänge; Emissionswellenlänge; spektrale Überlappung; Ausstattung Mikroskop; Marke: CF-Farbstoff, Alexa Fluor, ATTO) und Konjugationstechnik (reaktiver Farbstoff; Kopplung über Amine; Kohlenhydratreste, DOL) <u>Obligatorisch: Eruierung der Konzentration der Detektionsantikörper</u> ▪ Stufencoating: abhängig von Analyten, Probenmatrix, Qualität Detektionsantikörper z.B. 0,156; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5, 5,0 µg/mL ▪ Im Falle von Kolokalisation: Feinjustierung beider Detektionssonden <u>Obligatorisch: Eruierung Basis-Puffer sowie Additive</u> ▪ Kommerzieller Detektionssondenpuffer: z.B. *Antibody Stabilizer* (Candor Bioscience) oder ▪ Eruierung Basis-Puffer: z.B. TBS, PBS ▪ Eruierung Additive: abhängig von Analyten und Probenmatrix z.B. geringkonzentrierte Blocking-Agenzien (BSA), geringkonzentrierte Detergenzien (Tween20, Sarkosyl, Triton X-100 oder CHAPS), Biozide (Azid, ProClin) <u>Optional:</u> ▪ Feinjustierung Basis-Puffer: pH-Wert, Ionenstärke, Salzgehalt ▪ Feinjustierung Additive: Konzentration ▪ Signalamplifikation testen z.B. mittels Avidn/Streptavidin-Biotin-Komplex
Analyten	▪ Nullkontrolle ▪ SiNaPs: mindestens 5 Konzentrationen ▪ Synthetische Aggregate: mindestens 5 Konzentrationen ▪ falls möglich biologische Proben: mindestens 6 Proben (jeweils 2 mit niedriger, mittlerer und hoher endogenen Analytkonzentration)
Kenngrößen	▪ Hintergrundrauschen (prozentualer Cut-off oder Pixel Count bzw. sFIDA Readout der Nullkontrolle bei einheitlichem Cut-off) ▪ Signalamplifikation (Signal-Rausch-Verhältnis) ▪ Präzision (Intra-Assay-Varianz CV%) ▪ Optional: dynamischer Messbereich (ULOQ, Verdünnungslinearität)

EXP6	Detektionssystem
Limitierungen	▪ Wahl Antikörper: Capture- und Detektionsantikörper müssen gegen gleiches oder überlappendes Epitop gerichtet sein, Antikörper-Stock muss frei von Natriumazid sein ▪ Wahl Fluoreszenzfarbstoff z.B. durch Mikroskopausstattung (Lichtquelle, Filterset, Detektionssystem), Eigenschaften des Fluorophors (Quantenausbeute, Photostabilität, spektrale Überlappung, Funktionalisierung für bestimmte Konjugationstechnik), Probenmatrix (Autofluoreszenz, pH-Wert) limitiert ▪ Wahl Puffer: pH-Wert, Salzgehalt, Viskosität können Quantenausbeute des Fluorophors beeinträchtigen
Weiterführende Literatur	➢ Fluoreszenzfarbstoffe: [165, 181, 314, 315] ➢ Konjugationstechnik: [181, 190, 195, 196, 219]

Anhang 2 – Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialen.

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Bestell- bzw. Seriennummer	Hersteller
Abdeckfolie	SealPlate film, sterile	Z369667	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ballon	Gasballons ROTILABO Standard	0933.1	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe, Deutschland)
Kanüle	STERICAN Einmal-Kanülen in Sondergrößen G20, 0.90 x 70 mm	4665791	B. Braun SE (Melsungen, Deutschland)
Küvette	UVette 220-1600 nm, PCR clean, 50-2000 µL	0030106300	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
Mikrotiterplatten-Deckel	96-Well Mikrotiterplatten-Deckel, hohes Profil (9 mm), transparent	656101	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Membranfilter	Spritzenfilter ROTLABO, PVDF, steril, 0,22 µm	P666.1	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe, Deutschland)
	VacuCap 60, steril, 0,22 µm	PA4632	Pall Corporation (Port Washington, NY, USA)
Pipettenspitzen	Pipettenspitze 1000 µL, transparent, PCR Performance Tested, Low Retention	70.3050.110	Sarstedt AG & Co.KG (Nümbrecht, Deutschland)
	Pipettenspitze 200 µL, Low Retention Pipettenspitzen, BIO-CERT Liquid Handling Quality	732208	BRAND GmbH & Co.KG (Wertheim, Deutschland)
Reagenzreservoirs	Reagenzreservoir 100 mL, Einweg-Polystyrol	95128085	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
	Reagenzreservoir 25 mL mit Unterteiler, Einweg-Polystyrol	95128095	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
	Bio-Pure Pipettierbehälter 25 mL, Einweg-Polyethylenterephthalat	Z680354	Biopure Corporation (Cambridge, MA, USA)

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Bestell- bzw. Seriennummer	Hersteller
Reaktionsgefäße	Protein LoBind Tubes, PCR clean, 0,5 mL	0030108094	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
	Protein LoBind Tubes, PCR clean, 1,5 mL	0030108116	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
	Protein LoBind Tubes, PCR clean, 2 mL	0030108132	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
	Protein LoBind Tubes, PCR clean, 5 mL	0030108302	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
	UZ-Reaktionsgefäß 1,5 mL, Polypropylene Tube with Snap-on Cap	357448	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Reinigungstücher	Kimtech Science Reinigungstücher, Präzisionstücher, weiß, fusselfrei	7552	Kimberly-Clark Corporation (Irving, TX, USA)
	Linsenpapier, Spezialpapier zur Reinigung von optischem Glas	41019	Karl Hecht GmbH & Co.KG (Sondheim vor der Rhön, Deutschland)
Spritzen	Dispomed Einmalspritzen TBC / Heparin, 1 mL	22006	DISPOMED GmbH & Co.KG, (Geinhausen, Deutschland)
	Spritze 5 mL mit LuerLock-Steckanschluss, steril	002022520F	PentaFerte Italia Srl (Campli, Italien)
	Spritze 10 mL mit LuerLock-Steckanschluss, steril	002022620F	PentaFerte Italia Srl (Campli, Italien)
	Spritze 30 mL mit LuerLock-Steckanschluss, steril	002022820F	PentaFerte Italia Srl (Campli, Italien)
Zentrifugenröhrchen	Zentrifugationsröhrchen, Falcon 15 mL, High Clarity Polypropylene Centrifuge Tube, Conical Bottom, Sterile	352196	Corning Inc. (Corning, NY, USA)
	Zentrifugationsröhrchen, Falcon 50 mL, High Clarity Polypropylene Centrifuge Tube, Conical Bottom, Sterile	352098	Corning Inc. (Corning, NY, USA)
Zentrifugensäule	Pierce Zentrifugensäulen, 2 mL	89896	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)

Anhang 3 – Verwendete Gerätschaften und Glasware. Die Funktionstüchtigkeit der Pipetten wurden vor Beginn der Laborarbeit und mindestens zweimal pro Jahr intern überprüft.

Bezeichnung	Gerät	Seriennummer	Hersteller
Autoklaven	3150EL	2201012	Systec GmBH (Linden, Deutschland)
	Systec DX-150	D2686	Systec GmBH (Linden, Deutschland)
	Systec DX-45	DX30008	Systec GmBH (Linden, Deutschland)
Eismaschine	Scotsman Flockeneisbereiter AF 100	AF 100 AS 230/50/1	Scotsman Ice Srl (Mailand, Italien)
Glasware	Exsikkator mit Ventil NS 24/29, 200 mm DIN	DI607435263913 15	Dinkelberg Analytics GmbH & Co.KG (Gablingen, Deutschland)
	Kristallisierschale DURAN mit Ausguss, 20 mL, 40 mm	C091.1	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe, Deutschland)
Heizschrank	Trocken- und Wärmeschrank mit Umluft FD 115/E2	FD 115/E2 #00-12588	BINDER GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
Kühl- und Gefrierschränke	Kühlschrank 4 °C, LKUexv 1610 MediLine	825912038, 825973435, 826034227	Liebherr-Hausgeräte GmbH (Ochsenhausen, Deutschland)
	Gefrierschrank -20 °C, LKU 3910 MediLine	826010986 825988538	Liebherr-Hausgeräte GmbH (Ochsenhausen, Deutschland)
	Ultragefrierschrank -80 °C, UF V 700	12-11414	BINDER GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
Laborabzug & Sicherheitswerk-bänke	Niedrigraumabzug CC-30	L/1/TA15-AL/R/02/06	Casper & Co. Labora GmbH (Aachen, Deutschland)
	Sicherheitswerkbank HeraSafe KS 18	40461435	Kendro Laboratory Products GmbH (Langenselbold, Deutschland)

Bezeichnung	Gerät	Seriennummer	Hersteller
	Sicherheitswerkbänke UVF 10.23 S/HR	1235213	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH (Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland)
Magnetrührer	Magnetrührer 3001 K	Ser080152637	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG (Schwabach, Deutschland)
	Magnetrührer mit Heizung, Keramikplatte, C-MAG HS 10 digital	07.447543	IKA-Werke GmbH & Co.KG (Staufen, Deutschland)
Mikroskope	Transmissionselektronenmikroskop Zeiss Libra 120 TEM	437033	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
	TIRF-Mikroskop		
	Mikroskop: Leica DMI 600B	362719	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
	TIRF-Modul: Leica AM TIRF	345339	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
	Kamera: Hamamatsu A3472	9Y0722	Hamamatsu Photonics (Präfektur Shizuoka, Japan)
	Laserbox: Leica AM TIRF MC	374138	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Mikrotiterplatten-Waschroboter	405 LS Microplate Washer	1309255	BioTek Instruments Inc. (Winooski, VT, USA)
pH-Meter	Quattro pH-Meter MP220	216368	Mettler-Toledo GmbH (Gießen, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf Research Plus, mechanische Pipette 1000 µL	K18887D, I33273G	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
	Eppendorf Research Plus, mechanische Pipette 200 µL	K19864F, H40711G	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
	Eppendorf Research Plus, mechanische Pipette 20 µL	K30577F, I23556G	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
	Eppendorf Research Plus, mechanische Pipette 5 mL	Q28842C, I36262F	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)

Bezeichnung	Gerät	Seriennummer	Hersteller
Pipetten	Eppendorf Research Plus, mechanische Pipette 5 mL	Q28842C, I36262F	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
	Eppendorf Research Plus, mechanische 12-Kanal-Pipette 10-100 µL	H37573E, O58806I, O58771I	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
	Xplorer Plus, elektrische Pipette 5-100 µL	P15050F, P15045F, Q12999J, O12860J	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
	Elektrische Pipettierhilfe, PIPETBOY acu 2	1707579	Integra Biosciences (Biebertal, Deutschland)
Pipettierroboter	Microlab Star	6765	Hamilton Bonaduz AG (Bonaduz, Schweiz)
Reinstwasser-Anlage	Millipore Reinstwasseranlage, Milli-Q IQ7000	F9MA86276B	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
	RiOs Essential 5 Wasseraufbereitungssystem	F2EA12746C	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
Schüttel- und Mischgeräte	Reaktionsgefäß Schüttler- und Mischgerät, Vortex-Genie2	G560E	Scientific Industries Inc (Bohemia, NY, USA)
	Taumelrollenmischer CAT RF5-6	710173	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH (Ballrechten-Dottingen, Deutschland)
	ThermoMixer C	5382CN002268	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
Sicherheits-schrank	HSC UTS ERGO Line Typ 90	104457	Düperthal Sicherheitstechnik GmbH & Co.KG (Karlstein, Deutschland)
	CLASSIC line, Typ 90	111759	Düperthal Sicherheitstechnik GmbH & Co.KG (Karlstein, Deutschland)
Spektral-photometer	UV-Spektrophotometer UV-1800	206-25400-59	Shimadzu (Präfektur Kyōto, Japan)

Bezeichnung	Gerät	Seriennummer	Hersteller
Ultraschallsonde	Ultraschall-Homogenisator Mini20, Sonopuls	3648.00075455.005	Bandelin Electronic GmbH & Co.KG (Berlin, Deutschland)
Ultraschall-wasserbad	Ultrasonic Cleaner USC – THD/HF	USC 300-THD/HF	VWR International, LLC (Radnor, PA, USA)
Vakuumpumpen	LABOPORT Membran-Vakuumpumpe N810.3FT.18	309577/026366	KNF DAC GmbH (Hamburg, Deutschland)
Waagen	Präzisionswaage PCB 350-3	WD130033259	Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern, Deutschland)
	Analytische Waage Secura 225D-1CEU	34706289	Sartorius GmbH (Göttingen, Deutschland)
Zentrifugen	Mikrozentrifuge, Centrifuge 5427 R	5409EI603454	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
	Tischzentrifuge, Centrifuge 5804 R	S805CQ065090	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
	Mini-Zentrifuge mit Standardrotor ROTILABO	063131	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe, Deutschland)
	Ultrazentrifuge Optima MAX-XP	CTZ14D06	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Zentrifugen-konzentrator	Concentrator 5301	5301 000335	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)

Anhang 4 – Verwendete Chemikalien und Lösungen.

Bezeichnung	Reinheit [%]	CAS	Bestell-nummer	Hersteller
10x PBS	k.A.	k.A.	D1408	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
10x TBS	k.A.	k.A.	42596.01	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
2-Mercaptoethanol	≥99	60-24-2	M6250	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
6-Maleimidohexansäure	k.A.	55750-53-3	AB393069	abcr GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumhydroxid	30	1336-21-6	221228	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
APTES	99	919-30-2	440140	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
BSA, Fraktion V pH 7,0	≥98	9048-46-8	A1391	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Casein	≥95	9000-71-9	218682	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DMF	99,8	68-12-2	227056	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
DMSO	99,9	67-68-5	D5879	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
EDC	98	25952-53-8	161462	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Essigsäure	99	64-19-7	A3701	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol (EtOH)	≥99,8	64-17-5	9065.4	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe, Deutschland)
Fluoreszenzfarbstoff Succinimidyl Ester CF633	k.A.	k.A.	SCJ4600039	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Fluoreszenzfarbstoff Succinimidyl Ester CF488A	k.A.	k.A.	SCJ4600018	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
HFIP	≥99	920-66-1	8045150100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Immersionsöl, Type F	k.A.	195371-10-9	11944399	Leica Biosystems (Wetzlar, Deutschland)
Immersionsöl, 518F	k.A.	63449-39-8	444960-0000-000	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Magermilchpulver	k.A.	68514-61-4	A0830	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
MES	≥99	145224-94-8	6066.4	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe, Deutschland)
$NaHCO_3$	≥99,5	144-55-8	6885.1	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe, Deutschland)
Na_2EDTA	≥99	6381-92-6	A2937	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Bezeichnung	Reinheit [%]	CAS	Bestell-nummer	Hersteller
Natriumazid	99	26628-22-8	A1430	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid	≥98	1310-73-2	S5881	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
NHS	98	6066-82-6	130672	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
PEG (MW 3400 Da)	k.A.	k.A.	144-27	Laysan Bio Inc. (Arab, AL, USA)
Polyacrylamid-Bead-Suspension Bio-Gel P-30	k.A.	25034-58-6	1504154	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
ProClin 300	k.A.	k.A.	48912-U	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Salzsäure	32	7647-01-0	6331.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SmartBlock	k.A.	k.A.	113 125	Candor Bioscience GmbH (Wangen im Allgäu, Deutschland)
The Blocking Solution	k.A.	k.A.	110 050	Candor Bioscience GmbH (Wangen im Allgäu, Deutschland)
TEOS	98	78-10-4	86578	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Toluol	99,8	108-88-3	244511	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tris(2-carboxyethyl) phospinhydrochlorid (TCEP)	99	51805-45-9	AB121644	abcr GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Tween20	k.A.	9005-64-5	A4974	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Anhang 5 – Einfluss der nicht-kovalenten Immobilisierung der Capture-Antikörper auf sFIDA Readouts und Signal-Rausch-Verhältnis der Aβ1-15 SiNaPs (A) und der synthetischen Aβ1-42 Aggregate (B). Die Immobilisierung der Antikörper erfolgte nicht-kovalent über intermolekulare Kräfte. Für die Quantifizierung der Spezifität wurden Wells zusätzlich ohne Capture-Antikörper inkubiert. Für die Berechnung der sFIDA Readouts wurde ein Intensitätsschwellenwert von 0,1% bezogen auf die verwendete Pufferkontrolle angewandt. Anschließend wurden das Signal-Rausch-Verhältnis sowie die prozentuale Signalreduzierung bei Abwesenheit von Capture-Antikörpern der jeweiligen Analytkonzentration kalkuliert.

A

SiNaPs [fM]	sFIDA Readouts		Signal-Rausch-Verhältnis		Signal-reduzierung [%]
Capture	**+**	**-**	**+**	**-**	
0	2,9	2,7	1,0	1,0	-
1,03	22,3	3,7	7,5	1,4	83,3
10,26	105,4	4,6	35,6	1,7	95,6
102,6	770,2	406,9	260,2	149,6	47,2
1026	7636,9	1269,9	2580,1	466,9	83,4
10.260	94.042,4	251,7	31.771,1	92,6	99,7
		Mittelwert	**6930,9**	**142,4**	**81,8**

B

Aggregate [nM]	sFIDA Readouts		Signal-Rausch-Verhältnis		Signal-reduzierung [%]
Capture	**+**	**-**	**+**	**-**	
10	530,6	11,5	179,3	4,2	97,8
100	2948,7	86,9	996,2	32,0	97,1
1000	26.334,3	823,4	8896,7	302,7	96,9
		Mittelwert	**3357,4**	**113,0**	**97,3**

Anhang 6 – Einfluss der kovalent immobilisierten Capture-Antikörper auf sFIDA Readouts und Signal-Rausch-Verhältnis der Aβ1-15 SiNaPs (A) und der synthetischen Aβ1-42 Aggregate (B). Die Immobilisierung der Antikörper erfolgte kovalent über PEG als Spacer-Molekül. Für die Quantifizierung der Spezifität wurden Wells zusätzlich ohne Capture-Antikörper inkubiert. Für die Berechnung der sFIDA Readouts wurde ein Intensitätsschwellenwert von 0,1% bezogen auf die verwendete Pufferkontrolle angewandt. Anschließend wurden das Signal-Rausch-Verhältnis sowie die prozentuale Signalreduzierung bei Abwesenheit von Capture-Antikörpern der jeweiligen Analytkonzentration kalkuliert.

A

SiNaPs [fM]	sFIDA Readouts		Signal-Rausch-Verhältnis		Signal-reduzierung [%]
Capture	**+**	**-**	**+**	**-**	
0	2,8	4,8	1,0	1,0	-
1,03	10,7	4,7	3,8	0,99	56,0
10,26	108,4	3,1	38,3	0,65	97,2
102,6	822,8	28,7	290,7	6,02	96,5
1026	8925,3	574,2	3153,8	120,6	93,6
10.260	107.843	5073,6	38.107,1	1065,8	95,3
		Mittelwert	**8318,7**	**238,8**	**87,7**

B

Aggregate [nM]	sFIDA Readouts		Signal-Rausch-Verhältnis		Signal-reduzierung [%]
Capture	**+**	**-**	**+**	**-**	
10	580,2	59,8	205,0	12,6	89,7
100	3359,3	241,3	1187,0	50,7	92,8
1000	27.853,3	3550,5	9842,1	745,9	87,3
		Mittelwert	**3744,7**	**269,7**	**89,9**

Anhang 7 – Einfluss des Coating-Puffers auf die sFIDA Readouts und das Signal-Rausch-Verhältnis der Aβ1-15 SiNaPs (A) und der synthetischen Aβ1-42 Aggregate (B). Für die Berechnung der sFIDA Readouts wurde ein Intensitätsschwellenwert von 0,1% bezogen auf die verwendete Pufferkontrolle angewandt. Anschließend wurden das Signal-Rausch-Verhältnis der jeweiligen Analytkonzentration berechnet. Die Variante mit dem höchsten Signal-Rausch-Verhältnis bezogen auf die jeweilige Analytkonzentration wurden grün markiert. Zusätzlich wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson sowohl für Aβ1-15 SiNaPs und synthetische Aβ1-42 Aggregate berechnet und unter den sFIDA Readouts verzeichnet.

A

SiNaPs [fM]	sFIDA Readouts			Signal-Rausch-Verhältnis		
	0,1 M MES	1x PBS	0,1 M $NaHCO_3$	0,1 M MES	1x PBS	0,1 M $NaHCO_3$
0	1,7	2,4	1,6	-	-	-
1,03	6,9	9,7	6,8	4,1	4,1	**4,35**
10,26	56,9	84,4	108,6	33,7	25,6	**69,6**
102,6	462,1	522,3	634,9	273,4	220,4	**406,9**
1026	3949,4	6048,6	7962,9	2336,9	2552,1	**5104,4**
10.260	40.929,1	62.785,9	87.348,7	24.218,4	26.491,9	**55.992,8**
Pearson r	**0,999**	**0,999**	**0,999**			

B

Aggregate [nM]	sFIDA Readouts			Signal-Rausch-Verhältnis		
	0,1 M MES	1x PBS	0,1 M $NaHCO_3$	0,1 M MES	1x PBS	0,1 M $NaHCO_3$
10	164,8	338,9	502,6	97,5	143,0	**322,2**
100	1727,4	2731,8	3366,1	1022,1	1152,7	**2157,8**
1000	7069,8	14.859,1	20.316,7	4183,3	6269,7	**13.023,5**
Pearson r	**0,991**	**0,997**	**0,999**			

Anhang 8 – Vergleich der Coating-Varianten durch Normalisierung der berechneten Werte zur Signalsteigerung von Aβ1-15 SiNaPs (A) und synthetischen Aβ1-42 Aggregate (B). Hierzu wurden die kalkulierten Werte aus Tabelle 15 der beiden Testvarianten (MES, PBS) durch die Referenzvariante (Natriumhydrogencarbonat) dividiert und der Mittelwert berechnet. Ergebnisse innerhalb des Toleranzbereichs von ± 20% wurden grün markiert.

A

	O/E [%]	
SiNaPs [fM]	**MES**	**PBS**
1,03	**95**	**94**
10,26	48	51
102,6	67	54
1026	46	47
10.260	43	48
Mittelwert	**60**	**59**

B

	O/E [%]	
Aggregate [nM]	**MES**	**PBS**
10	30	44
100	47	53
1000	32	48
Mittelwert	**37**	**49**

Anhang 9 – Einfluss der Capture-Konzentration auf das Hintergrundrauschen der jeweiligen Assay-Variante in Anbetracht des Cut-offs (0,1% basierend auf der ebenfalls applizierten Pufferkontrolle). Kanal 00: Anregungswellenlänge 635 nm, Emissionswellenlänge 705 nm; Kanal 01: Anregungswellenlänge 488 nm, Emissionswellenlänge 525 nm.

Variante	Capture-Konzentration [µg/mL]	Kanal 00	Kanal 01
V1	0	11.812	10.878
V2	0,625	11.426	10.368
V3	1,25	11.467	10.674
V4	2,5	11.596	10.915
V5	5,0	11.796	11.326
V6	7,5	11.853	11.553

Anhang 10 – Einfluss der BSA-Konzentration auf die Signalreduzierung der Capture-Kontrolle für Aβ1-15 SiNaPs und synthetische Aβ1-42 Aggregate.

	Signalreduzierung der Capture-Kontrolle [%]				
BSA Konzentration [%]	**0**	**0,5**	**1**	**3**	**5**
Aβ1-15 SiNaPs	99,8	99,9	99,9	99,9	99,7
Aβ1-42 Aggregate	98,0	98,9	99,0	98,4	98,9

Anhang 11 – Einfluss von Additiven im Probenpuffer auf das Signal-Rausch-Verhältnis der Aβ1-15 SiNaPs (oben) und der synthetischen Aβ1-42 Aggregate (unten). Vergleichen wurden 1x PBS (V1) mit 1x PBS + 0,5% BSA (V2) sowie 1x PBS + 0,5% BSA + 0,05% Tween20 (V3). Für die Berechnung der sFIDA Readouts wurde ein Intensitätsschwellenwert von 0,1% bezogen auf die verwendete Pufferkontrolle angewandt. Anschließend wurden das Signal-Rausch-Verhältnis der jeweiligen Analytkonzentration berechnet. Die Variante mit dem höchsten Signal-Rausch-Verhältnis bezogen auf die jeweilige Analytkonzentration wurden grün markiert. Zusätzlich wurde der Faktor der Signalsteigerung im direkten Vergleich mit der Referenzvariante V1 berechnet und als Mittelwert angegeben.

SiNaPs [fM]	Signal-Rausch-Verhältnis			Faktor der Signalsteigerung	
	V1	V2	V3	V2/V1	V3/V1
0,1	13,5	11,5	**153,9**	0,9	11,4
1,03	22,5	34,4	**206,6**	1,5	9,2
10,26	41,4	76,2	**411,0**	1,8	9,9
102,6	125,4	587,0	**1086,1**	4,7	8,7
1026	1086,8	5049,6	**8745,3**	4,7	8,0
			Mittelwert	**2,7**	**9,4**

Aggregate [nM]	Signal-Rausch-Verhältnis			Faktor der Signalsteigerung	
	V1	V2	V3	V2/V1	V3/V1
0,01	2,0	5,7	**10**	2,8	4,9
0,1	1,9	9,7	**29,6**	5,2	15,8
1	12,8	25,6	**233,6**	2,0	18,2
10	30,1	305,7	**1524,3**	10,1	50,6
100	371,1	1675,9	**40.301,5**	4,5	108,6
			Mittelwert	**4,9**	**39,6**

Anhang 12 – Einfluss der Detektionssondenkombination auf das Signal-Rausch-Verhältnis der Aβ1-15 SiNaPs (oben) und der synthetischen Aβ1-42 Aggregate (unten). Verglichen wurden Nab228 CF633 + 6E10 AF488 (V1, Referenz) mit IC16 CF633 + 6E10 AF488 (V2) sowie IC16 CF633 + Nab228 CF488A (V3). Für die Berechnung der sFIDA Readouts wurde ein Intensitätsschwellenwert von 0,1% bezogen auf die verwendete Pufferkontrolle angewandt. Anschließend wurden das Signal-Rausch-Verhältnis der jeweiligen Analytkonzentration berechnet. Die Variante mit dem höchsten Signal-Rausch-Verhältnis bezogen auf die jeweilige Analytkonzentration wurde grün markiert. Zusätzlich wurde der Faktor der Signalsteigerung im direkten Vergleich mit der Referenzvariante V1 berechnet und als Mittelwert angegeben.

SiNaPs [fM]	Signal-Rausch-Verhältnis			Faktor der Signalsteigerung	
	V1	V2	V3	V2/V1	V3/V1
1,03	1,3	2,0	**2,9**	1,5	2,2
10,26	4,8	5,2	**38,5**	1,1	8,0
102,6	36,8	109,5	**326,3**	2,9	8,9
1026	681,8	1036,2	**3147,1**	1,5	4,6
10260	9025,4	19.617,4	**45.684,1**	2,2	5,1
			Mittelwert	**1,8**	**5,7**

Aggregate [nM]	Signal-Rausch-Verhältnis			Faktor der Signalsteigerung	
	V1	V2	V3	V2/V1	V3/V1
0,01	2,18	1,53	**5,48**	0,7	2,5
0,1	2,55	4,10	**31,62**	1,6	12,4
1	12,98	35,9	**480,15**	2,8	37,0
10	364,91	2508,7	**34.706,2**	6,9	95,1
100	93.985,5	264.647,5	**361.005,1**	2,8	3,8
			Mittelwert	**2,9**	**30,2**

Weitere Informationen zu Kapitel 4

Anhang 13 – Weitere Informationen zu Kapitel 4.1

Pils et al. Development and Implementation of an Internal Quality Control Sample to Standardize Oligomer-Based Diagnostics of Alzheimer's Disease

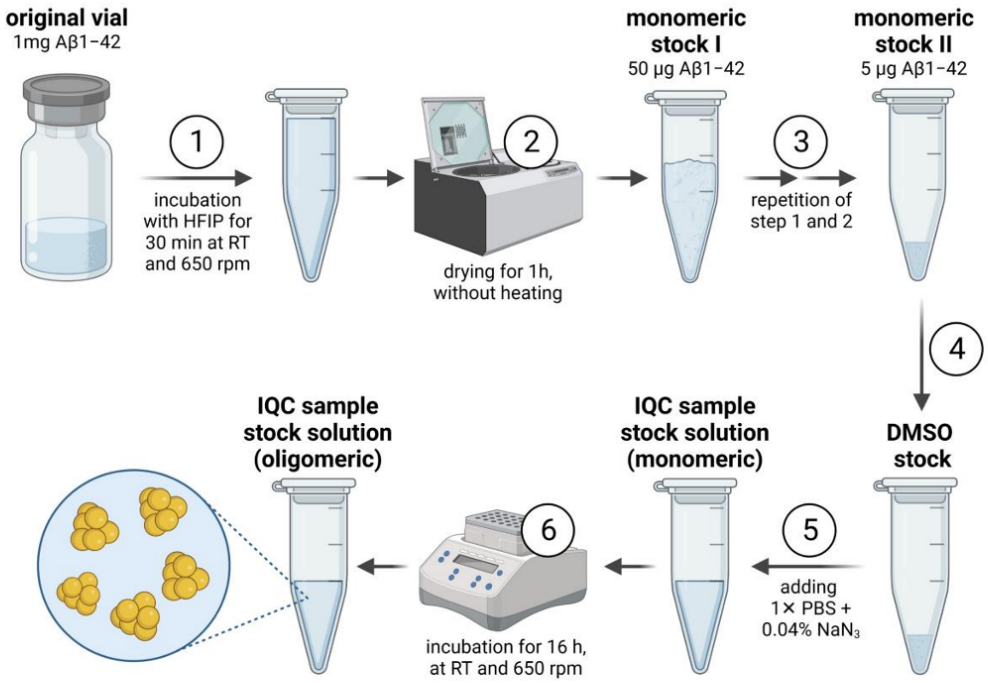


Figure S1. Scheme of monomerization and oligomerization procedure. Step 1: 1 mg Aβ1−42 is dissolved 550 µl HFIP for 1 h at RT with mixing at 650 rpm. The original sample tube is rinsed with an additional 550 µl HFIP, and the combined sample is divided into twenty aliquots containing 50 µg Aβ1−42. Step 2: aliquots are transferred to a SpeedVac and dried for ~1 h without heating until all HFIP and H_2O are removed. Step 3: the initial amount of Aβ1−42 is reduced by dissolving 50 µg Aβ1−42 with 550 µl HFIP and dividing this sample into ten aliquots containing 5 µg Aβ1−42. These aliquots are dried using a SpeedVac. Step 4: for oligomerization, 5 µg Aβ1−42 is dissolved in 5 µl DMSO, mixed briefly, centrifuged, and agitated for 10 min at RT and 650 rpm. Step 5: An IQC stock solution is prepared by adding 1× PBS containing 0.04% NaN_3. Step 6: the monomeric solution is mixed briefly, centrifuged and agitated for 16 h at 650 rpm and RT to promote oligomerization. Abbreviations: Aβ, amyloid-β; DMSO, dimethyl sulfoxide; HFIP, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol; IQC, internal quality control; NaN_3, sodium azide; PBS, phosphate-buffered saline; RT, room temperature. Created with Biorender.com (accessed on 10 May 2023).

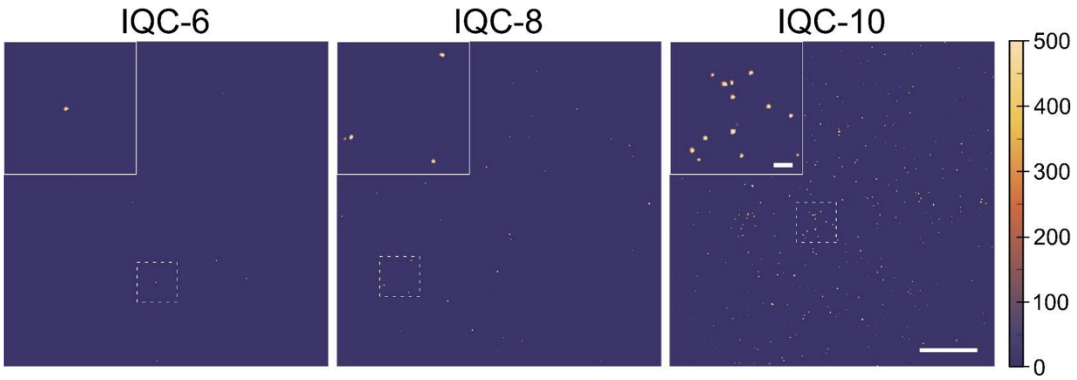


Figure S2. TIRFM-images of colocalized pixels of IQC-6, IQC-8 and IQC-10 samples with intensities above the blank control-based cutoff. The colocalized TIRFM images were created using a multi-step process. First, a global cutoff value was selected for each channel based on the blank control (0.05%). Only signals exceeding this value were considered in the consecutive analysis, enabling a distinction between signals and background noise, thereby increasing the measurement accuracy. In the next step, the matrices of both channels, representing the same area of a well, were used to create two supportive matrices. A binary matrix was generated that contains a one for all pixels whose intensity in both channel matrices is above the respective cutoff and a zero otherwise. The second matrix was the product of both channel matrices, which was scaled to the original range of values by dividing through by the maximum possible intensity value. The cutoffs were considered by multiplying the two generated supportive matrices, and the colocalization matrix for a distinct area of the well was created. For each image, a section was selected and enlarged (10×) to demonstrate differences in particle concentrations among the tested IQC samples. The color scaling was created using matlab2019b, where all pixels with an intensity equal to or higher than 500 were colored yellow. Scale bar image: 20 µm; scale bar enlarged image: 2 µm. Abbreviations: IQC, internal quality control; TIRFM, total internal reflection fluorescence microscopy.

Table S1. Individual sFIDA readouts, calibrated molar particle concentrations and CV% for each IQC sample. sFIDA readouts of each IQC sample were converted into femtomolar concentrations using the linear equation y = 5.08x – 0.25. Using the one-sided Mann-Whitney U test with a confidence interval of 5%, the molar particle concentrations of IQC samples that differed significantly from the next lower concentration were determined (marked green), and thus the lower limit of quantification (LLoQ, italic, *) and upper limit of quantification (ULoQ, italic, **) were identified. Observed sFIDA readouts are presented as the means of four replicates.

IQC sample	Monomer concentration [pM]	sFIDA readout	Particle concentration [fM]	CV%	One-sided Mann-Whitney U test *p*-value
IQC-1	0.01	0.7	0.18	61.3	0.1252
IQC-2	0.03	0.9	0.22	68.8	0.3429
IQC-3	0.1	1.6	0.36	73.3	*0.1714**
IQC-4	0.3	4.7	0.98	16.4	0.0286
IQC-5	1.0	15	3.0	15.7	0.0286
IQC-6	3.2	52	10.3	13.8	0.0143
IQC-7	10	130	25.7	24.1	0.0143
IQC-8	31.6	409	80.6	7.3	0.0143
IQC-9	100	1253	247	4.6	0.0143
IQC-10	316	4701	925	16.2	0.0143
IQC-11	1000	35,723	7031	7.7	0.0143
IQC-12	3162	351,702	69,219	23.3	0.0143
IQC-13	10,000	997,783	196,375	0.2	0.0143
IQC-14	31,622	1,000,000	196,812	0	*0.0143***
IQC-15	100,000	1,000,000	196,812	0	1

*LLoQ, ** ULoQ

Table S2. Calculation of the dilution linearity of Aβ oligomer-based internal quality control (IQC) samples within the working range. Data are presented as the means of four replicates. Molar particle concentrations were background corrected, and the percent dilution linearity of each IQC sample was calculated according to Equation (3). In addition, the average of all IQC samples (mean) was calculated. *IQC-14 was excluded from the analysis. Tolerance range: 80–120%.

IQC sample	Particle concentration [fM]	Particle concentration after background correction [fM]	Linearity [%]
IQC-3	0.36	0.22	84
IQC-4	0.98	0.84	93
IQC-5	3.0	2.9	89
IQC-6	10.3	10.2	126
IQC-7	25.7	25.5	100
IQC-8	80.6	80.5	103
IQC-9	247	247	84
IQC-10	925	925	42
IQC-11	7031	7031	32
IQC-12	69,219	69,219	111
IQC-13	196,375	196,375	316
IQC-14	196,812	196,812	316
		Mean	**107 | 109***
		Coefficient of determination	**0.73 | 0.99***

Table S3. Selectivity and recovery of the sFIDA assay to IQC-13. (**a**) sFIDA readouts of the IQC-13 sample were applied on different assay control setups, and the calculated percentage signal reduction was compared to the standard assay setup (normal). (**b**) Investigation of monomeric interference. (**c**) Influence of matrix effects on sFIDA readouts of the IQC-13 sample spiked in buffer or bovine CSF. Observed sFIDA readouts are presented as the means of four replicates. Using the one-sided Mann-Whitney U test with a confidence interval of 5%, the sFIDA readout of the respective assay control was compared to the readout of the standard assay setup. Abbreviations: CSF, cerebrospinal fluid; IQC, internal quality control.

(a)

Assay control setup	Observed sFIDA readout	Signal reduction [%]	One-sided Mann-Whitney U test *p*-value
Normal	941,271	-	-
Capture Control (CC)	37.27	100	0.0152
Autofluorescence control (AF)	0.77	100	0.0147
Cross-reactivity anti-Tau antibodies (Tau)	0.67	100	0.0152

(b)

Assay control setup	Observed sFIDA readout	Signal reduction [%]	One-sided Mann-Whitney U test *p*-value
Normal	941,271	-	-
Monomer control	15,231	98.38	0.0152

(c)

Assay control setup		Observed sFIDA readout	Signal reduction [%]	One-sided Mann-Whitney U test *p*-value	Signal-to-noise ratio IQC/blank
Blank	buffer	0.45	66.67	-	-
	CSF	0.15		0.002	-
Blank + IQC-13	buffer	997,783	0.21	-	2,217,295
	CSF	995,639		0.108	6,637,597

Table S4. Raw data used to generate Shewhart charts in Figure 5. Listed are the calibrated particle concentrations of 20 observations of each applied internal quality control (IQC) sample (IQC-6, IQC-8 and IQC-10) and the determined intra-assay variance described as CV%. The respective values were used to calculate the mean, standard deviation (SD) and upper/lower control (UCL/LCL) and action limits (UAL/LAL). Data from each observation represent the mean of four replicates.

	IQC-6		IQC-8		IQC-10	
Observation	**Particle concentration [fM]**	**CV%**	**Particle concentration [fM]**	**CV%**	**Particle concentration [fM]**	**CV%**
1	6.8	3.4	71.3	16.2	1397.7	24.2
2	11.1	18.5	106.8	19.9	1463.0	9.6
3	9.6	33.9	122.5	15.5	1585.6	16.5
4	11.6	10.2	116.3	24.4	1593.7	11.8
5	11.2	14.7	119.8	17.0	1638.6	20.3
6	7.6	36.2	81.4	20.8	1421.9	24.3
7	9.8	14.1	106.7	20.4	1439.7	22.6
8	9.0	11.0	110.1	15.3	1340.8	9.5
9	7.6	15.7	79.3	17.8	1276.4	20.6
10	8.4	22.9	100.7	27.6	1571.9	16.4
11	9.3	14.4	71.7	4.3	1309.4	11.8
12	8.8	29.6	104.3	25.1	1295.2	5.6
13	8.4	8.5	115.8	8.5	1520.7	32.0
14	9.5	8.4	142.3	7.9	1579.4	21.0
15	8.0	9.9	123.6	13.8	1476.9	21.9
16	6.1	8.7	103.1	18.8	1661.7	14.8
17	6.7	12.2	88.1	12.8	1356.5	12.6
18	6.8	19.5	111.2	14.2	1269.8	16.2
19	6.8	20.2	101.6	18.3	1064.7	10.8
20	6.4	12.1	130.3	10.6	1592.7	28.8
Mean	**8.5**		**105**		**1443**	
SD	**1.7**		**19**		**155**	
UCL	**11.8**		**144**		**1752**	
LCL	**5.1**		**67**		**1133**	
UAL	**13.5**		**163**		**1907**	
LAL	**3.5**		**48**		**978**	

Anhang 14 – Weitere Informationen zu Kapitel 4.2

Blömeke, Rehn, Kraemer-Schulien et al. Aβ oligomers peak in early stages of Alzheimer's disease preceding Tau pathology

Aβ oligomers peak in early stages of Alzheimer's disease preceding Tau pathology

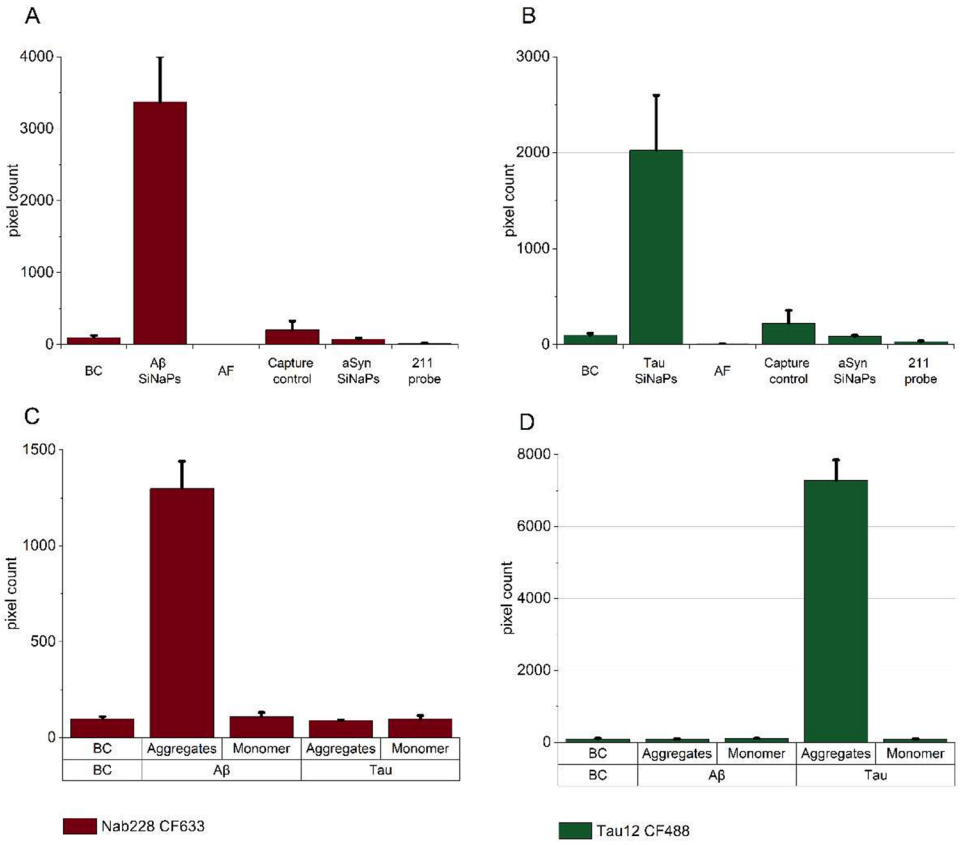
Supplementary Information

Authors: Lara Blömeke, Fabian Rehn, Victoria Kraemer-Schulien, Janine Kutzsche, Marlene Pils, Tuyen Bujnicki, Piotr Lewczuk, Johannes Kornhuber, Silka D. Freiesleben Luisa-Sophie Schneider, Lukas Preis, Josef Priller, Eike J. Spruth, Slawek Altenstein, Andrea Lohse, Anja Schneider, Klaus Fliessbach, Jens Wiltfang, Niels Hansen, Ayda Rostamzadeh, Emrah Düzel, Wenzel Glanz, Enise I. Incesoy, Michaela Butryn, Katharina Buerger, Daniel Janowitz, Michael Ewers, Robert Perneczky, Boris-Stephan Rauchmann, Stefan Teipel, Ingo Kilimann, Doreen Goerss, Christoph Laske, Matthias H. Munk, Carolin Sanzenbacher, Annika Spottke, Nina Roy-Kluth, Michael T. Heneka, Frederic Brosseron, Michael Wagner, Steffen Wolfsgruber, Luca Kleineidam, Melina Stark, Matthias Schmid, Frank Jessen, Oliver Bannach, Dieter Willbold, Oliver Peters

Supplementary Table 1. Mean coefficient of variation (CV%) values of the SiNaPs and the samples over the four replicates for Aβ and Tau.

	Aβ		Tau	
Experiment	SiNaPs [%]	Samples [%]	SiNaPs [%]	Samples [%]
1	15.6	15.6	13.5	10.4
2	11.2	12.8	10.8	8.6
3	14.8	12.0	12.7	8.5
4	12.1	13.0	10.7	9.8
5	15.6	12.0	17.1	13.7
6	10.5	11.5	8.9	9.2
7	14.3	13.3	15.0	11.2
8	15.0	13.8	12.7	9.7
9	12.3	13.9	12.0	8.7
10	12.5	14.2	9.6	8.0
11	18.2	12.7	14.5	8.9
12	12.3	11.4	10.2	7.2
13	10.5	13.0	9.5	6.6
14	17.6	13.5	11.3	8.9
15	12.1	12.8	9.9	7.1
16	14.5	11.9	12.4	8.4
Mean	13.7	13.0	11.9	9.1

Supplementary Fig. 1. Assay controls for measurement of Aβ (A, C) and Tau (B, D) oligomer levels.

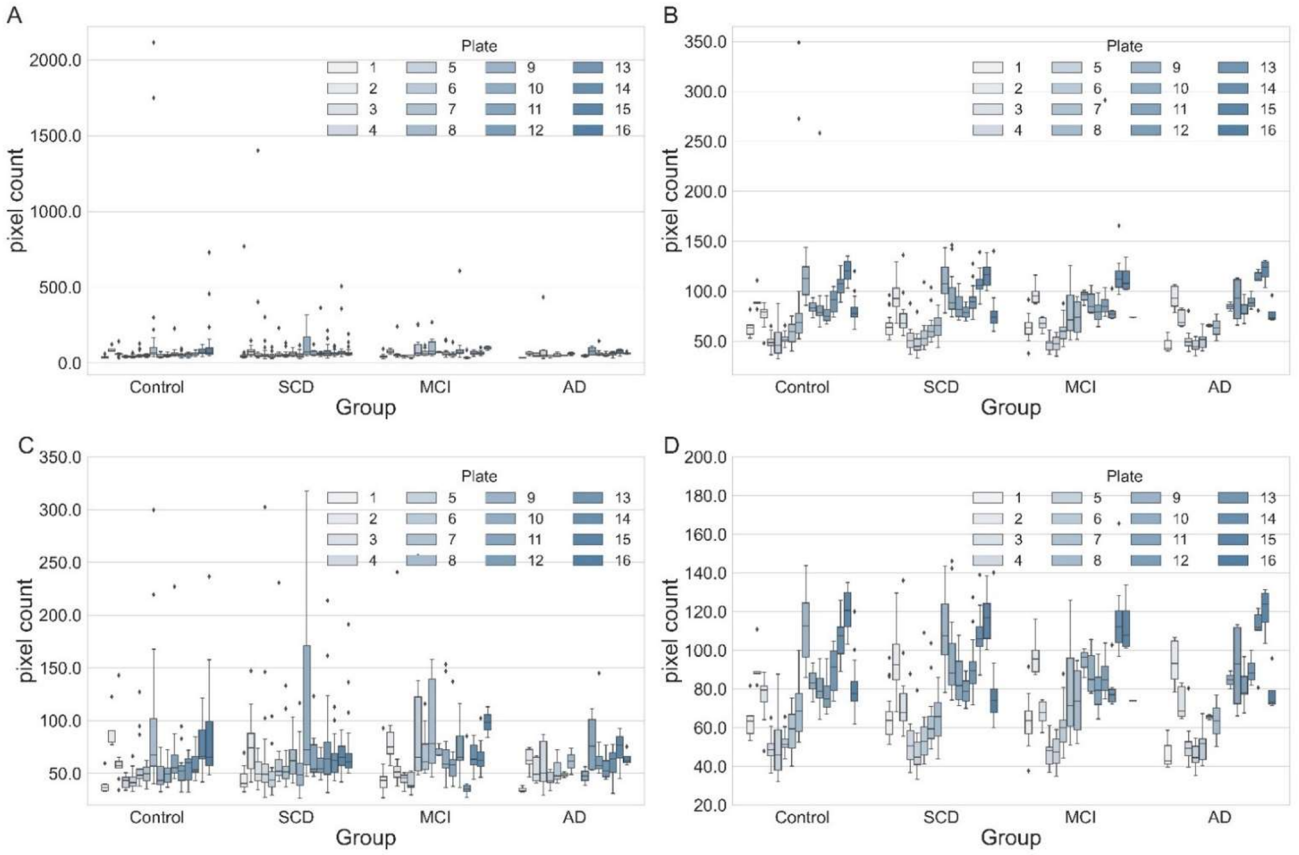


For Aβ (A) as well as for Tau (B), none of the assay components showed an autofluorescence signal (AF, signal < 0.1%). The signal of SiNaPs when leaving of the capture antibody was reduced to 2.8% for Aβ and 7.4% for Tau, respectively. When applying α-Synuclein (αSyn) SiNaPs or when detecting Aβ and Tau SiNaPs with an αSyn specific antibody (211), pixel counts were at blank control (BC) level. Recombinant Aβ aggregates of 1 nM (concentration depends on the monomer concentration) showed an increased fluorescence signal for detection with Nab228 CF633 (C), but were not detected with Tau12 CF488A (D). Likewise, Tau aggregates of 250 pM (concentration depends on the monomer concentration) were detected with Tau12 CF488A, but not with Nab228 CF633. Neither presence of monomeric Aβ nor the presence of monomeric Tau showed a fluorescence signal above the blank control when applied in the same concentration like the aggregates with a signal reduction by more than 99% compared to the same concentration of monomer units in aggregates. Standard deviation was determined across the four replicates

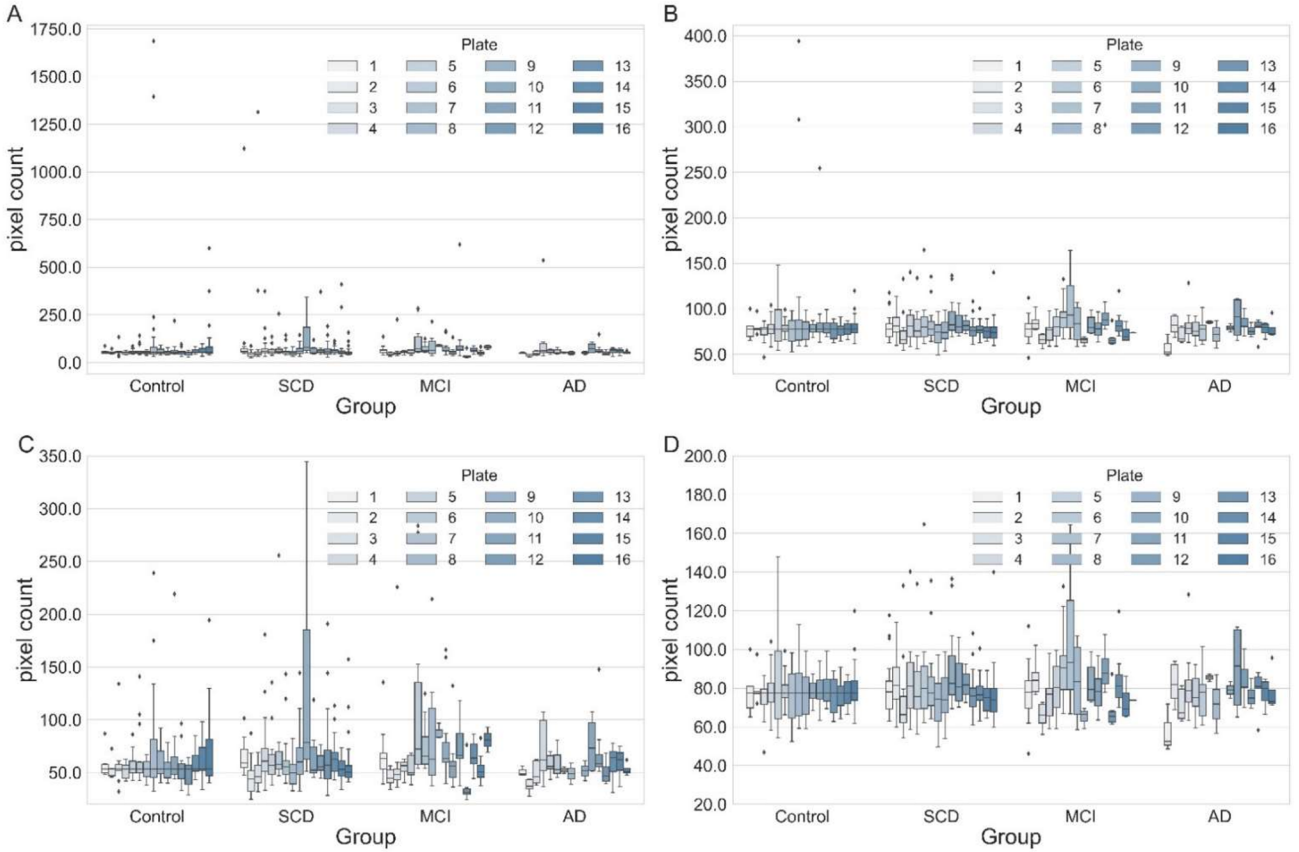
Supplementary Table 2. Scaling factors of the individual experiments for Aβ and Tau oligomer pixel counts used to perform scaling.

Experiment	Scale Factor Aβ	Scale Factor Tau
1	1.459	1.224
2	0.938	0.977
3	0.938	0.977
4	1.236	1.597
5	1.300	1.688
6	1.108	1.510
7	1.077	1.306
8	0.798	1.129
9	1.237	0.689
10	1.084	0.934
11	0.965	0.985
12	1.020	1.037
13	0.893	0.850
14	1.004	0.723
15	0.810	0.643
16	0.822	0.998

Supplementary Fig 2. Measured Aβ (A, C) and Tau (B, D) pixel counts before scaling. To increase readability, the y-axis was limited to the range between 20−350 for Aβ (C) and 20−200 for Tau (D). Especially for Tau considerable fluorescence fluctuations between the 16 individual plates can be observed. As the samples were applied in the blinded state, the distribution of the diagnostic groups on the plates is not uniform and consequently a distortion of statistical results could occur if values are used without scaling.



Supplementary Fig 3. Measured Aβ (A, C) and Tau (B, D) oligomer pixel counts after scaling. To increase readability, the y-axis was limited to the range between 20−350 for Aβ (C) and 20−200 for Tau. Since the fluorescence fluctuations between the individual plates are now reduced to an acceptable level, it is now possible to carry out statistical analyses without distorting the results.



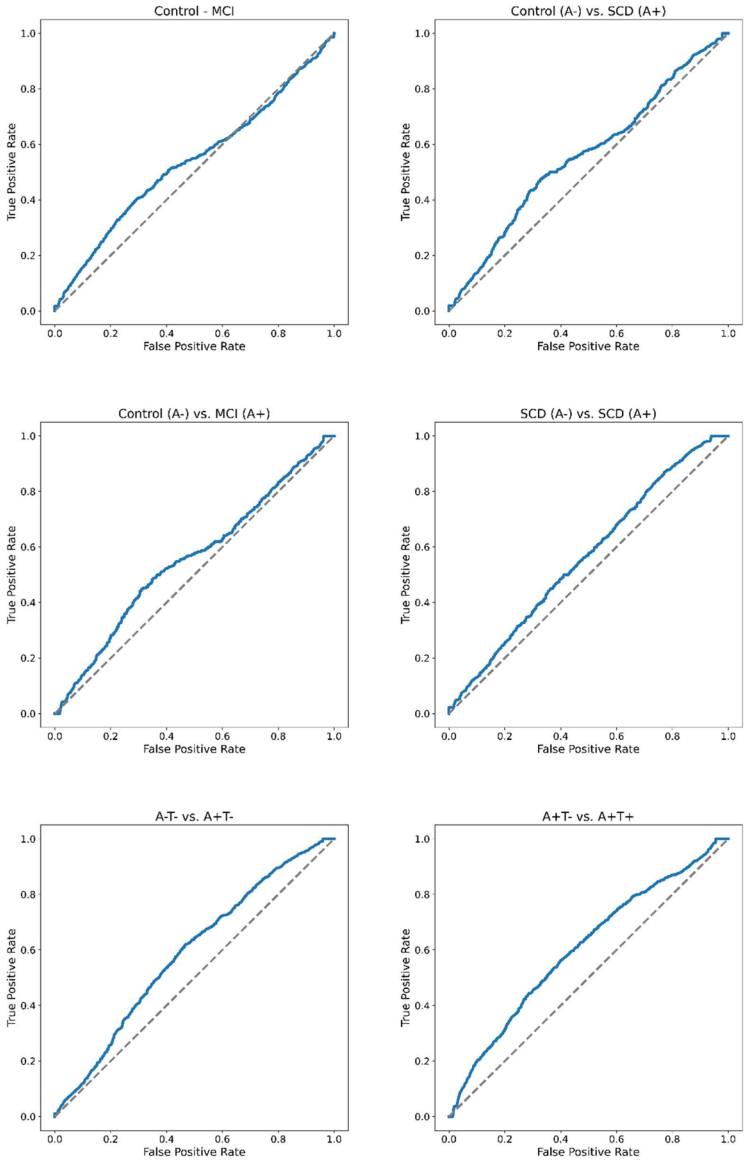
Supplementary Table 3. Effect size, among groups significantly differing from each other

Groups	Median Difference Ratio [%]
Control vs. MCI	8.57
Control [A-] vs. SCD [A+]	8.65
Control [A-] vs. MCI [A+]	13.26
SCD [A-] vs. SCD [A+]	5.06
A-T- vs. A+T-	9.31
A+T- vs. A+T+	-8.65

Supplementary Table. 4. Bootstrapped median AUC scores.

Groups	Bootstrapped median AUC score
Control vs. MCI	0.54
Control [A-] vs. SCD [A+]	0.56
Control [A-] vs. MCI [A+]	0.57
SCD [A-] vs. SCD [A+]	0.57
A-T- vs. A+T-	0.60
A+T- vs. A+T+	0.60

Supplementary Fig. 4. ROC-Curves of classifications between groups significantly differing from each other.



For all group pairs showing a significant difference according to Mann-Whitney-U a ROC-Curve and AUC-Score was calculated. To account for the variance and consequent uncertainty arising from a train-test split, a strictly stratified bootstrapping approach with N=500 was chosen, where for each iteration, a randomized subset of data was determined using random sampling with replacement. This subset was then divided into training and test sets, and a logistic regression was trained and used to classify the test data. For each of the N regressions, an ROC

curve and AUC were computed. Since the dispersion of the AUC scores was very high, the median of all scores was used to avoid the inclusion of outliers. To visualize a single curve, the FPR and TPR values were calculated for each of the N iterations, interpolated at intervals of 0.001 steps, and then the median of all N FPR values for each TPR value was computed.

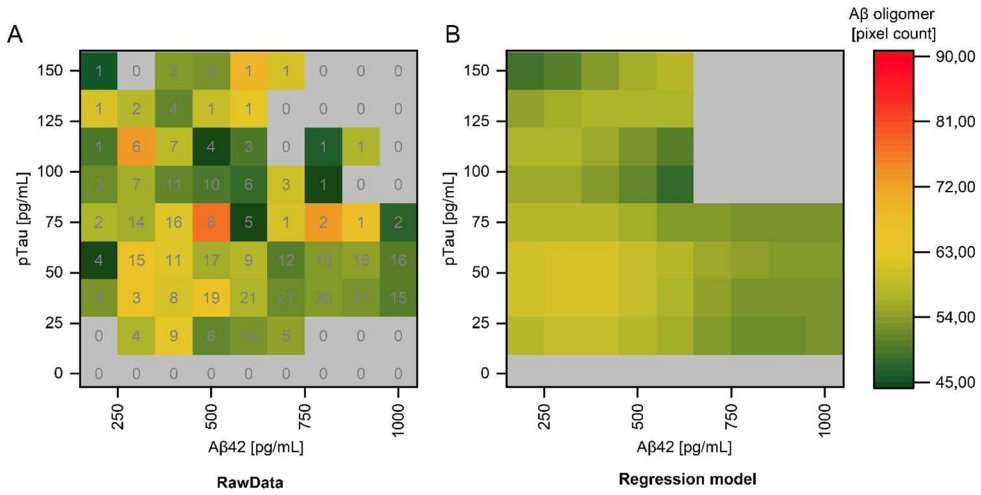
The AUC scores were found to be in a range between 0.54 and 0.57, which, while not particularly high, was not unexpected. This can be partly attributed to the considerable overlap among the groups, together with the illustrated progression of Aβ oligomers depicted in Figure 4. The values do not monotonically increase but instead reach their maximum in the SCD (ApoE4-) or MCI (ApoE4+) stage before subsequently decreasing. However, logistic regression, building the foundation of ROC analysis, need constantly increasing or decreasing levels over the disease progression and therefore cannot accurately depict the described development.

Supplementary Table 5. Regression Error

Model	nMAE
All Data	0.16
ApoeE4+	0.24
ApoE4-	0.15

The MAE was normalized by the standard deviation.

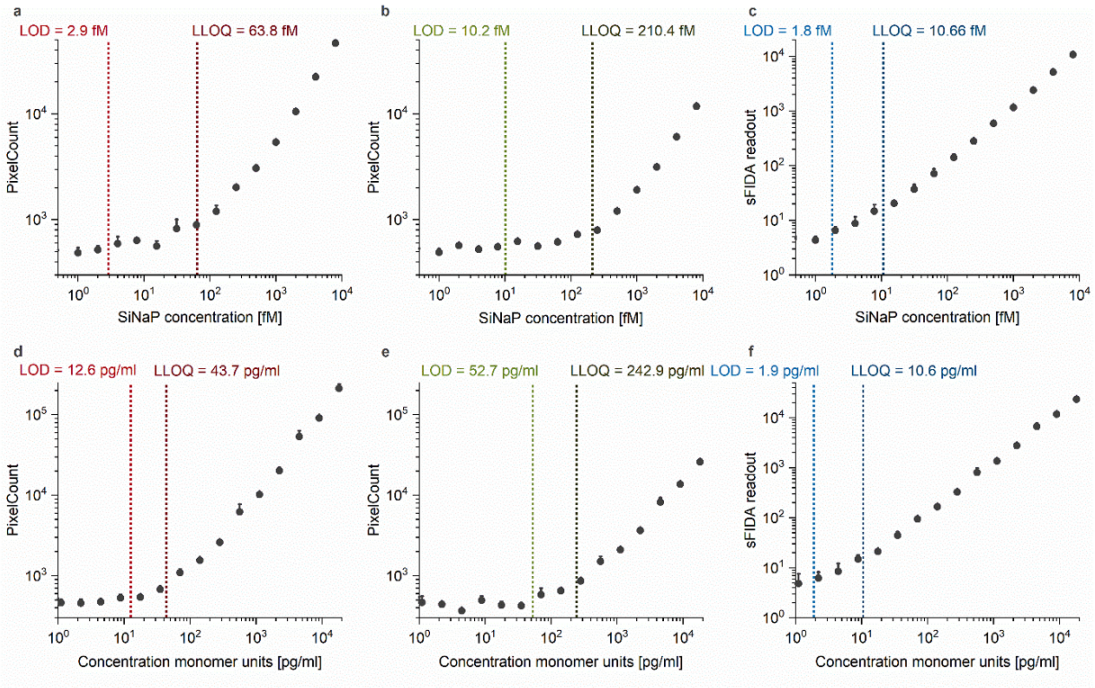
Supplementary Fig. 5. Binned Aβ oligomer pixel counts plotted as a function of Aβ42 and pTau concentrations.



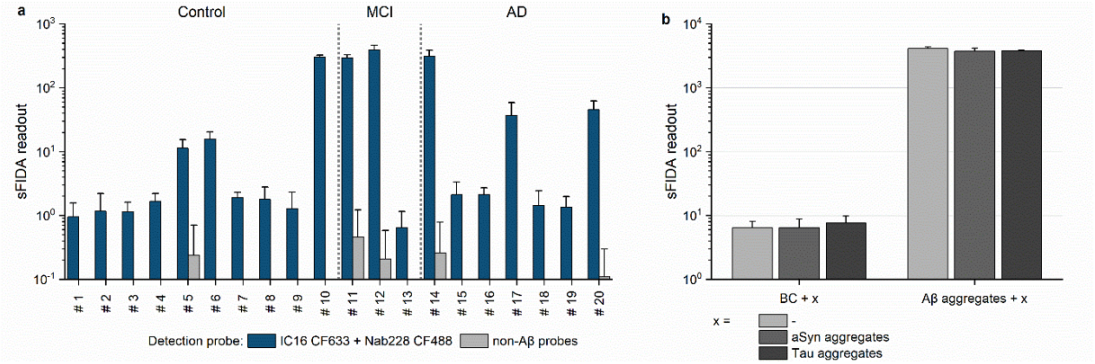
The heatmap shows a 2D plot with Aβ42 and pTau concentrations on the x any y axis, respectively. (A) measured Aβ oligomer pixel counts were binned and median oligomer pixel counts were plotted based on Aβ42 and pTau concentrations. Numbers in the squares represent the number of measurement points. (B) Results of the regression model were binned and plotted equal to (A). Highest Aβ oligomer pixel counts are found at low Aβ42 and pTau concentrations for the raw data as well as for the regression data.

Anhang 15 – Weitere Informationen zu Kapitel 4.3

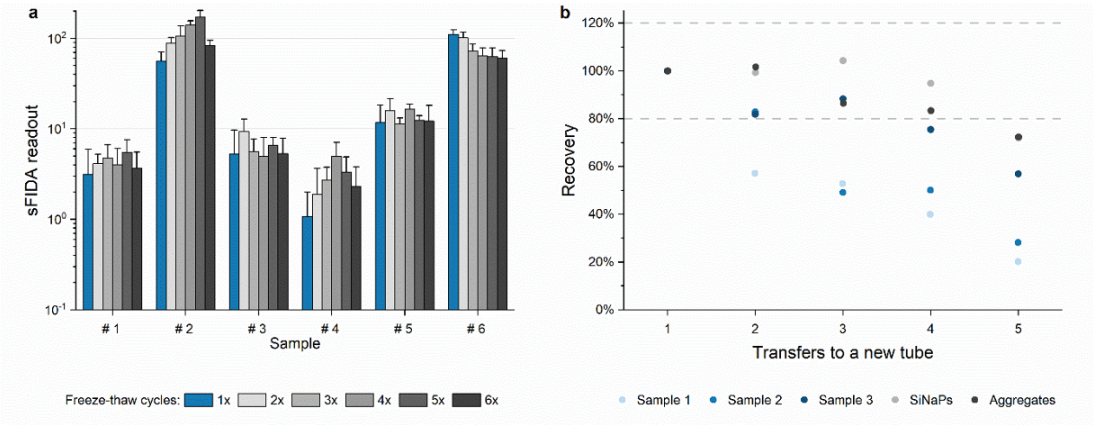
Blömeke et al. Blood-based quantification of Aβ oligomers indicates impaired clearance from brain in ApoE ε4 positive subjects



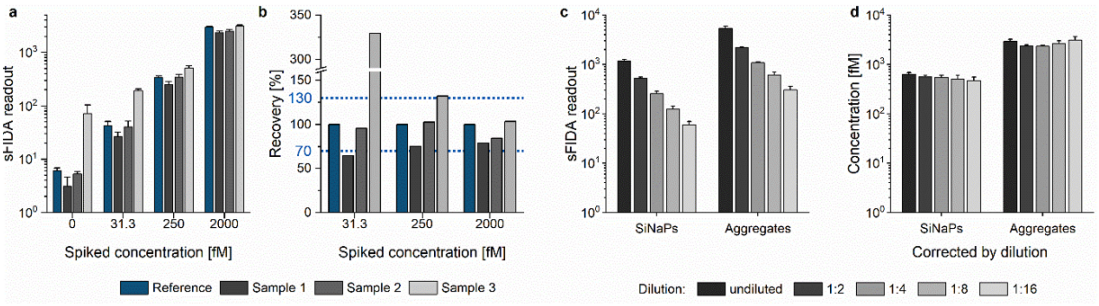
Supplementary Fig. 1 Linear dilution of $A\beta_{1-15}$ SiNaPs and $A\beta_{1-42}$ aggregates spiked in plasma. Shown are dilution series for $A\beta_{1-15}$ SiNaPs for the red (CF 633) (**a**) and green (CF488) (**b**) fluorescence channels, and the colocalization (**c**) and the corresponding limit of detection (LOD) and lower limit of quantification (LLOQ). Similarly, dilution series of synthetic $A\beta_{1-42}$ aggregates for the red (CF633) (**d**) and green (CF488) (**e**) fluorescence channels and colocalization (**f**) with calculated LOD and LLOQs are shown. The standard deviation was calculated across the four replicates. Please, note the logarithmic scale.



Supplementary Fig. 2 Assay controls with non-Aβ probes (a) and αSyn and Tau aggregates. a sFIDA readouts of the samples (#1 to #20) of the validation cohort for detection with anti-Aβ detection antibodies IC16 CF633 in combination with Nab228 CF488 (blue) and non-Aβ probes MOPC-21 CF633 in combination with 211 CF488 (grey). While the samples detected with anti-Aβ antibodies showed an sFIDA readout ranging from approximately 1 pixel to 500 pixels, the samples did not give a signal when detected with antibodies who do not recognize Aβ. **b** Neat plasma and 1 nM (18 ng/ml) Aβ aggregates (concentration based on the monomer unit concentration) were spiked with 1 nM of αSyn and Tau aggregates, respectively. Standard deviation was calculated across the four replicates. Please, note the logarithmic scaling.



Supplementary Fig. 3 Evaluation of freeze-thaw cycles (a) and influence of tube transfers (b). a Six patient plasma samples were thawed for 2 h at RT and then refrozen. The sFIDA readout for half of the samples remained unaffected (mean recovery 103%–129%), whereas additional freeze-thaw cycles caused an increase in the sFIDA readout for two samples and a decrease in the readout for one sample. Please, note the logarithmic scaling. Standard deviation is calculated across the four replicates. **b** After centrifugation, the supernatants of the plasma samples were transferred to a new tube (one transfer). One additional transfer reduced the sFIDA readout for the samples, whereas that of SiNaPs and recombinant aggregates remains constant for at least two additional transfers.



Supplementary Fig. 4 Recovery of SiNaPs in different matrices (a, b) and dilution of SiNaPs and aggregates spiked in plasma (c, d). a Three samples with an initial low (sample 1), medium (sample 2) and high concentration (sample 3) of Aβ oligomers were spiked with three different concentrations of SiNaPs to examine whether the recovery of SiNaPs is dependent on the individual plasma matrix. **b** The obtained sFIDA readouts were initially normalized with the non-spiked sample and then compared to the readout of the same concentration of SiNaPs in the reference plasma sample. Samples 1 and 2 showed a mean recovery of 73% and 94%, respectively. For sample 3, the lowest concentration of 31.3 fM was beyond the acceptable range (dashed blue line), whereas medium and high concentrations of SiNaPs spiked in sample 3 showed a mean recovery of 118%. Mean recovery of all samples and concentrations (except sample 3 spiked with a low concentration) was 92%. **c** SiNaPs and recombinant $A\beta_{1-42}$ aggregates were spiked in plasma and diluted two-fold with TBS. **d** After calibration and correction for dilution, calculated stock concentrations for SiNaPs and aggregates differed on average by 15.9% and 8.9%, respectively. Standard deviations are calculated across the four replicates. Please, note the logarithmic scaling in a, c and d.

Supplementary Table 1 Mean Spearman coefficient of correlation r of the bootstrapping analysis of Aβ oligomers in plasma with demographics and biomarkers in CSF and plasma (*p*-value of Spearman distribution * 0.01 – 0.05, ** *p*-value 0.001 – 0.01)

		Control/Relatives/SCD	MCI/AD
	Age	−0.100	0.047
	MMSE	−0.053	0.011
CSF	$A\beta_{1-40}$	−0.037	0.219*
	$A\beta_{1-42}$	0.103	0.236**
	$A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$	0.166*	0.196*
	tTau	−0.160*	0.023
	pTau	−0.203**	0.051
	Aβ Oligomers	0.186**	−0.217**
	Tau Oligomers	0.201**	−0.096
Plasma	$A\beta_{1-40}$	−0.067	0.148
	$A\beta_{1-42}$	−0.044	0.054
	$A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$	0.034	−0.233*

Anhang 16 – Weitere Informationen zu Kapitel 4.4

Pils et al. Elevated Aβ aggregates in feces from Alzheimer's disease patients: a proof-of-concept study

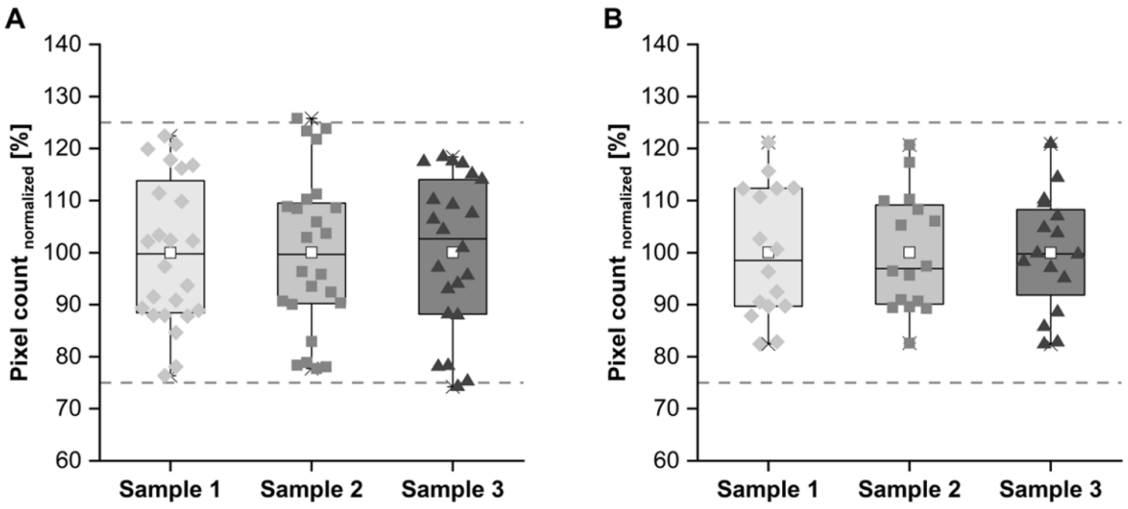


Figure S1. Evaluation of the reproducibility of sample homogenization and dilution for three different fecal samples, related to Results. (**A**) To evaluate the reproducibility of sample homogenization, we prepared six identical aliquots from each of three different fecal samples. Each homogenate was diluted 1:5 and was measured by sFIDA in 4-fold replicates, and reproducibility was determined based on normalized pixel counts. Consequently, there were 24 data points per box for each of the three samples (except for sample 3, where only 22 data points were available due to measurement artifacts in the affected wells). Intra-assay variances described by CV% of about 15% were recorded for all three samples confirming the reproducibility of the homogenization procedure. Based on documented sample weight, a precision of 98.6% and a trueness of 99.4% were calculated for the Simplix tubes. (**B**) We prepared a 1:5 dilution of each sample homogenate four times and subjected each dilution to sFIDA in quadruplicates. In general, we observed a high reproducibility with normalized pixel counts of the three fecal samples not exceeding the predefined tolerance range of ± 25% and showing low intra-assay variance (CV% of sample 1: 12.6%, samples 2 and 3: 11.3% each). For all replicates, a precision of 88.3% was determined, indicating a high reproducibility of the sample dilution (tolerance range 80−120%). Box plots include the median as a line and the mean as a square. The tolerance range of ± 25% is depicted as dashed gray lines. sample 1 = diamonds, low readout; sample 2 = squares, intermediate readout, and sample 3 = triangles, high readout.

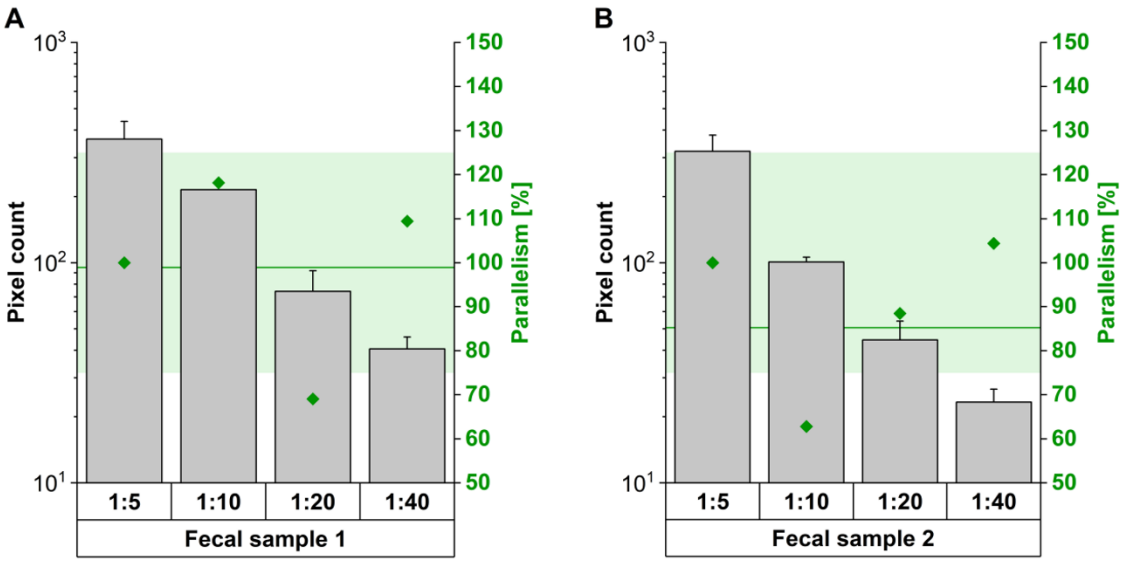


Figure S2. Parallelism of endogenous Aβ aggregates in fecal sample 1 and sample 2, related to Results. We performed a parallelism study using two fecal samples (sample 1 (**A**), sample 2 (**B**) with high endogenous Aβ aggregate concentrations to test whether samples can be diluted linearly. The pixel counts (left y-axis, gray bars) and the calculated percent parallelism (dilution linearity, right y-axis, dark green diamonds) were plotted against the used sample dilution. The acceptance range for percent parallelism was 75−125%, indicated by light green background shading. Mean percent dilution linearities of 99.9%, for sample 1, and 85.2%, for sample 2, were observed, although two values exceeded the lower tolerance limit (1:20 dilution of sample 1, 1:10 dilution of sample 2). Thus, we can exclude strong interferences due to, e.g., heterophilic antibodies, which typically affect dilution linearity (Park & Kricka, 2013). Consequently, samples with a high Aβ aggregate level can be diluted within a linear range and yield reliable results. Data are represented as mean with standard deviation.

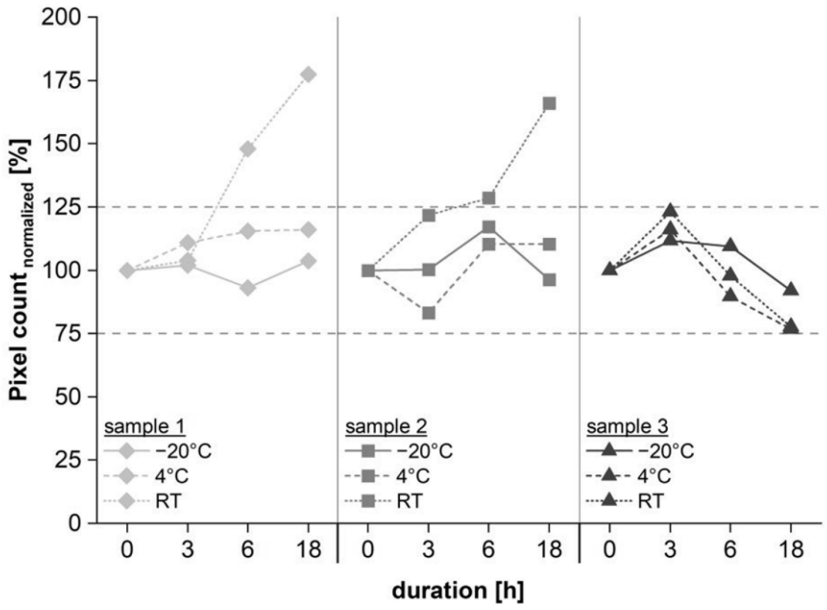


Figure S3. Evaluation of thermostability during transport or bench-top handling, related to Results and Figure 2. To investigate thermostability, three crude fecal samples (sample 1 = diamonds, low readout; sample 2 = square, intermediate readout; sample 3 = triangle, high readout) were stored at −20 °C, 4 °C or 20 °C for 3, 6, or 18 h before they were frozen at −80 °C. Afterward, crude samples were homogenized, diluted 1:5 with sample buffer, and subjected to sFIDA analysis in quadruplicates. Normalized pixel counts were calculated using a non-stressed reference sample and plotted against storage time. Dashed lines indicate the tolerance range of ± 25%. Because none of the samples showed normalized pixel counts outside the tolerance, we assumed that sample stability at −20 °C and 4 °C is not affected within the analyzed time period of 3 to 18h. In contrast, simulated transport or bench-top handling at 20 °C exceeded the tolerance limit after 3 h (sample 1 and sample 2). A signal increase was observed for both samples, which can be explained by increasing autofluorescence caused by decay processes and bacterial growth at this temperature. Consequently, we have decided not to transport or handle the sample at RT and adapted the sFIDA procedure accordingly, i.e., by sufficiently cooling the fecal samples during the preanalytics.

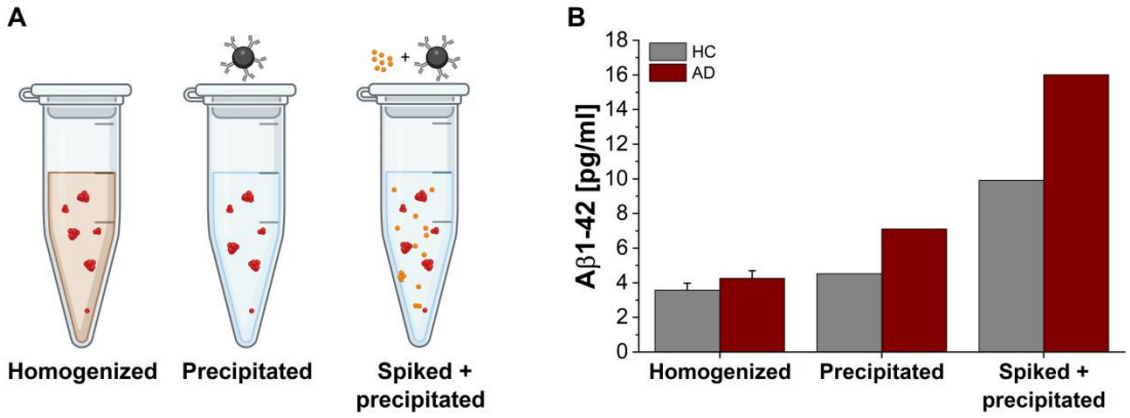


Figure S4. Schematic illustration of sample treatment and confirming the presence of fecal Aβ species in those samples using ELISA, related to Results. To determine total Aβ (monomers and aggregates) in feces, two samples (gray: HC, red: AD patient) were analyzed using a human amyloid β (1−42) ELISA Assay kit (IBL International, Hamburg, Germany). While this ELISA was developed for plasma, CSF, and cell culture supernatants (IBL-international, 2016), it should at least be applicable for the qualitative detection of Aβ in the feces. We tested the effect of different sample treatments ("homogenized", "precipitated", and "spiked + precipitated", schematic illustration in (**A**), *created with BioRender.com*.) on the discrimination between AD and HC. Signals (**B**) could be detected in those samples that were only homogenized, but no differentiation between both samples was possible. Sensitivity could only be increased by accumulation and elimination of the matrix by immunoprecipitation. This difference between control and AD could be further enhanced by adding Aβ1−42 as the substrate for the seeding process. NOTE. For the immunoprecipitation, a total of 1.5 g feces per donor were required to obtain 100 µL supernatant. Due to the limited amount of feces, only a single determination by ELISA was possible. Therefore, no standard deviation is shown. In case of homogenized samples, data are represented as mean with standard deviation.

Table S1. Results of normal distribution tests for molar Aβ aggregate concentrations in fecal samples, related to Results.

Normal distribution test	All samples	AD samples	HC samples
Shapiro−Wilk	$2.51*10^{-14}$	$3.37*10^{-8}$	0.003
Lilliefors	$3.99*10^{-19}$	$9.71*10^{-7}$	0.109
Kolmogorov Smirnov	$1.24*10^{-6}$	0.012	0.513
Anderson−Darling	$7.11*10^{-31}$	$6.43*10^{-12}$	0.018

[a]Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; HC, healthy controls

Table S2. The coefficient of variation, calculated calibration curve, coefficient of determination and the limit of detection of each experiment for Aβ-coated SiNaPs, IQC samples, and fecal samples, related to Results.

	Experiment 1	Experiment 2	Mean
CV%	S: 11.54	S: 15.15	S: 13.35
	I: 10.91	I: 11.30	I: 11.11
	F: 19.36	F: 18.13	F: 18.74
Calibration curve	Range: 0.32 fM − 1026 fM	Range: 1.03 fM − 1026 fM	-
	y = 1.536x + 6.984	y = 1.118x + 10.88	-
	R^2 = 0.9709	R^2 = 0.9886	R^2 = 0.9798
LoD [fM]	2.27	1.09	1.68

[a]NOTE. CV% are defined as the ratio of standard deviation and the mean of the respective sample quadruplicates. The calibration curve was calculated based on the pixel counts of Aβ-coated SiNaPs using linear regression (readouts were weighted with 1/readout).

[b]Abbreviations: CV%, coefficient of variation; S, Aβ-coated SiNaPs; I, IQC samples; F, fecal samples; R^2, coefficients of determination; LoD, the limit of detection.

Table S3. Clinical information, Bristol scale scores, and mean Aβ-aggregate concentrations with the standard deviation of the individual subjects, related to Results, Figure 5B and Figure 5C.

Sample	Cohort	Cognition	Clinical symptoms	Bristol scale	Fecal Aβ aggregate concentration ± SD [fM]
1	AD	impaired	MCI	5	1852.5 ± 174.7
2	AD	impaired	dementia	4	3430.8 ± 773.7
3	AD	impaired	MCI	4	50.9 ± 3.53
4	AD	impaired	MCI	5	49 ± 6.31
5	AD	impaired	MCI	3	49.4 ± 8.63
6	AD	impaired	dementia	3	798.9 ± 364.6
7	AD	impaired	MCI	5	322.4 ± 45.6
8	AD	impaired	MCI	5	273.3 ± 33.9
9	AD	impaired	MCI	5	40.1 ± 3.78
10	AD	impaired	MCI	3	28.7 ± 3.97
11	AD	impaired	MCI	4	139.7 ± 44.1
12	AD	impaired	dementia	4	215.3 ± 26.2
13	AD	impaired	MCI	5	462.9 ± 143.9
14	AD	impaired	MCI	3	120.6 ± 15.7
15	AD	impaired	MCI	5	45.5 ± 6.66
16	AD	impaired	MCI	4	53.6 ± 12.4
17	AD	impaired	dementia	4	387.1 ± 46.2
18	AD	impaired	MCI	4	268.7 ± 48.4
19	AD	impaired	MCI	4	665.9 ± 312.8
20	AD	impaired	MCI	5	65.6 ± 4.59
21	AD	impaired	MCI	3	15.5 ± 1.66
22	AD	impaired	MCI	6	165.2 ± 46.4
23	AD	impaired	MCI	6	40.3 ± 4.51
24	AD	impaired	MCI	4	111.5 ± 11.6
25	AD	impaired	MCI	5	62.6 ± 12.5
26	AD	impaired	MCI	6	2.2 ± 0.24
27	HC	normal	-	5	104 ± 25.7
28	HC	normal	-	6	190.7 ± 53.2
29	HC	normal	-	5	49.2 ± 8
30	HC	normal	-	5	73.3 ± 6.7
31	HC	normal	-	5	73.6 ± 7.9
32	HC	normal	-	5	72.9 ± 22.2
33	HC	normal	-	4	27.4 ± 3.9
34	HC	normal	-	4	114.9 ± 27.3
35	HC	normal	-	3	46.2 ± 14.5
36	HC	normal	-	5	45.7 ± 9
37	HC	normal	-	5	89.6 ± 15.4
38	HC	normal	-	5	64 ± 12.4

39	HC	normal	-	6	45.4 ± 5.7
40	HC	normal	-	6	86.7 ± 15
41	HC	normal	-	6	62.7 ± 12.1
42	HC	normal	-	5	22.6 ± 4.4
43	HC	normal	-	6	23.9 ± 7.1
44	HC	normal	-	6	56.6 ± 12.7
45	HC	normal	-	5	58 ± 14.7
46	HC	normal	-	6	198.5 ± 49.6
47	HC	normal	-	4	67.1 ± 7.4
48	HC	normal	-	6	32.9 ± 5.8
49	HC	normal	-	5	99.3 ± 20.2
50	HC	normal	-	4	11.3 ± 3.2
51	HC	normal	-	5	5.1 ± 1.2
52	HC	normal	-	5	96.4 ± 16.6
53	HC	normal	-	6	15.6 ± 2
54	HC	normal	-	6	33.2 ± 4.6
55	HC	normal	-	6	36.3 ± 6.5
56	HC	normal	-	5	13.6 ± 1.6
57	HC	normal	-	4	1.3 ± 0.5

[a]Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; MCI, mild cognitive impairment; HC, healthy controls; SD, standard deviation.

Table S4. Spearman coefficient of correlation values for the analyses between fecal Aβ aggregate levels and seven fecal biomarkers indicating gut inflammation and increased permeability of intestinal membranes (bile acid, lipids, calprotectin, IgA, α-1-antitrypsin, hemoglobin, and albumin), related to Results.

Biomarker	Bile acid	Lipids	Calpro-tectin	IgA	α1-Anti-trypsin	Hemo-globin	Albumin	Aβ aggregates
Bile acid	1	0.5181*	−0.1580	−0.1596	−0.0164	0.2236	0.0039	−0.1108
Lipids		1	−0.2998	0.0778	−0.2737	0.0854	0.1134	−0.3805
Calprotectin			1	0.5941*	0.5845*	0.4669	0.5911*	0.1489
IgA				1	0.2336	0.2423	0.6071*	−0.0118
α1-Antitrypsin					1	0.3872	0.0731	0.3564
Hemoglobin						1	0.5965*	−0.0121
Albumin							1	−0.3665
Aβ aggregates								1

[a]NOTE. Significant correlations are indicated by * p: ≤ 0.05.

Table S5. p-values of two-sided Mann−Whitney U test for pairwise comparisons of measured fecal biomarker concentrations, related to Results.

Biomarker	AD (n = 7)	HC (n = 8)	p-value
Bile acid [mmol/100 g]	350 ± 91.7	272 ± 70.5	0.1321
Lipids wt%	1.6 ± 0.7	1.6 ± 0.6	0.8608
Calprotectin [µg/g]	40.3 ± 27.5	53.5 ± 32.5	0.3524
IgA [µg/g]	1444 ± 2041	1716 ± 1433	0.2699
α1-Antitrypsin [µg/g]	39.1 ± 22.7	61.8 ± 47.6	0.1753
Hemoglobin [µg/g]	0.3 ± 0	0.4 ± 0.3	0.2036
Albumin [µg/g]	4.1 ± 2.0	9.8 ± 10.9	0.1870

[a]NOTE. No significant differences of fecal biomarker concentrations between AD patients and HC were found. [b]Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; HC, healthy controls.

Supplemental References

IBL-international. (2016). *Amyloid-beta (1-42) (FL) ELISA Instruction for use Code No. 27719, version 2.*

Park, J. Y., & Kricka, L. J. (2013). Chapter 5.3 - Interferences in Immunoassay. In D. Wild (Ed.), *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)* (pp. 403-416). Elsevier. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097037-0.00027-0

Anhang 17 – Weitere Informationen zu Kapitel 4.5

Schaffrath et al. Patients with isolated REM-sleep behavior disorder have elevated levels of alpha-synuclein aggregates in stool

SUPPLEMENTARY RESULTS

Supplementary Table 1 Demographic and clinical information and concentrations of α-synuclein aggregates in stool of individual subjects

Sample	*Diagnosis*	*Sex*	*Age at sampling [years]*	*Age at onset [years]*	*Disease duration [years]*	*Education [years]*	*CCCSS score*	*DemTect score*	*NMSS score*	*MDS-UDPRS III score*	*Scent score*	*Hoehn and Yahr score*	*Levodopa challenge test [% change]*	*DaTSCAN score*	*Screening questionnaire PD score*	*RBDSQ score*	*α-Synuclein aggregate concentration ± SD [fM]*
1	PD	Male	73	60	13	18	9	13	37	22	4	4	0.692	+	5	7	1.38 ± 0.22
2	PD	Male	68	54	14	10	10	13	17	27	6	3	0.333	N/A	6	10	0.88 ± 1.07
3	PD	Male	56	45	11	12	3	17	51	35	7	4	0.529	+	5	8	9.20 ± 2.85
4	PD	Male	71	61	10	17	1	11	67	65	8	5	0.239	+	9	6	104.73 ± 17.43
5	PD	Male	46	41	5	12	0	14	103	21	3	3	0.438	N/A	6	2	0.26 ± 0.25
6	PD	Male	72	57	15	19	6	14	54	28	5	5	0.469	N/A	4	5	0.98 ± 0.55
7	PD	Male	54	50	4	16	0	18	20	19	2	2	0.467	+	7	0	1.51 ± 0.88
8	PD	Female	71	49	22	12	4	9	67	20	9	3	0.481	N/A	9	4	5.58 ± 2.07
9	PD	Male	56	52	4	16	2	15	9	33	7	5	0.320	N/A	7	5	2.97 ± 0.73
10	PD	Male	62	50	12	20	0	18	9	10	2	2	0.462	+	8	3	4.28 ± 0.51
11	PD	Male	80	78	2	8	3	14	4	17	3	2	N/A	N/A	1	0	4.28 ± 1.87
12	PD	Female	78	63	15	11	18	17	48	76	2	5	0.431	N/A	6	4	108.40 ± 20.31
13	PD	Male	68	58	10	18	9	16	4	17	3	4	0.632	N/A	5	2	1.53 ± 0.73
14	PD	Female	80	66	14	13	11	13	34	25	7	4	0.528	+	7	1	0.40 ± 0.33
15	PD	Female	52	35	17	19	1	12	27	23	4	4	0.577	N/A	5	7	0.19 ± 0.08
16	PD	Female	74	60	14	17	9	10	21	50	2	5	0.323	N/A	9	6	4.28 ± 0.75
17	PD	Male	63	54	9	13	1	12	12	15	4	2	0.639	+	7	4	5.72 ± 0.89
18	PD	Male	74	62	12	12	3	11	21	8	0	2	0.320	N/A	2	3	10.52 ± 3.99
19	PD	Male	82	73	9	12	0	9	46	23	8	4	0.378	N/A	7	5	2.22 ± 0.39
20	PD	Female	50	39	11	14	2	11	16	22	7	2	0.459	+	5	2	1.14 ± 0.11
21	PD	Female	56	51	5	12	0	15	4	30	9	3	0.321	+	7	5	1.04 ± 0.48
22	PD	Female	60	51	9	17	3	17	16	16	7	2	0.423	+	7	2	0.60 ± 0.25
23	PD	Male	60	40	20	12	7	18	15	30	3	3	0.474	N/A	5	3	462.07 ± 46.48
24	PD	Male	57	39	18	15	7	12	42	41	6	3	0.400	+	5	8	7.56 ± 1.15
25	PD	Male	59	56	3	17	13	18	46	7	4	2	0.483	N/A	7	9	673.25 ± 19.52
26	PD	Female	58	58	0	20	2	18	52	16	1	2	N/A	+	0	11	2.52 ± 0.37
27	PD	Male	68	62	6	20	1	17	10	5	6	2	N/A	+	4	2	0.07 ± 0.06
28	PD	Male	76	74	2	13	1	11	21	35	6	3	N/A	N/A	6	8	2.49 ± 0.76
29	PD	Male	60	51	9	21	4	14	56	22	1	3	0.486	N/A	8	5	1.19 ± 0.30
30	PD	Male	59	54	5	19	4	18	28	33	6	3	N/A	+	7	12	3.87 ± 1.14
31	PD	Male	65	63	2	15	6	12	28	42	5	4	0.431	N/A	9	8	7.09 ± 0.54
32	PD	Male	41	40	1	22	2	18	7	11	10	2	N/A	+	2	3	6.89 ± 0.60
33	PD	Male	66	45	21	15	5	18	14	11	6	2	0.000	+	4	4	1.57 ± 0.52
34	PD	Female	60	50	10	13	12	13	27	19	6	3	0.429	+	8	7	3.51 ± 0.72

35	PD	Male	71	66	5	12	2	8	30	42	9	4	0.250	+	4	1	0.27 ± 0.09
36	PD	Male	58	54	4	15	2	11	42	10	8	3	0.692	N/A	7	6	1.30 ± 0.92
37	PD	Female	70	57	13	8	11	11	25	22	8	3	0.441	N/A	6	4	0.19 ± 0.03
38	PD	Male	55	41	14	9	12	7	30	50	6	4	0.447	N/A	8	6	1.32 ± 0.29
39	PD	Male	68	64	4	13	6	9	65	21	3	3	N/A	+	9	6	2.19 ± 0.35
40	PD	Male	78	71	7	18	7	10	10	19	7	3	N/A	+	8	12	45.51 ± 12.8
41	PD	Male	55	50	5	16	1	14	1	5	8	2	0.538	N/A	3	5	5.79 ± 2.57
42	PD	Female	49	44	5	15	5	18	13	9	8	3	0.000	N/A	7	3	1.47 ± 0.11
43	PD	Female	65	50	15	25	4	17	22	N/A	5	4	0.219	N/A	5	11	4.01 ± 0.43
44	PD	Male	41	37	4	20	3	14	17	18	6	3	N/A	+	6	1	2.78 ± 0.30
45	PD	Male	69	58	11	16	3	10	20	21	6	3	0.517	N/A	5	5	2.42 ± 0.28
46	PD	Male	63	53	10	13	8	14	21	13	10	2	0.313	+	7	8	4.61 ± 0.73
47	PD	Male	71	65	6	12	3	10	26	48	4	3	0.163	+	7	1	0.61 ± 0.38
48	PD	Female	78	64	14	20	6	18	23	30	4	3	0.286	N/A	7	2	28.42 ± 1.67
49	PD	Male	76	60	16	12	11	13	90	31	6	4	0.300	N/A	6	9	1.72 ± 0.22
50	PD	Male	55	55	0	30	0	17	2	5	7	2	N/A	+	1	3	10.82 ± 1.36
51	PD	Male	77	65	12	18	3	13	26	26	7	3	-0.023	N/A	4	8	57.33 ± 12.05
52	PD	Male	64	52	12	22	9	16	20	25	7	2	0.933	N/A	8	4	6.72 ± 1.13
53	PD	Male	83	73	10	22	8	18	36	54	5	4	N/A	N/A	6	7	28.19 ± 3.40
54	PD	Male	62	53	9	18	3	15	44	6	2	2	0.333	+	5	6	1.03 ± 1.01
55	PD	Female	70	63	7	14	0	12	18	13	6	3	0.368	N/A	8	4	3.82 ± 0.35
56	PD	Female	74	61	13	8	3	12	19	63	4	5	N/A	N/A	7	7	15.3 ± 0.73
57	PD	Female	77	50	27	13	1	18	67	30	2	4	0.567	N/A	9	7	48.39 ± 6.44
58	PD	Female	62	48	14	23	7	18	11	40	7	5	0.093	+	6	4	21.84 ± 2.24
59	PD	Female	75	49	26	16	2	9	36	25	2	3	N/A	N/A	5	4	2.97 ± 1.59
60	PD	Male	59	57	2	14	1	14	29	41	9	3	N/A	N/A	4	3	0.98 ± 0.48
61	PD	Male	68	58	10	14	0	18	24	24	0	2	0.609	N/A	7	4	16.89 ± 0.56
62	PD	Male	73	68	5	18	0	18	14	22	7	3	N/A	+	3	4	1.07 ± 0.07
63	PD	Male	57	49	8	15	1	14	13	10	9	2	0.545	N/A	3	2	10.23 ± 1.20
64	PD	Female	54	45	9	16	2	18	15	9	10	3	0.686	+	7	3	24.45 ± 9.80
65	PD	Female	57	45	12	12	2	18	122	26	7	2	0.720	N/A	8	7	27.74 ± 1.61
66	PD	Female	68	51	17	12	0	17	19	19	8	4	0.318	N/A	2	8	3.70 ± 0.30
67	PD	Female	64	57	7	20	8	13	59	21	8	3	0.629	N/A	8	11	0.23 ± 0.15
68	PD	Male	56	48	8	13	10	12	39	22	4	3	0.310	+	6	6	1.34 ± 0.68
69	PD	Female	74	73	1	17	2	15	15	16	8	3	N/A	+	6	9	119.51 ± 12.54
70	PD	Male	46	36	10	24	1	15	22	16	9	2	0.667	+	6	3	3.34 ± 0.58
71	PD	Female	69	56	13	11	7	15	51	28	4	3	0.415	N/A	7	6	0.43 ± 0.19
72	PD	Male	55	53	2	18	12	14	50	17	3	2	N/A	N/A	8	6	14.38 ± 9.20
73	PD	Male	78	60	18	17	2	12	36	59	3	5	N/A	N/A	7	5	14.16 ± 1.74
74	PD	Male	52	45	7	16	7	9	51	21	8	3	0.346	+	6	2	1.09 ± 0.48
75	PD	Female	57	55	2	15	2	18	12	6	6	3	0.733	+	1	1	49.21 ± 4.31
76	PD	Male	55	45	10	N/A	N/A	7	79	22	7	3	0.478	+	N/A	N/A	3.56 ± 1.25

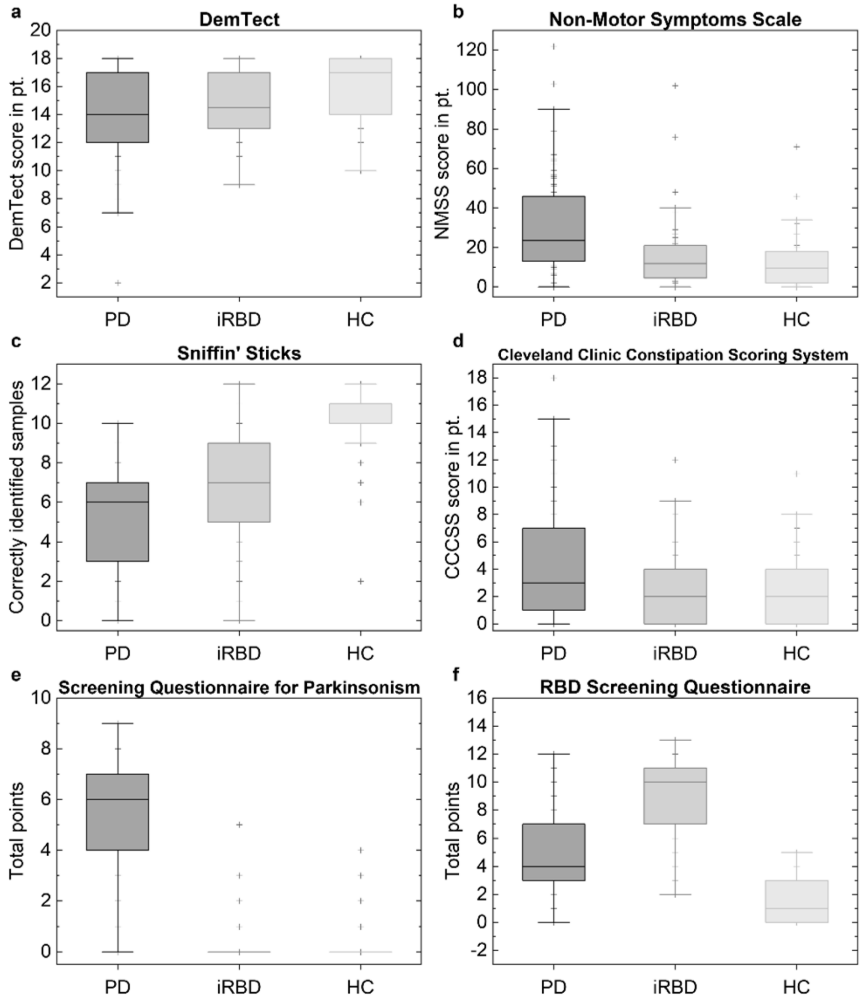
77	PD	Male	60	57	3	10	0	12	55	36	2	3	N/A	+	1	1	7.97 ± 1.47
78	PD	Male	52	46	6	18	6	13	0	5	6	2	0.000	N/A	3	1	1.10 ± 0.57
79	PD	Male	51	40	11	14	7	8	10	31	4	4	0.485	+	5	5	10.30 ± 1.23
80	PD	Male	73	72	1	14	15	15	62	23	1	3	N/A	N/A	5	1	57.08 ± 5.86
81	PD	Male	66	55	11	12	0	14	51	13	7	2	N/A	+	4	2	4.46 ± 0.90
82	PD	Female	67	53	14	12	3	15	57	31	8	4	0.341	N/A	9	10	11.45 ± 1.64
83	PD	Male	72	66	6	13	1	15	13	12	5	3	N/A	N/A	7	9	20.57 ± 0.95
84	PD	Male	59	49	10	13	3	14	29	13	3	2	0.474	N/A	7	2	1.81 ± 0.66
85	PD	Male	74	68	6	8	2	9	6	42	6	N/A	0.543	N/A	4	1	0.13 ± 0.12
86	PD	Female	62	56	6	16	0	13	13	10	2	2	N/A	N/A	2	6	8.78 ± 0.89
87	PD	Male	71	64	7	19	0	18	18	29	3	3	N/A	N/A	5	1	0.60 ± 0.28
88	PD	Male	51	51	0	13	1	17	12	11	3	2	N/A	+	4	11	15.51 ± 2.65
89	PD	Female	57	56	1	14	3	13	24	6	8	2	N/A	+	5	4	1.34 ± 0.91
90	PD	Male	78	72	6	13	0	17	11	14	6	3	0.444	+	2	1	0.80 ± 0.41
91	PD	Male	62	59	3	22	1	14	13	7	7	2	N/A	+	2	3	40.25 ± 2.04
92	PD	Male	81	69	12	13	4	2	64	55	1	5	N/A	N/A	7	4	21.44 ± 1.33
93	PD	Male	64	63	1	18	0	13	12	4	2	2	N/A	+	3	3	151.19 ± 19.38
94	PD	Male	80	77	3	10	1	13	31	17	1	2	0.143	+	4	3	8.73 ± 1.92
95	iRBD	Male	56	N/A	N/A	21	2	17	6	1	11	N/A	N/A	N/A	0	6	10.01 ± 2.42
96	iRBD	Male	72	60	12	3	N/A	16	1	4	11	N/A	N/A	N/A	2	6	2.83 ± 1.15
97	iRBD	Male	61	N/A	N/A	16	N/A	14	4	5	11	N/A	N/A	N/A	0	6	10.99 ± 2.60
98	iRBD	Female	59	55	4	20	4	17	14	0	6	N/A	N/A	N/A	0	10	15.96 ± 1.49
99	iRBD	Male	78	N/A	N/A	14	N/A	17	15	4	8	N/A	N/A	N/A	0	10	6.04 ± 2.12
100	iRBD	Female	67	50	17	12	3	13	N/A	8	5	N/A	N/A	N/A	0	9	5.54 ± 1.44
101	iRBD	Male	63	63	0	16	2	17	3	5	10	N/A	N/A	N/A	0	8	0.74 ± 0.86
102	iRBD	Male	58	54	4	16	0	13	N/A	6	9	N/A	N/A	N/A	0	10	8.37 ± 1.95
103	iRBD	Female	64	61	3	21	0	15	N/A	3	3	N/A	N/A	N/A	0	7	4.34 ± 0.80
104	iRBD	Male	64	63	1	15	4	11	N/A	2	7	N/A	N/A	+	0	8	4.12 ± 0.80
105	iRBD	Male	70	60	10	N/A	0	14	12	5	10	N/A	N/A	N/A	0	12	5.11 ± 1.11
106	iRBD	Male	66	52	14	17	0	12	4	5	7	N/A	N/A	+	0	11	5.9 ± 0.68
107	iRBD	Male	73	71	2	N/A	N/A	12	2	4	6	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	24.42 ± 5.82
108	iRBD	Female	65	60	5	16	1	17	6	3	5	N/A	N/A	+	0	9	2.90 ± 0.83
109	iRBD	Male	72	62	10	11	2	14	N/A	5	9	N/A	N/A	+	0	N/A	7.87 ± 1.34
110	iRBD	Male	75	72	3	18	2	14	8	7	3	N/A	N/A	N/A	0	7	126.81 ± 19.12
111	iRBD	Male	69	64	5	14	0	17	9	4	8	N/A	N/A	+	0	12	1.10 ± 0.33
112	iRBD	Female	66	62	4	15	5	18	2	3	9	N/A	N/A	N/A	0	5	18.92 ± 2.02
113	iRBD	Male	59	56	3	19	3	9	22	5	7	N/A	N/A	+	0	9	32.97 ± 3.34
114	iRBD	Male	75	66	9	18	0	17	1	5	7	N/A	N/A	N/A	0	11	16.64 ± 2.23
115	iRBD	Male	55	40	15	21	0	11	0	8	12	N/A	N/A	N/A	0	5	6.29 ± 0.68
116	iRBD	Male	69	66	3	15	8	12	N/A	13	7	N/A	N/A	+	0	11	3.26 ± 0.44
117	iRBD	Male	54	49	5	12	5	12	48	3	8	N/A	N/A	+	5	13	19.17 ± 4.96
118	iRBD	Male	74	72	2	16	0	15	N/A	6	7	N/A	N/A	N/A	0	10	3.82 ± 0.69

119	iRBD	Male	66	61	5	15	3	18	21	7	6	N/A	N/A	N/A	0	10	0.93 ± 0.28
120	iRBD	Male	70	63	7	20	2	13	31	8	1	N/A	N/A	N/A	1	5	6.08 ± 0.29
121	iRBD	Male	67	50	17	13	0	17	2	10	7	N/A	N/A	N/A	0	10	4.15 ± 1.32
122	iRBD	Male	67	56	11	17	0	17	3	4	9	N/A	N/A	+	0	10	8.14 ± 1.95
123	iRBD	Male	62	47	15	31	4	14	N/A	5	9	N/A	N/A	+	1	9	7.49 ± 1.43
124	iRBD	Male	70	N/A	N/A	15	0	18	1	4	7	N/A	N/A	N/A	0	5	4.10 ± 0.48
125	iRBD	Female	63	62	1	19	12	14	N/A	0	4	N/A	N/A	N/A	0	8	4.64 ± 4.76
126	iRBD	Male	75	55	20	15	6	13	N/A	4	8	N/A	N/A	+	1	8	35.60 ± 2.14
127	iRBD	Male	67	61	6	16	5	13	23	1	3	N/A	N/A	N/A	0	11	17.04 ± 3.11
128	iRBD	Male	70	67	3	22	3	14	N/A	3	3	N/A	N/A	+	1	10	64.72 ± 3.37
129	iRBD	Male	74	72	2	12	2	11	N/A	5	5	N/A	N/A	N/A	0	7	5.35 ± 1.06
130	iRBD	Male	58	53	5	13	9	14	N/A	7	5	N/A	N/A	+	3	11	2.55 ± 0.47
131	iRBD	Female	77	66	11	16	1	15	4	5	10	N/A	N/A	N/A	0	12	15.40 ± 2.58
132	iRBD	Female	59	55	4	16	1	15	N/A	4	10	N/A	N/A	N/A	0	7	24.68 ± 1.03
133	iRBD	Male	68	60	8	18	2	18	N/A	4	7	N/A	N/A	N/A	0	9	4.34 ± 0.84
134	iRBD	Male	63	N/A	N/A	N/A	N/A	18	N/A	2	7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	5.34 ± 0.62
135	iRBD	Male	64	62	2	12	5	14	102	5	10	N/A	N/A	N/A	0	13	2.89 ± 0.53
136	iRBD	Male	61	50	11	16	6	18	76	5	9	N/A	N/A	+	0	12	147.61 ± 8.84
137	iRBD	Male	64	60	4	N/A	N/A	11	9	2	5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	96912.87 ± 14905.2
138	iRBD	Male	66	63	3	12	3	13	2	5	7	N/A	N/A	N/A	0	4	10.42 ± 1.18
139	iRBD	Male	63	62	1	15	2	14	9	0	3	N/A	N/A	N/A	0	5	46.81 ± 3.15
140	iRBD	Male	61	51	10	25	1	15	6	3	5	N/A	N/A	+	1	12	223.93 ± 16.15
141	iRBD	Male	58	54	4	15	2	17	6	1	6	N/A	N/A	+	0	3	5.30 ± 0.66
142	iRBD	Male	63	55	8	13	9	11	8	3	0	N/A	N/A	N/A	0	11	12.89 ± 0.74
143	iRBD	Male	59	47	12	22	2	14	5	2	9	N/A	N/A	N/A	0	11	1.99 ± 1.39
144	iRBD	Male	73	63	10	17	0	12	1	1	8	N/A	N/A	N/A	0	8	36.79 ± 4.54
145	iRBD	Male	69	54	15	18	8	18	14	0	6	N/A	N/A	+	0	10	30.49 ± 7.58
146	iRBD	Male	60	N/A	N/A	N/A	N/A	12	15	3	7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	10.48 ± 4.54
147	iRBD	Male	63	53	10	17	0	18	25	3	2	N/A	N/A	N/A	0	7	1.46 ± 0.83
148	iRBD	Male	60	50	10	15	2	17	7	2	7	N/A	N/A	+	0	2	28.32 ± 4.72
149	iRBD	Male	74	71	3	19	1	18	18	9	9	N/A	N/A	+	0	12	6.67 ± 1.46
150	iRBD	Male	56	53	3	N/A	N/A	14	17	2	10	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	7.65 ± 0.55
151	iRBD	Male	72	58	14	8	1	17	12	1	5	N/A	N/A	N/A	0	12	59941.25 ± 16328
152	iRBD	Male	65	61	4	13	1	18	6	3	4	N/A	N/A	N/A	0	7	30.55 ± 1.42
153	iRBD	Male	74	68	6	12	6	15	13	2	6	N/A	N/A	N/A	0	10	19.34 ± 2.84
154	iRBD	Male	72	57	15	17	0	14	19	5	5	N/A	N/A	N/A	0	10	59.57 ± 4.69
155	iRBD	Male	67	65	2	11	4	12	11	1	3	N/A	N/A	+	0	6	24.92 ± 4.06
156	iRBD	Male	80	60	20	19	0	14	15	7	6	N/A	N/A	N/A	0	7	5.98 ± 2.15
157	iRBD	Male	68	63	5	18	6	15	40	2	4	N/A	N/A	+	0	12	18.98 ± 4.67
158	iRBD	Female	77	70	7	13	6	14	24	4	6	N/A	N/A	+	1	7	24.75 ± 1.54
159	iRBD	Male	74	69	5	17	1	14	16	2	0	N/A	N/A	N/A	0	11	100.09 ± 8.34
160	iRBD	Male	69	64	5	13	4	15	21	7	4	N/A	N/A	N/A	0	10	23.66 ± 1.97

161	iRBD	Male	60	59	1	11	3	16	29	1	4	N/A	N/A	N/A	1	13	0.94 ± 0.82
162	iRBD	Male	61	59	2	N/A	N/A	18	15	2	8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	58.18 ± 5.88
163	iRBD	Male	57	38	19	17	0	15	38	3	7	N/A	N/A	N/A	0	12	10.91 ± 1.89
164	iRBD	Female	56	50	6	13	4	17	27	2	9	N/A	N/A	N/A	1	12	2.87 ± 0.87
165	iRBD	Male	68	48	20	N/A	N/A	11	40	N/A	7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1.29 ± 0.14
166	iRBD	Male	76	70	6	15	3	15	18	12	10	N/A	N/A	N/A	1	11	146.32 ± 6.96
167	HC	Male	18	N/A	N/A	12	3	15	N/A	N/A	10	N/A	N/A	N/A	0	2	4.29 ± 2.43
168	HC	Male	62	N/A	N/A	18	0	14	N/A	N/A	10	N/A	N/A	N/A	0	3	3.57 ± 2.43
169	HC	Male	70	N/A	N/A	16	7	10	N/A	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	0	33.19 ± 3.44
170	HC	Female	58	N/A	N/A	16	0	17	N/A	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	0	80.06 ± 24.21
171	HC	Female	74	N/A	N/A	11	4	12	N/A	N/A	10	N/A	N/A	N/A	1	1	73.96 ± 4.57
172	HC	Male	70	N/A	N/A	12	0	12	N/A	N/A	10	N/A	N/A	N/A	0	1	45.82 ± 2.48
173	HC	Female	55	N/A	N/A	15	1	18	N/A	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	1	2.03 ± 1.35
174	HC	Female	20	N/A	N/A	14	4	15	N/A	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	1	5.24 ± 0.46
175	HC	Female	20	N/A	N/A	14	5	16	N/A	N/A	10	N/A	N/A	N/A	0	3	6.01 ± 1.70
176	HC	Female	78	N/A	N/A	12	4	18	N/A	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	3	28.93 ± 4.84
177	HC	Female	66	N/A	N/A	14	0	17	N/A	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	3	13.36 ± 2.41
178	HC	Male	75	N/A	N/A	18	0	14	27	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	0	17.56 ± 1.81
179	HC	Male	74	N/A	N/A	10	2	13	8	N/A	10	N/A	N/A	N/A	0	0	1.74 ± 0.19
180	HC	Female	70	N/A	N/A	11	0	18	9	N/A	11	N/A	N/A	N/A	3	2	5.78 ± 1.81
181	HC	Female	63	N/A	N/A	20	4	18	1	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	2	4.15 ± 0.37
182	HC	Female	66	N/A	N/A	18	7	18	10	N/A	12	N/A	N/A	N/A	0	2	6.66 ± 0.43
183	HC	Male	34	N/A	N/A	16	7	17	1	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	1	51.35 ± 0.81
184	HC	Female	72	N/A	N/A	18	1	18	10	N/A	10	N/A	N/A	N/A	1	0	13.00 ± 2.49
185	HC	Male	77	N/A	N/A	23	5	15	0	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	2	6.84 ± 0.90
186	HC	Female	60	N/A	N/A	16	0	18	18	N/A	12	N/A	N/A	N/A	0	4	2.93 ± 1.01
187	HC	Female	64	N/A	N/A	13	2	18	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1	2	19.37 ± 1.97
188	HC	Female	61	N/A	N/A	14	2	17	3	N/A	8	N/A	N/A	N/A	0	1	12.08 ± 1.34
189	HC	Male	36	N/A	N/A	20	0	18	4	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	1	0.84 ± 0.25
190	HC	Male	62	N/A	N/A	13	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	2	2	0.68 ± 0.22
191	HC	Female	60	N/A	N/A	20	0	18	18	N/A	2	N/A	N/A	N/A	0	0	0.86 ± 0.38
192	HC	Male	52	N/A	N/A	15	0	14	4	N/A	10	N/A	N/A	N/A	0	0	2.01 ± 0.23
193	HC	Female	66	N/A	N/A	19	2	15	1	N/A	10	N/A	N/A	N/A	0	0	38.59 ± 4.2
194	HC	Female	63	N/A	N/A	12	4	17	34	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	0	1.20 ± 0.10
195	HC	Male	59	N/A	N/A	16	1	N/A	11	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	2	0.30 ± 0.24
196	HC	Female	71	N/A	N/A	16	11	18	15	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	4	14.93 ± 4.15
197	HC	Female	70	N/A	N/A	12	0	17	16	N/A	6	N/A	N/A	N/A	0	4	70.07 ± 10.59
198	HC	Female	48	N/A	N/A	17	1	18	1	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	0	3.55 ± 1.91
199	HC	Male	65	N/A	N/A	18	2	18	4	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	2	0.40 ± 0.09
200	HC	Male	72	N/A	N/A	22	1	13	14	N/A	7	N/A	N/A	N/A	0	3	1.58 ± 0.47
201	HC	Female	50	N/A	N/A	15	2	18	18	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	5	1.42 ± 0.82
202	HC	Male	43	N/A	N/A	21	0	14	0	N/A	10	N/A	N/A	N/A	0	0	7.07 ± 1.02

203	HC	Male	57	N/A	N/A	22	0	15	3	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	1	1.56 ± 0.16
204	HC	Female	69	N/A	N/A	21	0	16	2	N/A	7	N/A	N/A	N/A	0	0	1.47 ± 0.14
205	HC	Female	48	N/A	N/A	13	3	17	3	N/A	12	N/A	N/A	N/A	0	0	10.77 ± 1.16
206	HC	Female	39	N/A	N/A	18	4	15	3	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	0	119.64 ± 11.56
207	HC	Female	42	N/A	N/A	17	3	18	21	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	0	3.28 ± 0.34
208	HC	Female	53	N/A	N/A	15	1	17	2	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	3	2.67 ± 0.43
209	HC	Female	24	N/A	N/A	18	6	17	18	N/A	11	N/A	N/A	N/A	2	1	1.15 ± 0.58
210	HC	Female	52	N/A	N/A	15	4	13	46	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	4	1.14 ± 1.24
211	HC	Female	20	N/A	N/A	14	8	18	10	N/A	12	N/A	N/A	N/A	0	5	5.54 ± 1.23
212	HC	Male	78	N/A	N/A	12	0	13	32	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1	5	2.82 ± 0.96
213	HC	Male	26	N/A	N/A	13	0	18	2	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	0	4.18 ± 0.92
214	HC	Male	38	N/A	N/A	17	3	17	0	N/A	12	N/A	N/A	N/A	0	3	292.79 ± 91.38
215	HC	Female	81	N/A	N/A	13	4	10	71	N/A	12	N/A	N/A	N/A	4	5	35.53 ± 9.47
216	HC	Female	61	N/A	N/A	23	5	18	16	N/A	9	N/A	N/A	N/A	1	1	6.87 ± 1.11
217	HC	Male	64	N/A	N/A	18	3	13	20	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	2	0.93 ± 0.45

PD, Parkinson's disease; iRBD, isolated rapid eye movement sleep behavior disorder; HC, healthy control; CCCSS, Cleveland Clinic Constipation Scoring System; NMSS, Non-Motor Symptoms Scale; MDS-UPDRS III, Movement Disorder Society's Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part III; RBDSQ, iRBD screening questionnaire; SD, standard deviation; N/A, not available



18

Supplementary Fig. 1 Results for PD and iRBD patients and healthy controls based on their performance in various tests and screening questionnaires.

a The DemTect score showed that the cognitive performance of healthy controls (15.9 ± 2.3) was significantly higher than that of PD (13.8 ± 3.3, $p < 0.001$) and iRBD patients (14.8 ± 2.3, $p = 0.020$). **b** Based on the Non-Motor Symptoms Scale (NMSS), the performance of PD patients was significantly worse than that of iRBD patients (30.6 ± 23.1 vs. 16.2 ± 18.0, $p < 0.001$) and healthy controls (12.5 ± 14.4, $p < 0.001$). **c** Also, the olfactory performance of PD patients (5.3 ± 2.6) was significantly worse ($p < 0.01$) than that of iRBD patients (6.6 ± 2.7) and healthy controls (10.4 ± 1.7), based on correctly identified sniffin' sticks. **d** Based on the Cleveland Clinic Constipation Scoring System (CCCSS), PD patients (4.1 ± 4.0) were significantly more ($p < 0.05$) constipated than iRBD patients (2.8 ± 2.7) and healthy controls (2.5 ± 2.5). **e** PD patients (5.6 ± 2.2) scored significantly higher ($p < 0.001$) than iRBD patients (0.3 ± 0.8) and healthy controls (0.3 ± 0.8) on the Screening Questionnaire for Parkinsonism. **f** The RBD Screening Questionnaire (RBDSQ) revealed significant differences ($p < 0.001$) between iRBD (9.0 ± 2.7) and PD patients (4.9 ± 3.0) or healthy controls (1.7 ± 1.6), and between PD patients and healthy controls.

Supplementary Table 2 The coefficient of variation of each experiment for α-synuclein SiNaPs and stool samples

	Coefficient of variation [%]	
Experiment	α-synuclein SiNaPs	Stool samples
1	27.22	40.53
2	16.74	25.32
3	17.41	19.34
4	37.19	27.92
5	33.25	22.12
6	25.32	22.11
7	33.05	28.82
8	28.50	25.50
9	36.98	25.31
Mean	28.41	26.33

Supplementary Table 3 LOD values for α-synuclein SiNaPs for each experiment

Experiment	LOD [fM]
1	0.06
2	–
3	0.05
4	0.72
5	0.15
6	0.11
7	0.22
8	0.69
9	0.43
Mean	0.30

LOD, limit of detection

Supplementary Table 4 Number of stool samples above the LOD for each individual experiment

Experiment	Number of samples measured / number of samples above the LOD
1	27 / 27
2	27 / 27
3	24 / 24
4	27 / 27
5	26 / 26
6	26 / 26
7	26 / 26
8	25 / 25
9	9 /9
Sum	**217 / 217**

LOD, limit of detection

Supplementary Table 5 P-values of tests on normal distribution for α-synuclein aggregate concentrations in stool

	PD	iRBD	HC
Shapiro Wilk	0	0	$2.0*10^{-12}$
Lilliefors	$3.5*10^{-39}$	$5.4*10^{-59}$	$5.1*10^{-15}$
Kolmogorov Smirnov	$6.0*10^{-13}$	$1.7*10^{-19}$	$2.5*10^{-5}$
Anderson Darling	$3.7*10^{-54}$	$9.7*10^{-61}$	$1.2*10^{-21}$

PD, Parkinson's disease; iRBD, isolated rapid eye movement sleep behavior disorder; HC, healthy control

Anhang 18 – Weitere Informationen zu Kapitel 4.6

Blömeke et al. Quantitative Detection of α-Synuclein and Tau Oligomers and other Aggregates by Digital Single Particle Counting

Supplementary Table 1 CV% values of each experiment for SiNaPs and CSF samples

	aSyn		Tau	
Experiment	Calibration	Samples	Calibration	Samples
1	18.05	22.08	20.42	18.62
2	22.18	32.86	30.27	19.45
3	17.33	20.71	23.00	15.66
4	14.63	12.58	18.60	10.81
5	11.71	9.16	12.54	8.66
6	14.87	12.70	16.01	9.58
7	16.99	13.86	15.15	10.15
8	10.29	10.58	16.77	10.84
Mean	15.76	16.82	19.10	12.97

Supplementary Table 2 LOD values for aSyn- and Tau silica nanoparticles [fM] for each experiment

Experiment	aSyn	Tau
1	9.59	36.69
2	20.72	70.09
3	6.76	32.04
4	1.67	10.09
5	6.08	-
6	2.43	-
7	3.53	-
8	2.98	19.41
Mean	6.72	33.7

Supplementary Table 3 Number of samples above the LOD for each individual experiment

Experiment	aSyn	Tau
1	11	8
2	13	6
3	18	19
4	23	9
5	17	5
6	27	24
7	20	15
8	27	18
Sum	156	104

Supplementary Table 4 Demographic information, aSyn and Tau aggregate concentrations and blood contamination level of each individual patient CSF sample

Sample	*Diagnosis*	*Sex*	*Deceased*	*Education (years)*	*Age at Sample*	*aSyn aggregate concentration [fM]*	*StdDev aSyn*	*Tau aggregate concentration [fM]*	*StdDev Tau*	*Blood contamination level*
1	AD	Male	True	16	72.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
2	AD	Female	True	12	68.00	3.51	0.30	1.60	0.23	0
3	AD	Male	False	18	75.00	8.84	0.36	0.00	0.00	0
4	AD	Male	True	18	75.00	24.20	3.20	0.00	0.00	0
5	AD	Female	False	6	65.00	75.75	12.31	12.70	0.38	0
6	AD	Female	True	15	65.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
7	AD	Female	False	18	65.00	521.47	116.08	20.11	2.04	4
8	AD	Male	False	11	77.00	9.52	1.14	0.00	0.00	0
9	AD	Female	False	16	76.00	18.48	1.37	0.00	0.00	4
10	AD	Male	True	16	61.00	144.55	14.95	0.00	0.00	0
11	AD	Male	True	12	68.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
12	AD	Male	False	18	66.00	66.46	7.84	0.00	0.00	0
13	AD	Male	False	20	81.00	202.30	16.43	22.69	2.87	0
14	AD	Female	False	16	75.00	156.65	32.57	16.87	2.12	0
15	AD	Male	True	12	69.00	15.41	1.25	0.00	0.00	2
16	AD	Female	False	18	70.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1
17	AD	Female	False	20	75.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
18	AD	Male	False	12	64.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3
19	AD	Male	False	12	73.00	221.12	31.78	19.19	1.78	4
20	AD	Male	False	12	63.00	12.42	2.29	6.79	0.53	4
21	AD	Male	True	16	66.00	37.81	6.06	9.82	0.83	0
22	AD	Male	False	18	68.00	33.69	2.30	35.38	3.16	1
23	AD	Female	False	15	69.00	0.00	0.00	4.93	0.50	4
24	AD	Male	False	12	56.00	0.00	0.00	0.99	0.06	1
25	AD	Male	True	14	55.00	11.58	1.01	10.33	1.09	0
26	AD	Female	False	12	68.00	120.74	16.88	8.98	0.83	0
27	AD	Male	False	16	66.00	8.32	0.66	12.36	0.66	2
28	AD	Male	False	16	59.00	85.40	9.02	20.72	1.71	4

29	DLB	Male	True	12	73.00	12.20	1.76	11.07	1.02	0
30	DLB	Male	False	12	67.00	8.52	1.31	0.00	0.00	0
31	DLB	Female	False	18	68.00	2.57	0.36	0.00	0.00	3
32	DLB	Male	False	16	79.00	886.05	65.57	75.02	4.34	0
33	DLB	Female	False	20	58.00	0.00	0.00	12.05	0.74	0
34	DLB	Female	True	12	66.00	13.02	1.20	14.56	2.10	0
35	DLB	Female	False	14	87.00	2.38	0.22	0.00	0.00	2
36	DLB	Male	False	18	66.00	70.49	6.04	0.00	0.00	0
37	DLB	Male	True	20	66.00	3.75	0.15	0.00	0.00	0
38	DLB	Male	False	14	74.00	0.00	0.00	3.14	0.51	2
39	DLB	Male	True	19	65.00	7.88	0.84	12.38	0.96	0
40	DLB	Male	True	12	70.00	0.00	0.00	13.39	0.53	0
41	DLB	Male	False	12	72.00	370.27	51.32	27.96	3.86	0
42	DLB	Male	False	16	68.00	22.03	3.69	12.43	0.76	0
43	DLB	Male	True	18	63.00	78.99	3.33	8.12	0.60	2
44	DLB	Male	False	14	84.00	13.47	1.75	1.89	0.14	1
45	DLB	Male	False	16	68.00	2949.10	470.68	153.28	17.66	0
46	DLB	Male	False	16	63.00	136.01	24.98	10.69	1.15	2
47	DLB	Female	False	16	68.00	11.73	1.42	12.32	0.51	0
48	N	Female	False	18	70.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3
49	N	Female	False	18	73.00	81.98	22.45	0.00	0.00	0
50	N	Male	False	16	57.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
51	N	Male	False	12	61.00	0.00	0.00	36.89	7.70	2
52	N	Male	False	18	74.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
53	N	Female	True	20	70.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
54	N	Male	True	19	83.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4
55	N	Female	False	18	74.00	0.00	0.00	24.30	4.41	1
56	N	Male	False	18	75.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3
57	N	Female	False	16	58.00	43.36	8.97	0.00	0.00	0
58	N	Male	False	16	67.00	119.16	46.24	37.25	5.88	1
59	N	Female	False	20	69.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3
60	N	Male	False	20	60.00	72.13	8.67	7.79	0.62	0
61	N	Male	False	12	62.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
62	N	Male	False	20	77.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0

63	N	Female	False	18	63.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
64	N	Female	False	12	59.00	602.80	231.60	110.63	16.15	3
65	N	Female	False	20	57.00	13.13	2.78	0.00	0.00	1
66	N	Male	True	12	93.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4
67	N	Female	False	18	80.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2
68	N	Male	False	20	70.00	5.00	0.27	0.00	0.00	0
69	N	Male	False	20	71.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1
70	N	Female	False	20	71.00	17.92	1.72	30.74	1.94	2
71	N	Female	False	20	71.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1
72	N	Female	True	14	89.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
73	N	Female	False	20	66.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4
74	N	Female	False	16	64.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
75	N	Male	False	18	70.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4
76	N	Male	True	20	90.00	112.50	45.08	0.00	0.00	4
77	N	Male	False	12	71.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
78	N	Male	False	4	56.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
79	N	Male	False	20	74.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3
80	N	Male	False	9	66.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
81	N	Male	True	20	80.00	1536.16	572.99	142.57	33.72	4
82	N	Female	False	16	57.00	16.57	1.15	0.00	0.00	0
83	N	Male	False	18	70.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4
84	N	Female	False	18	66.00	6.64	1.21	0.00	0.00	4
85	N	Male	False	18	69.00	29.53	5.15	0.00	0.00	3
86	N	Female	False	14	65.00	7.74	0.55	33.95	2.42	0
87	N	Female	False	18	64.00	5.78	0.41	25.09	2.54	3
88	N	Male	False	12	62.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2
89	N	Female	False	14	66.00	2.25	0.23	0.00	0.00	4
90	N	Male	False	12	57.00	6.19	0.34	30.29	3.81	4
91	N	Male	False	16	74.00	3742.12	361.11	202.57	17.10	4
92	N	Male	False	18	63.00	6.47	0.46	0.00	0.00	4
93	PD	Female	False	16	63.00	0.00	0.00	34.76	12.08	0
94	PD	Male	True	16	76.00	49.27	9.72	0.00	0.00	0
95	PD	Male	True	12	75.00	10229.34	5666.03	1117.47	181.59	4

96	PD	Male	False	16	63.00	621.44	232.23	0.00	0.00	0
97	PD	Male	True	16	64.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1
98	PD	Male	False	18	64.00	3.75	0.43	0.00	0.00	0
99	PD	Female	True	18	80.00	147.24	46.97	32.26	5.74	4
100	PD	Male	True	12	84.00	86.24	19.19	0.10	0.02	4
101	PD	Male	True	14	62.00	131.68	14.47	16.11	1.62	0
102	PD	Female	False	18	66.00	248.19	44.48	16.14	1.21	4
103	PD	Male	False	20	58.00	193.78	91.25	0.00	0.00	4
104	PD	Male	False	16	62.00	75.01	15.85	302.30	78.63	0
105	PD	Male	False	18	87.00	52.49	6.61	0.08	0.01	0
106	PD	Female	False	18	59.00	10.72	1.55	0.00	0.00	4
107	PD	Male	True	16	72.00	146.89	17.61	17.27	1.07	2
108	PD	Male	True	11	77.00	107.68	22.31	10.75	0.51	0
109	PD	Female	False	16	57.00	53.46	6.75	20.61	2.53	3
110	PD	Male	False	18	64.00	4.85	0.54	0.00	0.00	4
111	PD	Male	False	18	67.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4
112	PD	Male	False	18	64.00	17.19	5.94	0.00	0.00	0
113	PD	Male	False	16	65.00	766.49	320.78	47.45	4.65	0
114	PD	Male	True	14	79.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3
115	PD	Male	False	13	67.00	372.84	98.84	61.82	10.50	2
116	PD	Female	False	19	60.00	138.14	46.83	51.90	10.04	0
117	PD	Male	False	16	66.00	289.85	75.62	0.00	0.00	1
118	PD	Male	False	13	59.00	83.84	18.40	0.00	0.00	2
119	PD	Male	False	18	60.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
120	PD	Male	False	16	59.00	40.33	19.68	0.00	0.00	4
121	PD	Male	False	14	56.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1
122	PD	Female	True	18	63.00	8.36	1.42	0.00	0.00	2
123	PD	Male	True	16	73.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1
124	PD	Female	False	17	70.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4
125	PD	Female	False	16	63.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
126	PD	Male	True	20	70.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
127	PD	Female	False	18	67.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
128	PD	Male	False	18	68.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
129	PD	Male	False	16	62.00	16.54	1.44	85.32	5.46	0

130	PD	Female	False	14	61.00	205.19	88.91	0.00	0.00	4
131	PD	Male	True	18	72.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3
132	PD	Male	True	12	64.00	84.34	12.81	21.78	2.25	0
133	PD	Female	False	16	63.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1
134	PD	Male	False	13	57.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
135	PD	Male	False	16	67.00	587.52	134.89	137.76	17.80	0
136	PD	Female	False	18	62.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
137	PD	Male	False	14	54.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
138	PD	Male	True	14	55.00	90.61	15.76	0.00	0.00	4
139	PD	Male	False	20	59.00	51.37	18.63	0.00	0.00	4
140	PD	Male	False	20	66.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
141	PD	Male	False	12	57.00	375.96	64.21	36.13	6.35	3
142	PD	Male	False	16	56.00	11.37	0.76	0.00	0.00	0
143	PD	Male	True	16	72.00	114.05	17.52	9.66	1.37	1
144	PD	Female	False	16	63.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
145	PD	Male	False	18	68.00	229.91	34.62	55.16	7.03	2
146	PD	Female	False	16	65.00	4.95	0.28	19.55	2.14	0
147	PD	Female	False	18	68.00	45.25	5.94	3.94	0.41	4
148	PD	Male	False	18	65.00	11.96	1.18	0.00	0.00	0
149	PD	Male	False	14	76.00	10.05	1.21	0.00	0.00	0
150	PD	Male	False	14	58.00	0.00	0.00	3.79	0.25	0
151	PD	Male	False	16	54.00	24.73	3.97	0.00	0.00	0
152	PD	Female	False	16	72.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4
153	PD	Male	False	20	57.00	10.63	1.11	0.00	0.00	0
154	PD	Male	False	20	71.00	17.15	3.21	0.00	0.00	0
155	PD	Male	False	12	59.00	11.32	1.76	0.00	0.00	0
156	PD	Male	False	20	54.00	76.96	14.31	1.12	0.16	0
157	PD	Female	False	14	71.00	15.56	1.66	32.06	3.42	0
158	PD	Male	False	20	64.00	407.13	62.90	23.01	3.30	0
159	PD	Male	False	18	65.00	4.14	0.22	0.00	0.00	0
160	PD	Female	False	18	65.00	16.94	2.62	0.00	0.00	0
161	PD	Female	False	18	59.00	33.96	5.75	33.04	2.29	0
162	PD	Male	False	18	74.00	21.90	2.51	0.00	0.00	0
163	PD	Female	False	19	67.00	19.12	1.82	19.73	2.60	0

164	PD	Female	False	16	70.00	24.10	1.16	0.00	0.00	0
165	PD	Female	False	16	62.00	73.93	8.92	7.12	0.70	0
166	PD	Female	False	16	58.00	3.32	0.30	0.00	0.00	1
167	PD	Male	False	18	66.00	80.83	7.37	37.98	2.23	0
168	PD	Male	True	16	70.00	23.47	1.86	2.02	0.16	0
169	PD	Female	False	18	52.00	132.21	22.41	0.00	0.00	0
170	PD	Male	False	18	68.00	29.28	6.21	5.66	0.63	3
171	PD	Male	True	12	63.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
172	PD	Male	False	15	75.00	12.28	1.22	0.00	0.00	0
173	PD	Female	False	11	54.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
174	PD	Male	False	13	60.00	14.62	1.33	22.73	2.62	0
175	PD	Male	False	19	62.00	67.99	4.77	0.00	0.00	0
176	PD	Male	False	18	67.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4
177	PD	Male	False	15	62.00	2.81	0.28	0.00	0.00	4
178	PD	Male	False	16	72.00	44.98	4.20	38.38	3.88	3
179	PD	Female	False	14	69.00	8.09	1.20	0.00	0.00	0
180	PD	Male	False	18	63.00	555.58	96.28	33.51	5.21	1
181	PD	Female	False	16	54.00	99.96	22.01	0.00	0.00	0
182	PD	Male	False	18	79.00	13.82	0.93	20.54	4.27	1
183	PD	Female	False	18	77.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
184	PD	Male	False	16	55.00	8.52	0.85	30.14	5.21	0
185	PD	Female	False	18	69.00	7.62	0.88	0.00	0.00	0
186	PD	Female	False	16	77.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
187	PD	Female	False	16	59.00	4.07	0.34	0.41	0.05	0
188	PD	Female	True	12	80.00	35.02	2.98	8.29	0.68	0
189	PD	Female	False	18	69.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4
190	PD	Male	False	16	69.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
191	PD	Male	False	12	69.00	26.32	1.54	0.00	0.00	4
192	PD	Female	False	14	80.00	182.85	20.13	45.89	6.23	1
193	PD	Male	False	13	59.00	35.76	4.22	0.00	0.00	0
194	PD	Male	False	16	75.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4
195	PD	Female	False	14	57.00	19.59	2.02	0.00	0.00	0
196	PD	Male	False	18	74.00	4490.78	1154.13	60.32	4.69	1
197	PD	Male	False	18	70.00	201.21	27.67	0.00	0.00	0

198	PD	Female	True	16	71.00	4384.64	901.04	142.69	16.95	0
199	PD	Female	False	20	77.00	13.83	1.27	0.00	0.00	0
200	PD	Male	False	16	65.00	8.23	0.45	0.00	0.00	0
201	PD	Male	False	18	74.00	187.24	15.78	3.85	0.32	4
202	PD	Female	False	16	54.00	7.15	0.35	0.00	0.00	1
203	PD	Female	False	18	50.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
204	PD	Female	False	20	55.00	40.55	9.22	0.00	0.00	0
205	PD	Male	False	18	74.00	3.64	0.13	0.00	0.00	1
206	PD	Male	False	14	65.00	9.55	0.74	0.00	0.00	0
207	PD	Male	False	18	76.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2
208	PSP	Female	False	12	72.00	1540.61	581.89	480.18	76.40	0
209	PSP	Male	True	10	71.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
210	PSP	Male	True	18	58.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
211	PSP	Male	True	12	56.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4
212	PSP	Male	True	12	72.00	0.00	0.00	50.59	16.29	0
213	PSP	Male	False	12	56.00	2339.34	1093.41	262.56	72.65	0
214	PSP	Male	True	20	71.00	10.56	2.99	53.03	16.28	3
215	PSP	Male	False	20	70.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
216	PSP	Female	False	16	72.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1
217	PSP	Female	False	16	66.00	11.74	1.35	55.46	26.30	0
218	PSP	Female	True	16	64.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
219	PSP	Female	True	19	59.00	288.40	164.91	0.00	0.00	0
220	PSP	Female	False	16	68.00	59.56	26.04	0.00	0.00	1
221	PSP	Male	False	12	68.00	227.69	90.53	87.52	21.84	2
222	PSP	Female	False	12	64.00	9.07	1.28	32.81	2.97	0
223	PSP	Female	False	15	72.00	11.25	2.11	75.38	15.20	0
224	PSP	Female	False	15	71.00	44.69	8.89	65.87	12.89	0
225	PSP	Female	False	16	68.00	0.00	0.00	58.53	1.30	0
226	PSP	Female	False	14	60.00	0.00	0.00	39.49	5.90	0
227	PSP	Female	True	16	63.00	0.00	0.00	155.77	23.57	4
228	PSP	Male	True	18	75.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
229	PSP	Female	False	18	65.00	0.00	0.00	64.98	10.51	1
230	PSP	Female	False	19	72.00	18.51	6.31	112.82	17.52	3
231	PSP	Male	True	14	72.00	70.30	11.02	207.12	23.09	4

232	PSP	Male	False	16	67.00	603.26	166.08	104.81	24.00	0
233	PSP	Female	False	12	78.00	0.00	0.00	32.11	3.07	0
234	PSP	Male	False	16	58.00	17.12	2.93	117.12	23.41	1
235	PSP	Male	False	12	77.00	10.73	0.29	52.67	4.95	3
236	PSP	Male	False	16	65.00	720.76	132.26	156.15	15.01	0
237	PSP	Male	True	16	74.00	21.00	6.02	98.61	10.14	0

Supplementary Table 5 p-values of tests on normal distribution for aSyn and Tau aggregates in CSF

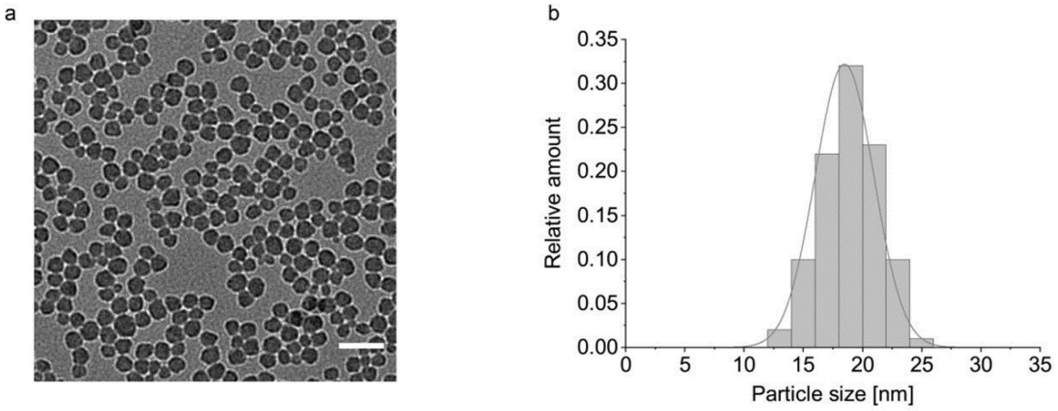
		PD	DLB	AD	PSP	N
aSyn	Shapiro Wilk	0	$7.37*10^{-8}$	$2.44*10^{-7}$	$1.81*10^{-9}$	$9.16*10^{-14}$
	Lilliefors	$7.91*10^{-57}$	$5.73*10^{-9}$	$13.85*10^{-6}$	$1.20*10^{-13}$	$5.24*10^{-26}$
	Kolmogorov Smirnov	$5.72*10^{-18}$	0.0027	0.018	$7.76*10^{-5}$	$8.45*10^{-9}$
	Anderson Darling	$4.18*10^{-76}$	$2.35*10^{-12}$	$5.94*10^{-9}$	$3.00*10^{-17}$	$1.59*10^{-33}$
Tau	Shapiro Wilk	0	$9.03*10^{-7}$	$5.54*10^{-5}$	$4.72*10^{-6}$	$6.85*10^{-12}$
	Lilliefors	$6.56*10^{-57}$	$1.40*10^{-8}$	$3.70*10^{-5}$	$9.74*10^{-4}$	$9.8*10^{-21}$
	Kolmogorov Smirnov	$5.4*10^{-18}$	0.004	0.036	0.103	$4.03*10^{-7}$
	Anderson Darling	$2.12*10^{-69}$	$3.60*10^{-9}$	$4.97*10^{-6}$	$1.35*10^{-5}$	$4.42*10^{-25}$

Supplementary Table 6 Pearson coefficient of correlation values for analysis between aSyn and Tau aggregate concentrations and age, education, sex, disease duration, and death

		All cohorts	PD	DLB	AD	PSP	N
aSyn	Age	0.096	0.157	0.026	0.049	-0.256	0.130
	Education	-0.074	-0.133	0.025	0.183	-0.268	0.009
	Sex	-0.081	-0.061	-0.210	0.179	-0.134	-0.155
	Disease duration	0.093	0.012	0.073	0.130	-0.115	–
	Deceased	0.095	0.226*	-0.225	-0.235	-0.248	0.087
Tau	Age	0.070	0.166	0.031	-0.024	0.016	0.074
	Education	-0.144*	-0.182	-0.001	0.150	-0.258	-0.060
	Sex	-0.043	-0.081	-0.195	-0.060	-0.006	-0.089
	Disease duration	0.068	-0.006	0.106	0.047	0.055	–
	Deceased	0.070	-0.193*	-0.181	-0.357	-0.211	0.085

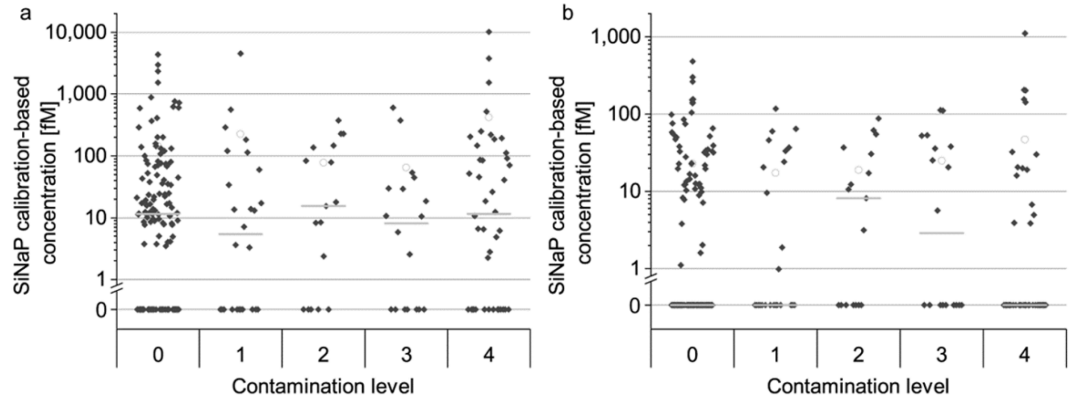
* indicates a significant correlation with p-values between 0.01–0.05

Supplementary Figure 1 TEM image (a) and size distribution (b) of silica nanoparticles



The exemplary image of an aSyn silica nanoparticle (a) shows the typical particle shape of the calibration standard. The scale bar is 50 nm. Aminated silica nanoparticles, which are the basis for peptide conjugation, show a normally distributed particle size with a mean of 18.5 nm (b, normal distribution analysed using Kolmogorov Smirnoff).

Supplementary Figure 2 aSyn (a) and Tau (b) aggregate concentrations grouped by blood-contamination levels



Blood contamination in CSF samples were measured with Combur10 stripes and grouped in 5 contamination levels (0: no contamination, 1: ~10 Ery/µL, 2: ~25 Ery/µL, 3: ~50 Ery/µL, 4: >250 Ery/µL). Higher contamination levels did not result in significant differences in aggregate concentrations (Kruskal-Wallis ANOVA: $p = 0.78$ for aSyn aggregates and $p = 0.63$ for Tau aggregates).

Anhang 19 – Weitere Informationen zu Kapitel 4.7

Disrupted-in-schizophrenia 1 protein aggregates in cerebrospinal fluid are elevated in patients with first-episode psychosis

Supplemental Methods

In the hereby for DISC1 protein aggregates adapted sFIDA assay, samples are incubated on a capture antibody-coated glass surface and both monomeric and aggregated DISC1 species are immobilized. However, since sFIDA uses the same or overlapping epitopes for capturing and detecting, monomeric species are not detected due to the epitope already being blocked by the capture antibody. Specificity is further increased using two differently labeled detection probes targeting the same or overlapping epitopes (Fig. 1). After imaging the glass surface by dual-color total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) only those aggregates are counted that yield signals in both fluorescence channels (co-localization). To reduce background noise, an intensity cutoff is applied and only signals above the cutoff were evaluated (sFIDA readout).

Synthesis of silica nanoparticles coated with DISC738–778

To translate sFIDA readouts into molar aggregate concentration we introduced a silica nanoparticle-based calibration standard (SiNaPs) [1, 2]. In the present study, we used SiNaPs coated with synthetic DISC1 peptide 738–778 (EDKRKTPLKVLEEWKTHLIPSLHCAGGEQKEESYILSAEL-Cysteamine-SH, peptides and elephants GmbH, Henningsdorf, Germany), the epitope of monoclonal antibody 14F2 ([3] see below), for assay development and as assay control. According to the previously published protocol [2], SiNaPs were synthesized via Stöber process and silica surface was functionalized with 3-aminopropyl(triethoxysilane) (APTES, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Afterwards, the carboxy groups of maleimido hexanoic acid (MIHA, abcr GmbH, Karlsruhe, Germany) were activated by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC, Sigma-Aldrich) and N-hydroxysuccinimid (NHS, Sigma-Aldrich) and were coupled covalently to the introduced primary amines on silica surface. Maleimide groups and 14F2 peptides were crosslinked by using C-terminal functionalized DISC1 peptide. Finally, the molar SiNaPs concentration was calculated based on silicon concentration determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) and physical characteristics like size, density as well as shape determined by transmission electron microscopy (TEM).

Synthetic DISC1 aggregates

In addition to DISC1-coated SiNaPs, synthetic DISC1 aggregates were prepared for assay development and analytical validation. To this end, the human DISC1 protein fragment including codon-optimized amino acid residues 598–785 (DISC1 598–785) was cloned and expressed as described previously [4], except that the protein was refolded while on the Ni-NTA column (Qiagen GmbH Germany, Hilden, Germany) by sequentially diluting the 8 M urea extraction buffer by extraction buffer without urea (5 volumes). After elution with 100 mM imidazol-containing elution buffer, DISC1

(598–785) was dialyzed against PBS 10 mM DTT and sonicated in a Misonix S4000MPX sonicator (Qsonica L.L.C, Newtown, CT, USA) for 2.5 min at 93.9 kJ. This preparation was found to be stable in aggregation size over weeks. The majority of the multimers (99%) were determined to possess a hydrodynamic diameter of 41 nm by dynamic light scattering, corresponding to a 421mer, i.e. a large multimer of DISC1 (598-785).

Assay antibody 14F2

For the anti-human DISC1 monoclonal IgG antibody 14F2 (747–768), mice were immunized with recombinant C-terminal human DISC1 fragment (598–785). Hybridoma were generated, the antibody was harvested from FCS-free supernatant [3], dialyzed against PBS and concentrated (Amicon filter tubes, MWCO:10, 2700× *g* for 30 min at 4 °C, Merck, Darmstadt, Germany) to a stock concentration of 2.4 mg/ml. In the sFIDA assay, 14F2 was used for capturing and detection of DISC1 aggregates. For microscopic detection of DISC1 aggregates, 14F2 was labelled according to manufactures' instructions with CF633 and CF488A dye (Biotium, Inc., Fremont, CA, USA), respectively. In carbonate buffer, the succinimidyl ester group of the pre-activated dyes reacted covalently with the amines of the antibody. The fluorescent probes were purified using a polyacrylamide bead suspension (Bio-Gel P-30 Gel, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) and were stored at 4 °C until further use. Antibody concentration and the degree of labelling was determined according to the manufacture's protocol.

sFIDA assay protocol

To reduce the risk of a microbial contamination, all in-house produced buffers and solutions were filtrated (VacuCap 60, 0,22 µm, Pall Corporation, Port Washington, NY, USA) before usage and additionally, the whole sFIDA procedure was carried out under a clean bench to avoid dust and other contaminations. For all washing steps, a microplate washer (405 LS Microplate Washer, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) was used.

For analytical validation and for the proof-of-concept study, sFIDA assays were performed on 384-well microtiter plates (SensoPlate plus, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). As capture, the monoclonal anti-DISC1 antibody 14F2 (7.5 µg/ml in 0.1 M MES buffer (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Germany), pH 3.4) was immobilized on the glass well surface. After washing the wells five times with 80 µl TBS-T (1× TBS (Serva electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) and 0.05% Tween20 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany)) and five times with TBS, the unoccupied well surface was blocked with The Blocking Solution (Candor Bioscience GmbH, Wangen im Allgäu, Germany) for 1.5 h at RT. The plates were washed again with TBS-T and TBS as described above and 20 µl of DISC1-coated SiNaPs, synthetic DISC1 aggregates as well as of each human CSF samples (1:2 diluted in The Blocking Solution) were incubated for 2 h at RT. Afterwards, the wells were washed again with TBS (see above) and were incubated for 1 h at RT with the fluorescently labeled detection antibodies 14F2 CF688 and 14F2 CF488A (each 0.625 µg/ml) in TBS-T with 0.1% BSA (AppliChem GmbH). To reduce background noise, unbound detection probes were removed by five washing steps (as described above) using TBS and finally, the washing buffer was replaced with TBS-ProClin (0.03% ProClin300, Sigma-Aldrich) and the plates were sealed (SealPlate film, Sigma-Aldrich) to avoid contaminations while measuring.

Image Data Acquisition and data analysis

Imaging of the well surface was performed using a total internal reflection microscope (TIRFM, Leica DMI600B, Leica microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) as described previously by Kravchenko et al. [5] In total, 3.14% of the well surface were imaged in two different channels (channel 633: excitation: 635 nm, emission filter: 705/72 nm; channel 488: excitation: 488 nm, emission filter: 525/36 nm, exposure time: 500 ms, gain: 800). Images comprising 1000 × 1000 pixels and representing an area of 113.76 µm × 113.76 µm were analyzed using an in-house developed software that features automated artifact elimination and counting co-localized pixels. The sFIDA readout is referred to as the average number of pixels within an image that exceed a pre-defined cutoff value and are co-localized in both fluorescence channels. To this end, blank control-based cutoffs were defined as the signal intensity exceeding 0.05% for analytical validation studies, while the cutoff for the analysis of the whole dataset of human CSF samples was 0.005%. Due to fluctuations of the absolute fluorescence intensities for plate 1 of the proof-of-concept study, for this plate MinMax filtering [2] with 5% was applied. Statistical analysis was performed using OriginPro2017 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) and matlab2019b (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) software.

Analytical validation

Prior to measurement of the human CSF samples, the analytical performance of the developed sFIDA assay for DISC1 aggregates quantification was validated. As mentioned above, only DISC1-coated SiNaPs and synthetic DISC1 aggregates could be used for these studies, as human CSF samples were limited. For each study, the sFIDA surface was coated as described above. Afterwards, dilution series (1:5 in dilution buffer, quadruplicates) of both targets were applied according to individual study protocols and after incubation with detection probes, the assay surface was scanned via TIRFM. For analysis, a cutoff of 0.05% of blank control values was used to determine the number of co-localized DISC1 aggregates.

Assay sensitivity and intra-assay variability

First, we evaluated whether we could accurately detect and quantify DISC1-coated SiNaPs and synthetic DISC1 aggregates by investigating parameters such as Limit of Detection (LoD), Lower Limit of Quantification (LLoQ) and CV%. To this end, calibration standards and synthetic DISC1 aggregates were diluted in The Blocking Solution (1:5 dilution series) with concentrations ranging from 237 pM to 0.02 pM of DISC1-coated SiNaPs and 20 nM to 1.2 pM of synthetic DISC1 aggregates, respectively (Supplementary Fig. 1). Please note that the concentration of synthetic DISC1 aggregates refers to the used molar sub-unit concentration. Linear regression was performed with the sFIDA readouts weighted by 1/readout to calculate the calibration curve (matlab2019b software). For this calculation, only DISC1-coated SiNaPs concentrations were included that were in the linear measurement range and differed significantly from blank control (determined with one-sided Mann-Whitney U test with a confidence interval of 0.05%). Afterwards, LoD and LLoQ were calculated using Eq. 1a and Eq. 1b and translated into femtomolar concentration using determined calibration curve.

$$(1a) \quad \mathrm{LoD\ [fM]} = \mathrm{sFIDA\ readout\ (blank\ control)} + 3\sigma$$

$$(1b) \quad \mathrm{LLoQ\ [fM]} = \mathrm{sFIDA\ readout\ (blank\ control)} + 10\sigma$$

The intra-assay variability was defined by the CV% value, using mean and standard deviation of the quadruplicates for calculation while values below 20% are accepted and displays low variance between the replicates.

Assay comparability

To investigate inter-assay variability, dilution series of DISC1-coated SiNaPs and synthetic DISC1 aggregates were prepared and subjected on two different assay runs by the same operator with one-week time interval. In addition, to verify inter-machine variability, one of the prepared microtiter plates of inter-assay testing was measured on two different TIRF microscopes. Comparability was calculated by the percentage ratio of the observed and expected sFIDA readouts (Eq. 2) while values between 80–120% were accepted. For the illustration of the results, the measured sFIDA readouts of both measurements or for both TIRF microscopes were plotted against each other (Supplementary Fig. 2).

$$(2) \quad \mathrm{assay\ comparability\ [\%]} = \frac{\mathrm{observed\ sFIDA\ readouts}}{\mathrm{expected\ \ sFIDA\ readouts}} \times 100\%$$

Assay selectivity

To determine assay selectivity, DISC1-coated SiNaPs (237 pM, molar particle concentration) and synthetic DISC1 aggregates (20 nM, molar sub-unit concentration) were applied on different sFIDA setups (Supplementary Fig. 3). Unspecific binding of DISC1 species to the blocking agent should be revealed by omitting the capture antibody (capture control, CC). In addition, autofluorescence (AF) from assay buffers was assayed by omitting the detection probe. Furthermore, the cross-reactivity of anti-A□-antibodies (CR) against the immobilized DISC1 species was also tested. For each assay control setup the ratio of observed and expected (reference, normal assay setup) values as well as the percentage amount of reduced signal was calculated according to Eq. 3a and Eq.3b.

$$(3a) \quad \frac{\mathrm{O}}{\mathrm{E}}[\%] = \frac{\mathrm{observed\ readout\ assay\ control}}{\mathrm{expected\ readout\ reference}} \times 100\%$$

$$(3b) \quad \mathrm{signal\ reduction\ [\%]} = 100 - \mathrm{O/E}$$

Proof-of-concept study

After successful analytical validation of the developed sFIDA assay, we determined DISC1 aggregate levels in 169 human CSF samples using the sFIDA protocol described above. One sample was excluded from further analyses due to artificial images in all four replicates. In addition, after unblinding, we used only those CSF samples for further statistical analysis where clinical diagnoses were available both at the time of initial admission and re-assessment. Therefore, all further information and statistics refer to a total of 97 CSF samples including 50 samples from first-episode psychosis patients (FEP, n=50, 31 male, 19 females) and healthy controls (HC, n=47, 20 male, 27 females).

Normalization of sFIDA readouts and statistics

Because unblinding of the human CSF samples revealed an uneven distribution of healthy controls and FEP samples of all three plates (plate 1: 8 HC, plate 2: 12 HC, plate 3: 27 HC), we normalized the sFIDA readouts based on HC samples to eliminate bias from the statistical results. To this end, the sFIDA readouts of each plate were multiplied by an individual normalization factor (Eq. 4).

$$(4) \quad \text{normalization factor}_{\text{x}} = \frac{\text{mean}_{\text{HC}}\ \text{all plates}}{\text{mean}_{\text{HC}}\ \text{plate x}}$$

Therefore, all sFIDA readouts of plate 1 were multiplied by 0.806, those of plate 2 by 0.980 and those of plate 3 by 1.087 (Supplementary Tab. 1).

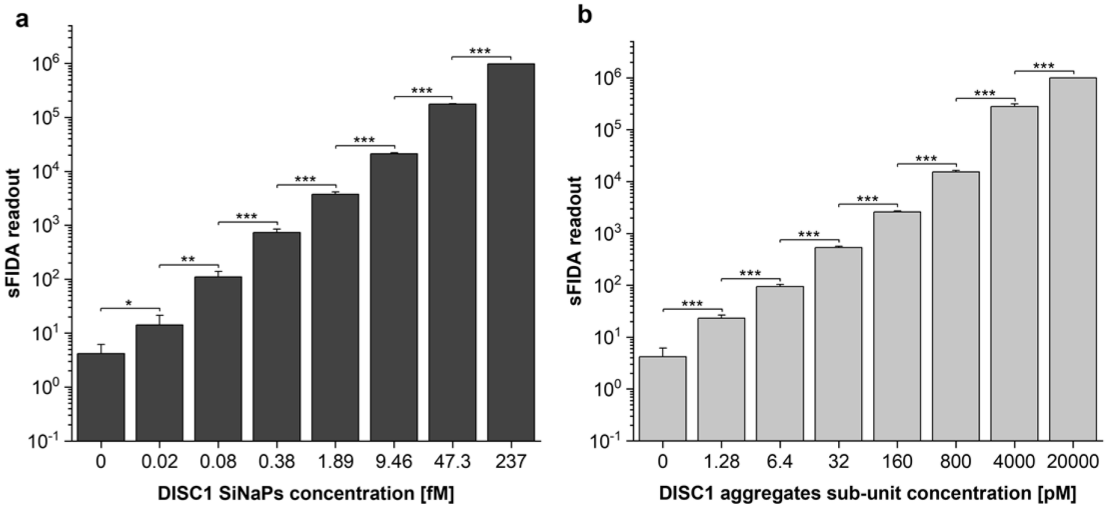
Next, we tested the normalized sFIDA readouts for normal distribution (Shapiro-Wilk, Lilliefors, Kolmogorov-Smirnov, Anderson-Darling). Since the data mainly showed non-normal distributions, (p-value < 0.05, Supplementary Tab. 2) statistical analysis was performed using non-parametric tests like Mann-Whitney U test or Spearman's correlation. To quantify how accurately sFIDA can discriminate between different diagnostic groups, we performed receiver operating characteristic (ROC) analysis, including the determination of percentage diagnostic sensitivity and specificity, area under the curve (AUC) and the respective p-value. To this end, the optimal combination of diagnostic sensitivity and diagnostic specificity was calculated with a maximized Youden's index. To reveal possible correlations between normalized sFIDA readouts and age or BMI, respectively, we used non-parametric Spearman correlation, both for all 97 samples and for the individual cohorts. In addition, we investigated whether age, smoking, or medication had an effect on the determined sFIDA readouts. To this end, we classified the normalized sFIDA readouts based on the clinical cohorts (HC and FEP) and tested for significant differences using two-sided Mann Whitney U test. To examine whether the levels of DISC1 aggregates in CSF change over time, we compared the normalized sFIDA readouts at baseline with those at the follow-up time point using Wilcoxon rank sum test. Since longitudinal samples were not available for all participants, only those with baseline and follow-up samples were included in the analysis (HC n=15; FEP n=21).

DISC1 SNP analysis

GWAS data from 59 samples were available for the analysis of DISC1 SNPs. The data was mapped to the reference genome utilizing the bwa tool [6]. Following this, duplicate alignments were removed, and the data was recalibrated and tidied using the GATK tool [7]. Qualimap [8] was employed to compile the quality control data. Single nucleotide variants (SNVs) and insertions/deletions (indels) were identified with the help of the HaplotypeCaller of GATK tool. Furthermore, these variants were assigned functional annotations using snpEff [9]. The entire procedure was carried out via the Piper [10] workflow engine. Furthermore DISC1 SNPs we were interested in the samples were identified using software package VCFtools [6].

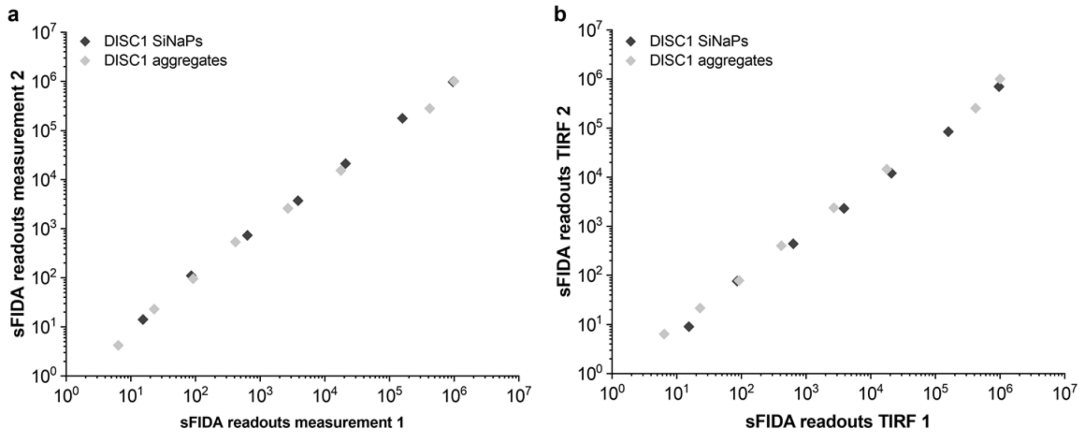
Supporting Figures

Supporting Fig. 1. sFIDA readout of DISC1 SiNaPs (a) and synthetic DISC1 aggregates (b) diluted in The Blocking Solution.



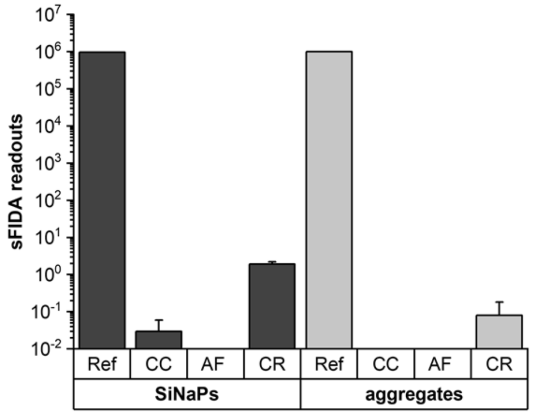
Columns and error bars represent the calculated arithmetic mean and standard deviations from a fourfold determination of DISC1 SiNaPs and synthetic DISC1 aggregates, respectively. The blank control was determined 8-fold. To decrease background noise, blank control-based cutoffs were defined as the signal intensity exceeding 0.05% of total pixels. Significant difference between each concentration compared to the next lower one was determined by one-sided Mann-Whitney U test (confidence interval 0.05, * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$). For both targets, a linear correlation between sFIDA readout and the applied concentration was observed, indicated by a Pearson's coefficient of correlation r=0.9997 for DISC1 SiNaPs and r=0.9958 for DISC1 aggregates. For calculation of the calibration curve, all DISC1 SiNaPs concentrations were included, since all of them were in the linear measurement range and significantly differed from blank control. Using calibration curve (y=3.908x-13.79, R^2=0.9828), LoD and LloQ were calculated based on blank control readouts to 6.08 fM and 9.54 fM, respectively. In addition, intra-assay variability was determined with a mean CV% of 15.8% for DISC1 SiNaPs and 7.9% for synthetic DISC1 aggregates, respectively.

Supporting Fig. 2. sFIDA readouts of inter-assay (a) and inter-machine (b) testing to determine assay comparability.



We investigated both inter-assay and inter-machine variability, respectively, of the sFIDA assay for DISC1 SiNaPs and DISC1 aggregates. **(a)** sFIDA readouts of two independent measurements of both targets by the same operator on different days. **(b)** Testing inter-machine variations, the same assay plate was measured on two different TIRF microscopes (TIRF 1 and TIRF 2). The developed assay is able to achieve comparable results within two independent experiments as indicated by an average percent comparability (Eq. 2) of 106.5% for DISC1 SiNaPs and 97.5% for DISC1 aggregate dilution series. In addition, both TIRF microscopes delivered similar results, with a percent comparability of 98.7% for DISC1 SiNaPs and 91.3% for DISC1 aggregate dilution series.

Supporting Fig. 3. Assessment of assay selectivity.



To assess assay selectivity, we applied DISC1 SiNaPs (237 pM, molar particle concentration) and synthetic DISC1 aggregates (20 nM, molar sub-unit concentration) on the standard assay surface (reference, ref) as well as on various assay controls setups (CC: capture control w/o capture antibody; AF: autofluorescence control w/o detection antibodies; CR: cross-reactivity control, detection antibodies directed against amyloid β). Afterwards, observed sFIDA readouts of each assay control were compared to reference values and percent signal reduction was calculated (Eq. 3a and 3b). For both DISC1 SiNaPs and synthetic DISC1 aggregates, the sFIDA readouts were reduced by 99–100% in all controls.

Supplementary Tables

Supplementary Tab. 1. Normalization factors for individual plates.

Plate No.	Normalization factor
1	0.80649
2	0.97952
3	1.08741

Supplementary Tab. 2. Results of different tests on normal distribution of the normalized sFIDA readouts.

	Shapiro-Wilk	Lilliefors	Kolmogorov-Smirnov	Anderson-Darling
p-values	5.69×10^{-8}	3.46×10^{-4}	0.068	6.41×10^{-7}

p-values < 0.05 indicated non-normal distribution of the data.

Supplementary Tab. 3. Spearman coefficient of correlation values for analysis between normalized sFIDA readouts of DISC1 aggregates and age and BMI.

Spearman r	all cohorts	HC	FEP
Age	–0.0623 (p: 0.5445)	–0.2399 (p: 0.1043)	–0.0032 (p: 0.9824)
BMI	–0.0859 (p: 0.4027)	0.0040 (p: 0.9788)	–0.1660 (p: 0.2494)

No significant correlation was found.

Supplementary Tab. 4. Results of two-sided Mann Whitney U test for analysis of possible influences of sex, smoking, and medication on levels of aggregated DISC1 in CSF samples.

	comparison	HC (p-value)	FEP (p-value)
sex	female vs. male	0.8464	0.6033
nicotine	yes vs. no	0.4550	0.2435
medication	yes vs. no	-	0.2797

Confidence interval 0.05.

Supplementary Tab. 5. Association of common DISC1 gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) with HC or FEP groups.

	HC (n=18)	FEP (n=41)	p-value	Bonferroni-Holm corrected p-value
rs821577 (T/G)	16	24	*0.033*	0.33
rs6675281 (C/T)	6	6	0.158	1.58
rs1538979 (C/T)	7	11	0.374	3.74
rs3738401 (G/A)	5	18	0.385	3.85
rs1322784 (G/A)	18	38	0.546	5.46
rs17817356 (G/A)	10	27	0.561	5.61
rs821616 (A/T)	9	17	0.58	5.8
rs1331046 (C/A)	3	7	1	10
rs1765805 (T/A)	16	35	1	10

Supplementary Tab. 6. Comparison of DISC1 oligomer levels for each *DISC1* SNP for all samples.

	p-value	Bonferroni-Holm corrected p-value
rs821577 (T/G)	*0.043*	0.43
rs1538979 (C/T)	0.214	2.14
rs1765805 (T/A)	0.228	2.28
rs6675281 (C/T)	0.314	3.14
rs1322784 (G/A)	0.523	5.23
rs3738401 (G/A)	0.524	5.24
rs17817356 (G/A)	0.589	5.89
rs821616 (A/T)	0.813	8.13
rs1331046 (C/A)	0.92	9.2

Pairwise comparison of DISC1 oligomer levels for each selected *DISC1* SNP (left column, (reference nucleotide/alternative nucleotide)) with the two-tailed Mann Whitney U test, confidence interval 0.05. Even though rs821577 is significant (written in italics), significance is lost after Bonferroni-Holm correction for multiple testing. *T* thymine, *G* guanine, *C* cytosine, *A* adenine.

Supplementary Tab. 7. P-values of Mann-Whitney U test for comparison of observed sFIDA readouts of healthy controls and FEP group or subgroup according to their initial preliminary diagnosis.

HC vs.	p-value
FEP	*0.0257*
ATPDU	-
DD	0.2363
HS	-
MD	-
OS	0.1778
PS	0.4008
SAD	-
SU	0.0903
UNO	*0.0048*

Significant differences (p-values < 0.05) between FEP (sub)group and HC are written in italics. Please note that for the comparison of HC vs group FEP two-sided and for the comparison of HC vs each subgroup one-sided Mann-Whitney U test was performed, respectively. No Mann-Whitney U test was performed for ATPDU, HS, MD and SAD, as only one value was available.

HC healthy control, *FEP* first-episode psychosis patients, *ATPDU* Acute and transient psychotic disorder, unspecified (DSM IV 298.8), *DD* Delusional Disorders (DSM IV 297.1), *HS* hebephrenic schizophrenia (DSM IV 295.10), *MD* Major depressive disorder (DSM IV 296.21), *OS* Other Schizophrenia (DSM IV 295.40), *PS* Paranoid schizophrenia (DSM IV 295.30), *SAD* Schizoaffective disorder (DSM IV 295.70), *SU* Schizophrenia, unspecified (DSM IV 295.9), *UNO* Unspecified nonorganic psychosis (DSM IV 298.9).

References

1. Hülsemann M, Zafiu C, Kühbach K et al. Biofunctionalized Silica Nanoparticles: Standards in Amyloid-β Oligomer-Based Diagnosis of Alzheimer's Disease. . *J Alzheimers Dis.* 2016; **54**: 79-88.

2. Blömeke L, Pils M, Kraemer-Schulien V et al. Quantitative detection of α-Synuclein and Tau oligomers and other aggregates by digital single particle counting. . *NPJ Parkinsons Dis.* 2022; **8(1):68**: 68.

3. Ottis P, Bader V, Trossbach S et al. Convergence of two independent mental disease genes on the protein level: recruitment of dysbindin to cell invasive DISC1 aggresomes. *Biol Psychiatry* 2011; **70**: 604-10.

4. Leliveld SR, Hendriks P, Michel M et al. Oligomer assembly of the C-terminal DISC1 domain (640-854) is controlled by self-association motifs and disease-associated polymorphism S704C. *Biochemistry* 2009; **48**: 7746-55.

5. Kravchenko K, Kulawik A, Hülsemann M et al. Analysis of anticoagulants for blood-based quantitation of amyloid β oligomers in the sFIDA assay. . *Biol. Chem.* 2017; **398**: 465-475.

6. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2010; **26**: 589-95.

7. Auwera G, O'Connor BD. *Genomics in the cloud: using Docker, GATK, and WDL in Terra,*. O'Reilly Media, Sebastopol, CA., 2020.

8. Okonechnikov K, Conesa A, Garcia-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 2016; **32**: 292-4.

9. Cingolani P, Platts A, Wang le L et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of Drosophila melanogaster strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 2012; **6**: 80-92.

10. Dahlberg J. piper: A genomics pipeline build on top of the GATK Queue framework. National Genomics Infrastructure. 2016.

11. Kay SR, Fiszbein A, Opler LA. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull* 1987; **13**: 261-76.

12. Aas IH. Guidelines for rating Global Assessment of Functioning (GAF). *Ann Gen Psychiatry* 2011; **10**: 2.

13. Busner J, Targum SD. The clinical global impressions scale: applying a research tool in clinical practice. *Psychiatry (Edgmont)* 2007; **4**: 28-37.

14. Nuechterlein KH, Green MF, Kern RS et al. The MATRICS Consensus Cognitive Battery, part 1: test selection, reliability, and validity. *Am J Psychiatry* 2008; **165**: 203-13.

15. Hennah W, Thomson P, McQuillin A et al. DISC1 association, heterogeneity and interplay in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 2009; **14**: 865-73.

Anhang 20 – Weitere Informationen zu Kapitel 4.8

Kass et al. Aβ oligomer concentration in mouse and human brain and its drug-induced reduction ex vivo

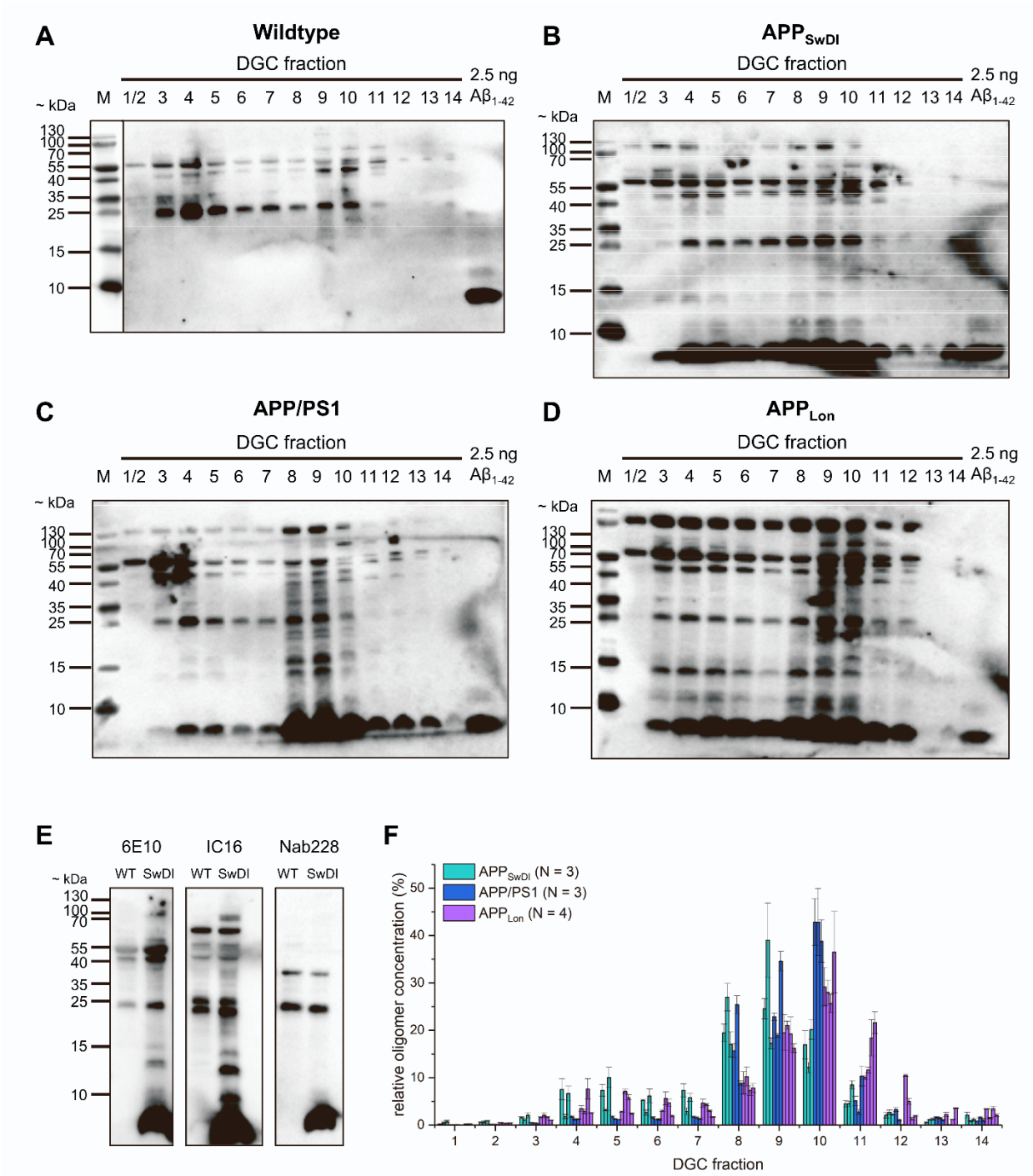


Figure S1: Full Western blots of mouse samples and sFIDA data from all individual animals, related to **Fig 1.**
(A) to (D): Western Blot analysis of undiluted DGC fractions (12 µl per lane) of one representative animal per group in comparison to a synthetic $A\beta_{1-42}$ standard. Blots were probed with monoclonal antibody 6E10. (A) wildtype, (B) APP_{SwDI} hom., (C) APP/PS1 het., (D) APP_{Lon} het.
(E): Brain homogenates of one wildtype or APP_{SwDI} mouse (30 µg protein per lane) were probed with monoclonal antibodies 6E10, IC16 or Nab228, each at a concentration of 1 µg/ml. (F): Relative Aβ oligomer concentrations of DGC fractions of different mouse models, displaying individual data points for each individual animal.

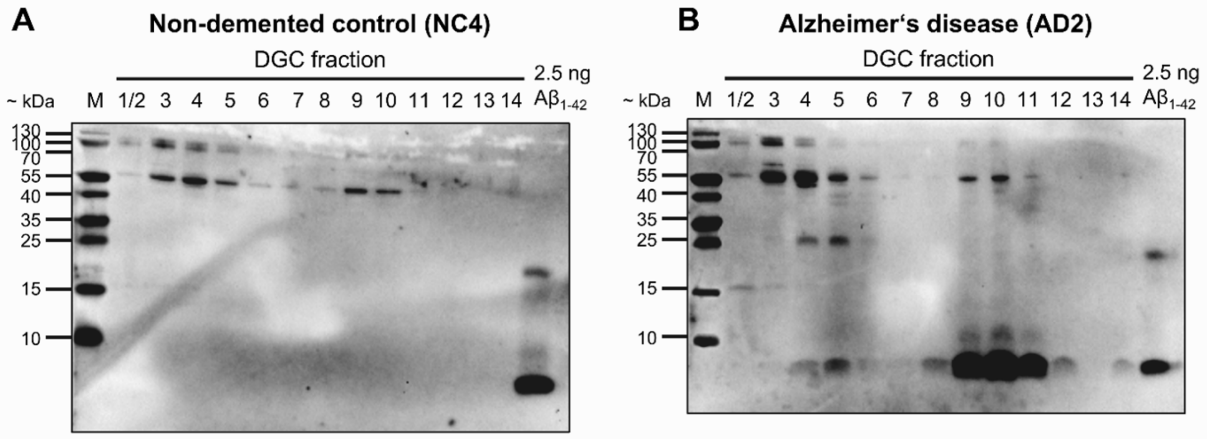


Figure S2: Full Western blots of human samples, related to **Fig 2.**
Western Blot analysis of undiluted DGC fractions (12 µl per lane) of one representative human brain sample per group in comparison to a synthetic $A\beta_{1-42}$ standard. (A) Non-demented control, (B) Alzheimer's disease. Blots were probed with monoclonal antibody 6E10 at a concentration of 1 µg/ml.

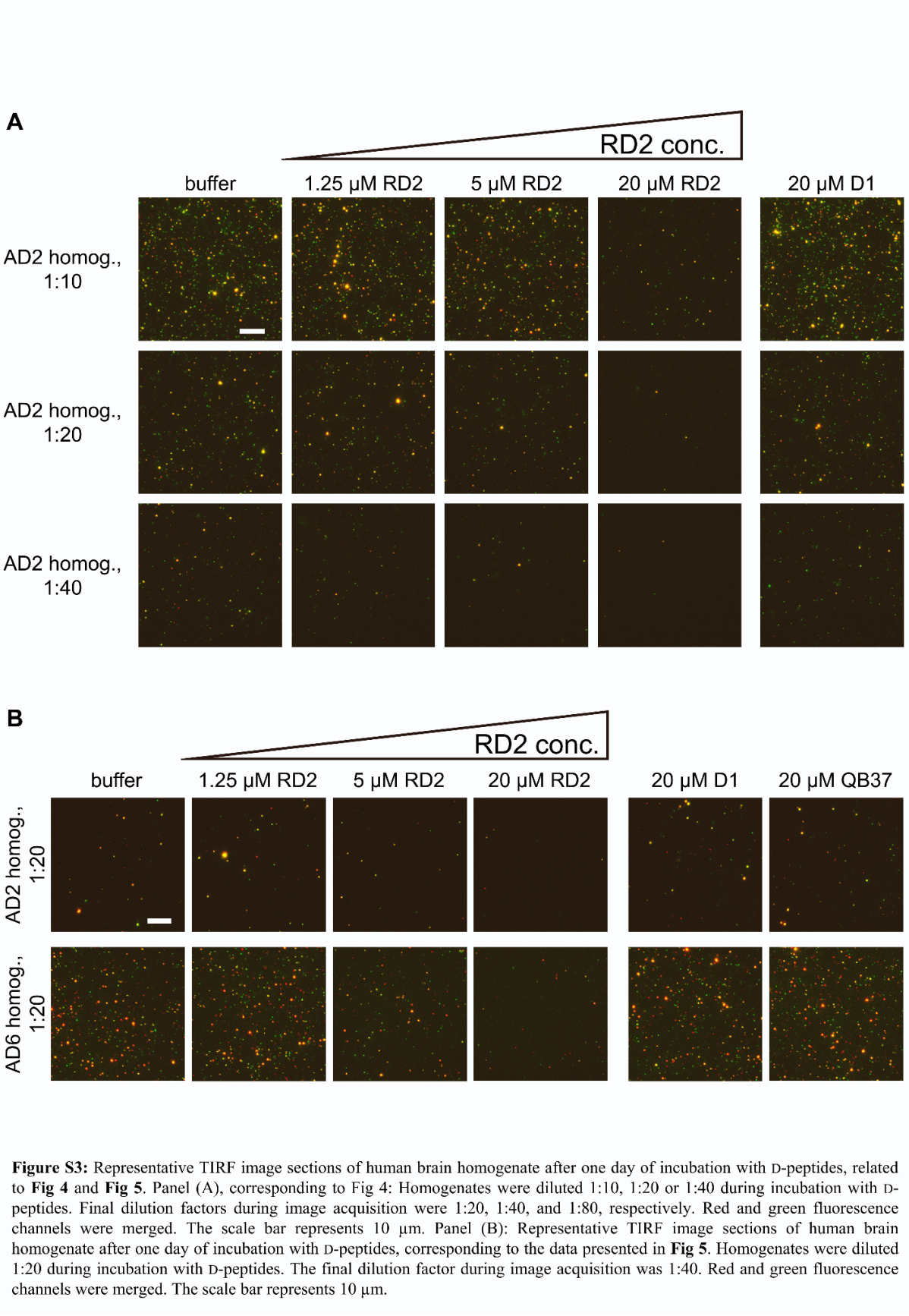


Figure S3: Representative TIRF image sections of human brain homogenate after one day of incubation with D-peptides, related to **Fig 4** and **Fig 5**. Panel (A), corresponding to Fig 4: Homogenates were diluted 1:10, 1:20 or 1:40 during incubation with D-peptides. Final dilution factors during image acquisition were 1:20, 1:40, and 1:80, respectively. Red and green fluorescence channels were merged. The scale bar represents 10 µm. Panel (B): Representative TIRF image sections of human brain homogenate after one day of incubation with D-peptides, corresponding to the data presented in **Fig 5**. Homogenates were diluted 1:20 during incubation with D-peptides. The final dilution factor during image acquisition was 1:40. Red and green fluorescence channels were merged. The scale bar represents 10 µm.

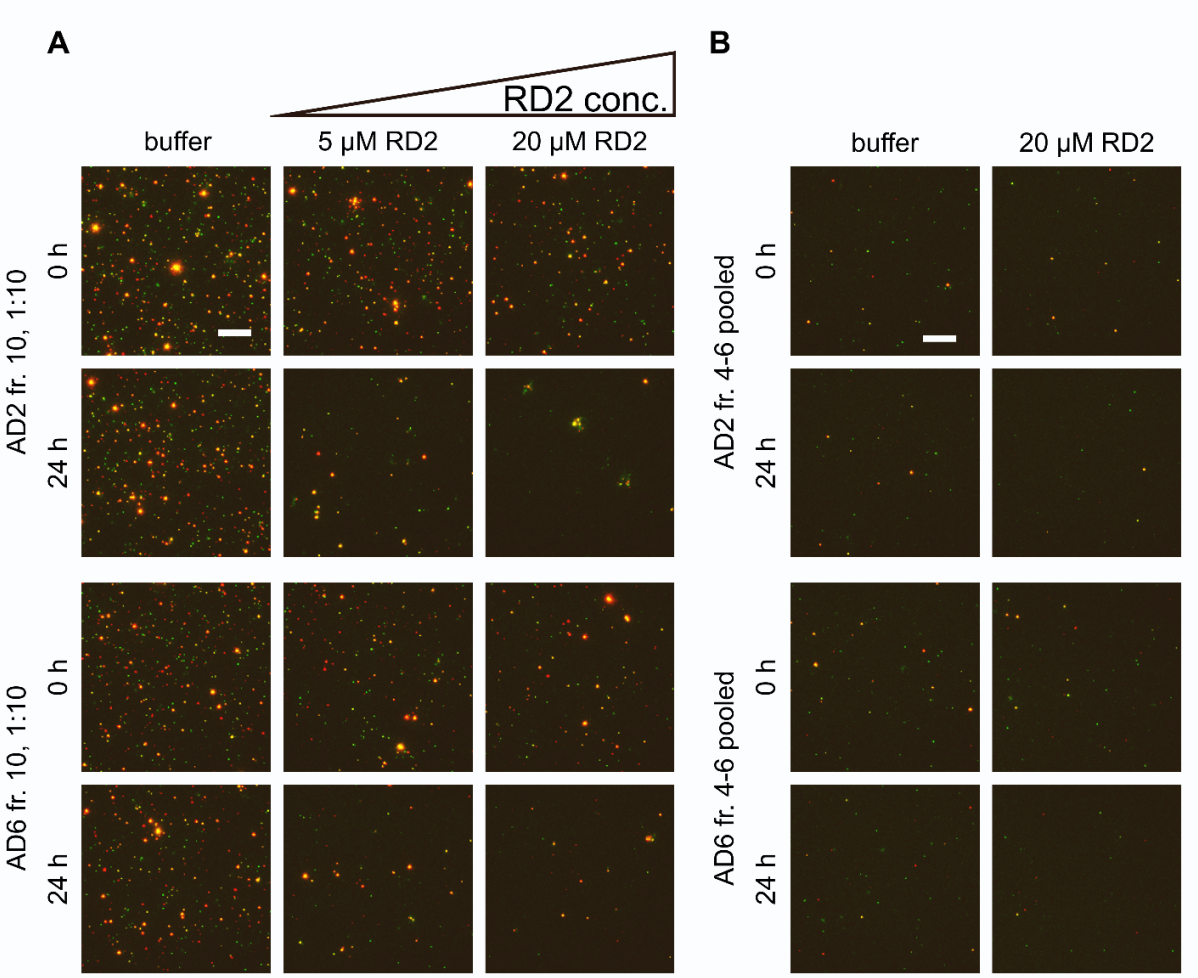
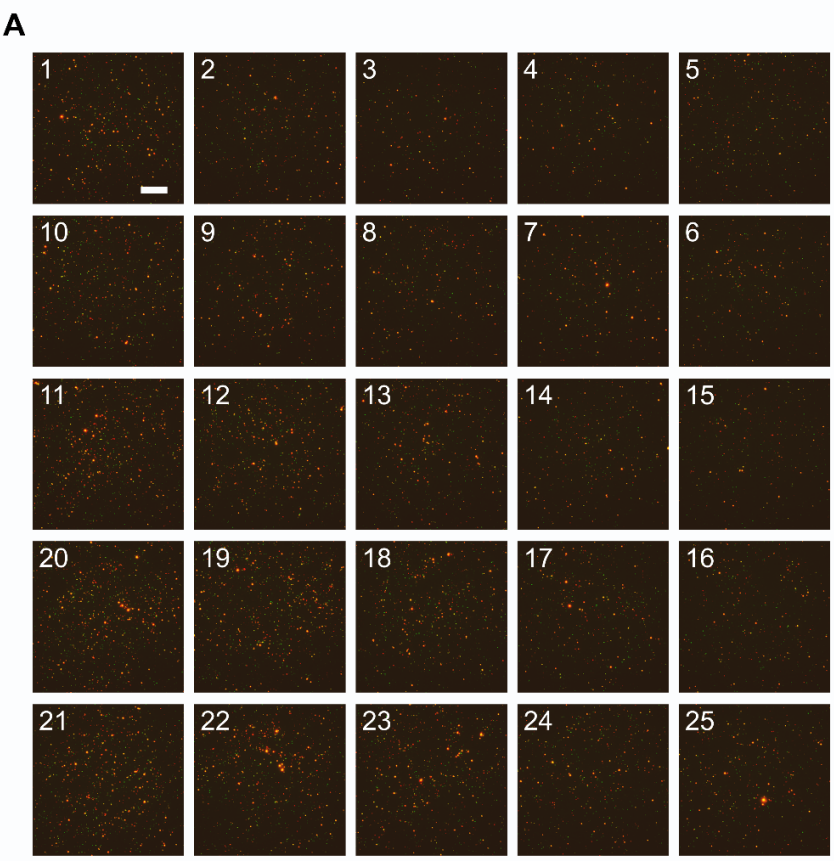


Figure S4, related to **Fig 6:** Representative TIRF image sections of DGC-obtained fractions of human brain homogenate after one day of incubation with RD2. Red and green fluorescence channels were merged. The scale bar represents 10 µm. (A) Images corresponding to the analysis of ex vivo target engagement in fraction 10 of human AD brain homogenates. Fraction 10 was diluted 1:10 during incubation with D-peptides. The final dilution factor during image acquisition was 1:20 (B) Images corresponding to the analysis of ex vivo target engagement in pooled fractions 4 to 6 of human AD brain homogenates. The final dilution factor during image acquisition was 1:2.



D

$$LOD[fM] = \frac{(sFIDA\ readout_{0\,pM} + 3 \times std\ dev_{0\,pM}) - b}{m} \times 1000$$

$$LLOQ[fM] = \frac{(sFIDA\ readout_{0\,pM} + 10 \times std\ dev_{0\,pM}) - b}{m} \times 1000$$

Figure S5, related to **STAR methods:** Acquisition of sFIDA image data and calculation of concentrations using silica nanoparticle (SiNaP) standards. (A) 25 TIRF images per well are taken in the red and green channel in the order indicated by the numbers 1 to 25. Each sample is measured in triplicate, resulting in a total of 75 images used for analysis. Overlays of red and green channels are shown. The sample depicted here is human AD brain homogenate, diluted 1:20 – corresponding to a final dilution during image acquisition of 1:40. The scale bar represents 20 µm. (B) Co-localized pixels exceeding the background intensity threshold based on the 0.01% pixels with the highest intensity in the buffer control (0 pM SiNaP) are counted to calculate the sFIDA readout. Results in (B) and (C) are displayed as mean ± SD, N = 3 (technical replicates). Please note the logarithmic scale in (B). (C) A serial dilution of SiNaPs coated with a defined number of $A\beta_{1\text{-}15}$ epitopes is used to calculate the concentration of biological samples by linear regression. (D) The limit of detection (LOD) and lower limit of quantitation (LLOQ) are calculated using the slope *m* and Y-axis intercept *b* of the linear regression line.

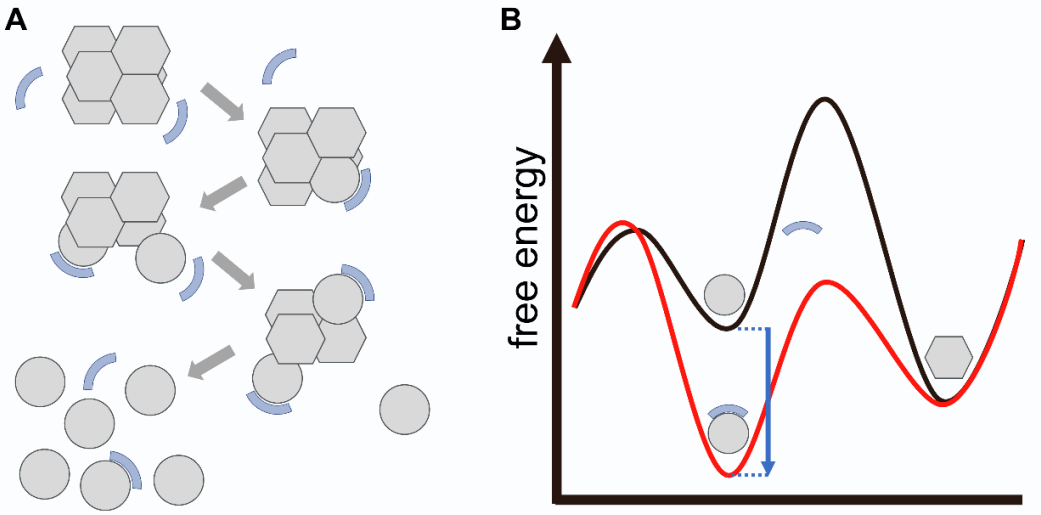


Figure S6, related to **Fig 5:** Proposed mode of action for RD2. (A) RD2 was designed to stabilize Aβ monomers in their native, intrinsically disordered conformation – symbolized by circles. This conformation is distinct from the yet unknown, but certainly highly defined beta-sheet-rich conformation of Aβ building blocks in Aβ oligomers[1] – symbolized by hexagons. Explanation from top to bottom: RD2 molecules – symbolized by circle segments – approach Aβ oligomers. Due to their affinity to Aβ monomers, each RD2 molecule will interact with one of the Aβ building blocks within the Aβ oligomer assembly and thereby pushes its conformation towards the intrinsically disordered monomer conformation. This is incompatible with the oligomer assembly and therefore destabilizing the oligomer assembly. Further destabilization by interaction of additional RD2 molecules with other monomer building blocks, ultimately leads to the complete disassembly of the oligomer into Aβ monomers in their native intrinsically disordered conformation. The affinity between RD2 and Aβ monomers is in the nanomolar KD range although both molecules remain disordered in this transient complex[2], which may therefore be called "fuzzy complex"[3]. The mode of action as shown above, predicts three important properties of RD2. First, because less RD2 molecules are needed than Aβ monomer building blocks are present, RD2 acts at sub-stoichiometric concentrations. We have shown previously, that even at 1:10 sub-stoichiometric ratios, RD2 is efficiently disassembling Aβ oligomers. Second, such destabilization of oligomers by RD2 can be expected to be cooperative. Indeed, we found a Hill coefficient of 3[2]. Third, because RD2 is practically folding Aβ building blocks from oligomers back to their monomeric conformation, RD2 is acting similar to chaperone. Whether this may be called a truly catalytic activity remains to be demonstrated. We called this mode of action "anti-prionic", because it is ultimately disrupting prion-like behaving aggregates[4]. (B) Qualitative and schematic free energy landscape for the anti-prionic mode of action. The black line represents the energy landscape in absence of RD2. Aβ oligomers are more stable than monomers. This allows the formation of oligomers from monomers thermodynamically, although there is a kinetic barrier, which is called primary nucleation and currently under intensive investigation[5,6]. Stabilization of the Aβ monomer by RD2 is lowering the free energy of the Aβ monomer (red line), when in complex with RD2 by the free binding energy (blue arrow) of the complex. Thus, in the presence of RD2, the monomer has a lower free energy as compared to the oligomer, oligomers are disassembled with a reaction rate that is RD2 and Aβ oligomer concentration dependent, exactly as is demonstrated here in this work (Figure 5).

1. König AS, Rösener NS, Gremer L, Tusche M, Flender D, Reinartz E, Hoyer W, Neudecker P, Willbold D, Heise H. Structural details of amyloid β oligomers in complex with human prion protein as revealed by solid-state MAS NMR spectroscopy. J Biol Chem. 2021;296:100499.
2. Zhang T, Gering I, Kutzsche J, Nagel-Steger L, Willbold D. Toward the mode of action of the clinical stage all-D-enantiomeric peptide RD2 on Aβ42 aggregation. ACS Chem Neurosci. 2019;10(12):4800-9.
3. Borgia A, Borgia MB, Bugge K, Kissling VM, Heidarsson PO, Fernandes CB, Sottini A, Soranno A, Buholzer KJ, Nettels D, et al. Extreme disorder in an ultrahigh-affinity protein complex. Nature. 2018;555(7694):61-6.
4. Willbold D, Kutzsche J. Do we need anti-prion compounds to treat Alzheimer's disease? Molecules. 2019;24(12).
5. Noji M, Samejima T, Yamaguchi K, So M, Yuzu K, Chatani E, Akazawa-Ogawa Y, Hagihara Y, Kawata Y, Ikenaka K, et al. Breakdown of supersaturation barrier links protein folding to amyloid formation. Communications Biology. 2021;4(1):120.
6. Meisl G, Kirkegaard JB, Arosio P, Michaels TCT, Vendruscolo M, Dobson CM, Linse S, Knowles TPJ. Molecular mechanisms of protein aggregation from global fitting of kinetic models. Nature Protocols. 2016;11(2):252-72.

Table S1: Summary of statistical analyses, related to **STAR methods, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6**

Figure	ANOVA	*Post hoc* analysis	Degrees of freedom	
3B	Kruskal-Wallis One-way ANOVA on ranks	Student-Newman-Keuls	4	H: 12.233, P = 0.016
4A	One-way ANOVA	Student-Newman-Keuls	8	F: 7.513, P = <0.001
4B	One-way ANOVA	Student-Newman-Keuls	8	F: 15.667, P = <0.001
4C	One-way ANOVA	Student-Newman-Keuls	8	F: 30.803, P = <0.001
5A	Kruskal-Wallis One-way ANOVA on ranks	Student-Newman-Keuls	5	H: 13.865, P = 0.016
5C	Kruskal-Wallis One-way ANOVA on ranks	Student-Newman-Keuls	5	H: 15.339, P = 0.009
5E	Kruskal-Wallis One-way ANOVA on ranks	Student-Newman-Keuls	5	H: 12.977, P = 0.024
5G	Kruskal-Wallis One-way ANOVA on ranks	Student-Newman-Keuls	5	H: 15.129, P = 0.010
6A	Kruskal-Wallis One-way ANOVA on ranks	Student-Newman-Keuls	2	H: 7.200, P= 0.004
6B	Kruskal-Wallis One-way ANOVA on ranks	Student-Newman-Keuls	2	H: 7.200, P= 0.004
6C	-	t-test, two-tailed	4	t: 16.876, P = <0.001
6D	-	t-test, two-tailed	4	t: 5.880, P = 0.004

Anhang 21 – Weitere Informationen zu Kapitel 4.9

Kutzsche, Schemmert, Bujnicki et al. Oral treatment with the all-D-peptide RD2 enhances cognition in aged beagle dogs – A model of sporadic Alzheimer's disease

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Table S1: Complete Blood Count (mean values and standard deviation) - baseline and after three months of treatment

Parameter	Units	Normal Range	Placebo		RD2 acetate 3 mg/kg		RD2 acetate 30 mg/kg	
			baseline	treatment	baseline	treatment	baseline	treatment
WBC	10^9/l	4.0-16	6.4 ± 3.9	5.7 ± 3.1	4.6 ± 1.9	5.1 ± 1.4	4.4 ± 1.4	4.0 ± 1.2
RBC	10^{12}/l	4.8-9.3	5.3 ± 0.45	5.4 ± 0.38	5.4 ± 0.31	5.4 ± 0.35	5.5 ± 0.67	5.6 ± 0.65
Hemoglobin	g/l	121-203	123 ± 11	123 ± 9.4	128 ± 8.8	128 ± 8.2	131 ± 16	132 ± 16
Hematocrit	%	36-60	37 ± 3.1	38 ± 2.7	47 ± 28	47 ± 28	40 ± 4.6	41 ± 4.7
MCV	Fl	58-79	71 ± 1.7	72 ± 2.6	70 ± 9.3	70 ± 9.3	72 ± 2.1	73 ± 1.7
MCH	Pg	19-28	23 ± 0.86	23 ± 0.97	28 ± 15	28 ± 15	24 ± 0.47	24 ± 0.42
MCHC	g/l	300-380	329 ± 8.6	321 ± 3.8	301 ± 88	299 ± 87	332 ± 8.1	324 ± 5.3
Platelet count	10^9/l	170-400	394 ± 165	384 ± 146	343 ± 94	335 ± 85	301 ± 111	327 ± 108
Neutrophils	10^9/l	2.06-10.60	4.5 ± 3.4	4.0 ± 2.5	2.8 ± 1.6	3.5 ± 1.1	2.8 ± 1.0	2.6 ± 0.92
Lymphocytes	10^9/l	0.69-4.50	1.3 ± 0.30	1.2 ± 0.36	1.2 ± 0.45	1.2 ± 0.36	1.2 ± 0.36	1.1 ± 0.28
Monocytes	10^9/l	0-0.84	0.29 ± 0.23	0.28 ± 0.18	0.18 ± 0.08	0.23 ± 0.09	0.19 ± 0.07	0.19 ± 0.05
Eosinophils	10^9/l	0-1.20	0.29 ± 0.19	0.26 ± 0.17	0.27 ± 0.11	0.18 ± 0.08	0.21 ± 0.10	0.22 ± 0.19
Basophils	10^9/l	0-0.15	0	0	0	0	0	0
Total Protein	g/l	50-74	54 ± 3.1	57 ± 6.6	53 ± 2.1	56 ± 2.9	54 ± 5.3	57 ± 6.0
Albumin	g/l	27-44	31 ± 2.1	31 ± 2.8	30 ± 2.7	30 ± 2.5	29 ± 2.3	30 ± 2.6
Globulin	g/l	16-36	23 ± 3.3	25 ± 4.1	24 ± 2.0	26 ± 2.6	25 ± 3.8	28 ± 4.5
A/G Ratio		0.8-2.0	1.4 ± 0.25	1.3 ± 0.27	1.3 ± 0.20	1.2 ± 0.18	1.2 ± 0.14	1.1 ± 0.18

Table S2: Clinical chemistry (mean values and standard deviation) - baseline and after three months of treatment. Mean results of the clinical chemistry for placebo and RD2 treated animals. There were no significant changes in any of the listed measures except for the triglyceride concentration, which was significantly increased after dosing with 3 mg/kg or 30 mg/kg, but still in the normal range of historical controls.

Parameter	Units	Normal Range	Placebo		RD2 acetate 3 mg/kg		RD2 acetate 30 mg/kg	
			baseline	treatment	baseline	treatment	baseline	treatment
Phosphorus	mmol/l	0.81-1.9	1.3 ± 0.21	1.7 ± 0.95	1.4 ± 0.27	1.5 ± 0.25	1.4 ± 0.32	1.6 ± 0.35
Glucose	mmol/l	3.9-7.7	5.0 ± 0.52	5,3 ± 0.49	4.9 ± 0,29	5.2 ± 0.33	5.0 ± 0.41	5.1 ± 0.54
Calcium	mmol/l	2.2-2.9	2.4 ± 0.06	2.4 ± 0.04	2.3 ± 0.08	2.4 ± 0.11	2.3 ± 0.11	2.4 ± 0.12

Magnesium	mmol/l	0.7-1.3	0.70 ± 0.05	0.77 ± 0.06	0.74 ± 0.05	0.78 ± 0.06	0.73 ± 0.07	0.76 ± 0.05
Sodium	mmol/l	139-154	145 ± 3.9	147 ± 1.0	146 ± 3.8	147 ± 1.5	145 ± 3.6	148 ± 2.3
Potassium	mmol/l	3.6-5.5	4.3 ± 0.31	4.4 ± 0.28	4.2 ± 0.29	4.3 ± 0.25	4.1 ± 0.32	4.3 ± 0.40
Sodium/Potassium Ratio		27-38	34 ± 2.5	34 ±2.1	35 ± 2.0	34 ± 1.8	35 ± 2.7	35 ± 3.1
Chloride	mmol/l	102-120	112 ± 3.9	113 ± 1.7	113 ± 2.3	113 ± 2.5	112 ± 3.7	113 ± 2.8
Cholesterol	mmol/l	2.4-10	4.9 ± 0.95	5.2 ± 0.68	5.2 ± 0.83	5.5 ± 0.86	5.3 ± 1.2	5.4 ± 1.2
Triglycerides	mmol/l	0.33-3.3	2.0 ± 0.33	2.0 ± 0.47	2.7 ± 1.4	3.2 ± 1.8	2.2 ± 0.37	2.6 ± 0.39
Amylase	U/l	290-1125	475 ± 203	503 ± 229	494 ± 164	511 ± 159	434 ± 142	465 ± 182
Precision PSL	U/l	24-140	60 ± 21	44 ± 16	68 ± 50	52 ± 31	66 ± 29	57 ± 26
CPK total	U/l	59-895	84 ± 18	88 ± 13	96 ± 33	92 ± 32	92 ± 21	103 ± 43

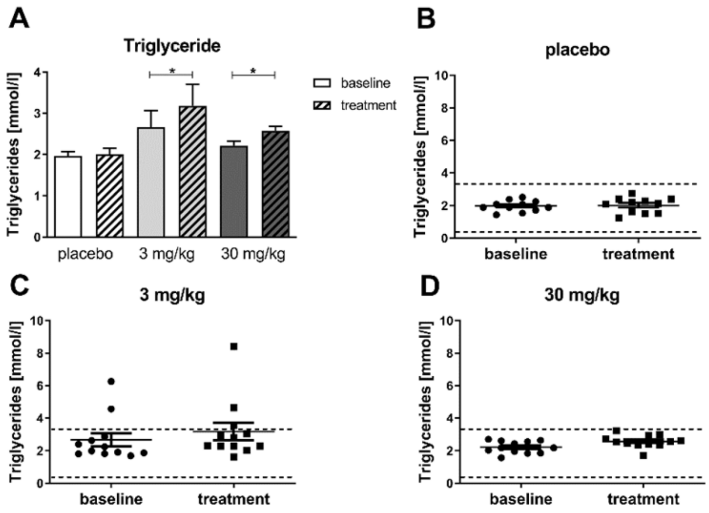


Figure S1: Blood concentration of triglycerides of placebo (B), 3 mg/kg RD2 (C) and 30 mg/kg RD2 (D) treated animals was analyzed using a paired t-test with timepoints serving as a within-subject measure. A significantly increased concentration of triglycerides was detected after three-month RD2 treatment (3 mg/kg and 30 mg/kg) compared to baseline, but not in the placebo treated animals (A). With two exceptions (in 3 mg/kg group), all measured values are within the normal reference range. Without these two animals, which are already out of the normal range at baseline, there is no significant difference between baseline and treatment any more in the 3 mg/kg group. Area between the dashed lines represent the normal reference range. (*$p < 0.05$). Data is presented as mean ± SEM; n = 11 to 12

Table S3: Liver function blood test. To assess potential effects of RD2 on liver function, aspartate aminotransferase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (Alk), gamma-glutamyl transpeptidase (GGTP), albumin, and total bilirubin were determined. There were no significant treatment related changes in any of the listed measures.

Parameter	Units	Normal Range	Placebo		RD2 acetate 3 mg/kg		RD2 acetate 30 mg/kg	
			baseline	treatment	baseline	treatment	baseline	treatment
AST	U/l	15-66	22 ± 5.2	22 ± 4.7	23 ± 4.5	22 ± 7.3	25 ± 4.1	25 ± 3.2
ALT	U/l	12-118	45 ± 25	98 ± 132	33 ± 23	29 ± 13	32 ± 15	32 ± 19
Alk	U/l	5-131	53 ± 30	134 ± 200	113 ± 136	121 ± 140	93 ± 91	84 ± 77
GGTP	U/l	1-12	3.9 ± 1.3	9.0 ± 6.4	3.5 ± 4.5	6.4 ± 2.0	3.6 ± 1.2	6.1 ± 1.5
Bilirubin	µmol/l	0.0-5.1	2.5 ±0.53	3.1 ± 1.2	2.5 ± 0.63	2.4 ± 0.57	2.2 ± 0.44	2.4 ± 0.54
BUN	mmol/l	2.1-11	5.2 ± 1.7	5.7 ± 4.0	5.4 ± 0.79	5.8 ± 0.99	5.2 ± 1.1	5.9 ± 1.6
Creatinine	µmol/l	44-141	56 ± 20	59 ± 26	51 ± 9.3	54 ± 11	54 ± 10	61 ± 12
Creatinine/BUN ratio			96 ± 23	93 ± 22	108 ± 18	110 ± 16	97 ± 15	96 ± 8.7

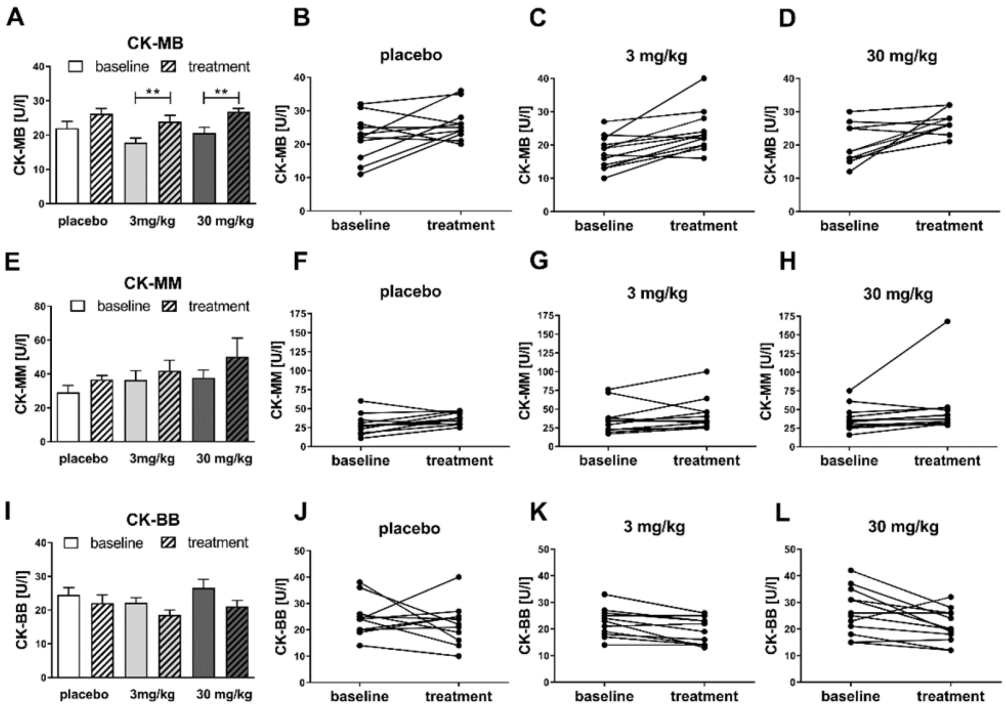


Figure S2: Blood concentration of the creatinine kinase isoenzymes (CK-MB (A-D), CK-MM (E-F) and CK-BB (I-L) were each analyzed using a paired t-test with timepoints serving as a within-subject measure. A significantly increased concentration of CK-MB was detected after three-month treatment with RD2 (3 mg/kg and 30 mg/kg) compared to baseline, but not in the placebo treated animals. (**p < 0.01) (A). Data are presented as mean ± SEM; n = 11 to 12.

Other correlations

We found a significant and positive correlation between the results of the DNMP and the selective attention tests in the dogs of the placebo cohort at all time points available (Fig. S3F). This indicates that both tests are robustly measuring memory and cognition deficits in dogs. We found a positive and significant correlation between selective attention accuracy and total Aβ42 concentration in CSF (Fig. S3D). We examined the correlation of changes (after three months treatment versus baseline) of CSF Aβ42 total concentrations with changes (after three months treatment versus baseline) of CSF Aβ oligomer concentrations and found a significant and inverse correlation (Fig. S3F, Pearson -0.496 p-value 0.00287). This does not necessarily mean that Aβ42 levels are increased due to Aβ oligomer disassembly. Disassembly of 100 fM Aβ oligomers, even if we anticipate 100 monomer building blocks per oligomer, would yield 10 pM amounts of additional Aβ monomers equal to 40 pg/ml, a concentration increase that may not contribute significantly to the total Aβ42 concentration (Fig. S3E).

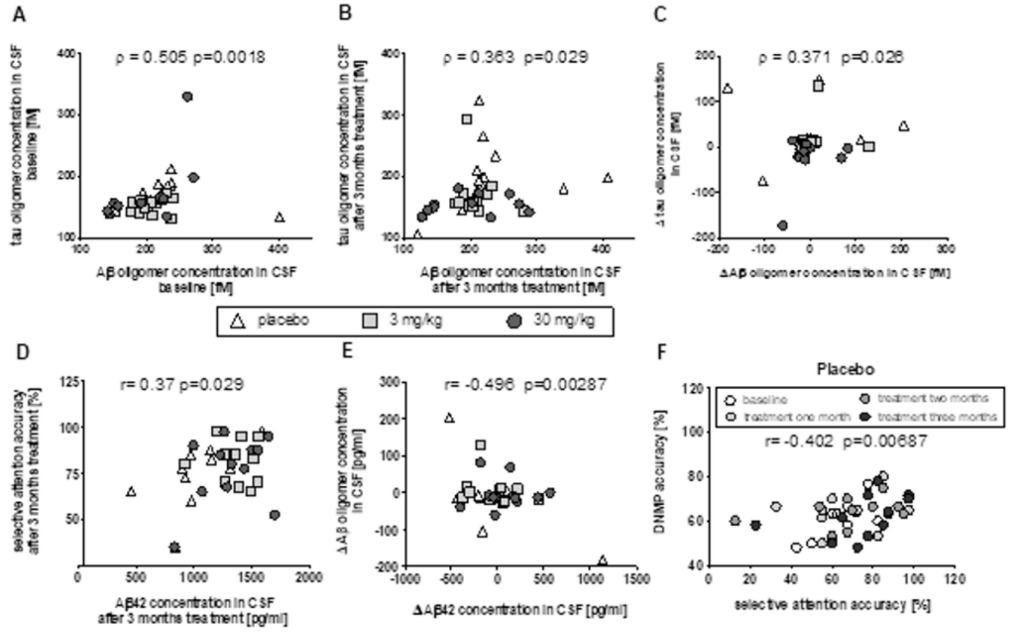


Figure S3: Correlations between Aβ42 and Aβ oligomer concentrations as well as with cognitive testing. A: Correlation of CSF Aβ oligomer concentration vs. CSF tau oligomer concentration at baseline. B: Correlation of CSF Aβ oligomer concentration vs. CSF tau oligomer concentration after 3 months treatment with RD2. C: Correlation of changes of CSF Aβ oligomer concentration vs. changes of CSF tau oligomer concentration. Changes (Δ) were calculated by subtracting baseline value from three-month treatment value. D: Correlation of CSF Aβ42 concentration with selective attention accuracy after 3 months treatment. E: Correlation of changes of CSF Aβ42 concentration with changes of CSF Aβ oligomer concentration. Changes (Δ) were calculated by subtracting baseline value from three-month treatment value. F: Correlation of selective attention accuracy and DNMP accuracy of the placebo group from all available different time points. Correlations were performed with Pearson (r) and Spearman (ρ) analysis at alpha level 0.05 with n = 11 to 12.

Anhang 22 – Druckgenehmigung für Kapitel 4.1

MDPI Open Access Information and Policy

All articles published by MDPI are made immediately available worldwide under an open access license. This means:

- everyone has free and unlimited access to the full-text of *all* articles published in MDPI journals;
- everyone is free to re-use the published material if proper accreditation/citation of the original publication is given;
- open access publication is supported by the authors' institutes or research funding agencies by payment of a comparatively low **Article Processing Charge (APC)** for accepted articles.

Permissions

No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. Reuse of an article does not imply endorsement by the authors or MDPI.

Anhang 23 – Druckgenehmigung für Kapitel 4.2

CCC Marketplace

This is a License Agreement between Marlene Pils ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	17-May-2024	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1485157-1		
ISSN	2352-8729	Publisher	Elsevier Ltd
		Portion	Chapter/article

LICENSED CONTENT

Publication Title	Alzheimer's & Dementia : Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring	Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
		Rightsholder	John Wiley & Sons - Books
Article Title	Aβ oligomers peak in early stages of Alzheimer's disease preceding tau pathology	Publication Type	e-Journal
		Issue	2
Author/Editor	Alzheimer's Association	Volume	16
Date	01/01/2015		
Language	English		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chapter/article	Rights Requested	Main product
Page Range(s)	1-12	Distribution	Worldwide
Total Number of Pages	12	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Electronic		
Who Will Republish the Content?	Academic institution	Copies for the Disabled?	No
		Minor Editing Privileges?	No
Duration of Use	Life of current edition	Incidental Promotional Use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	EUR

NEW WORK DETAILS

Title	Weiterentwicklung und Anwendung der sFIDA-Technologie für den Nachweis von Proteinaggregaten zur Diagnose von Proteinfehlfaltungserkrankungen	Institution Name	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
		Expected Presentation Date	2024-06-30
Instructor Name	Marlene Pils		

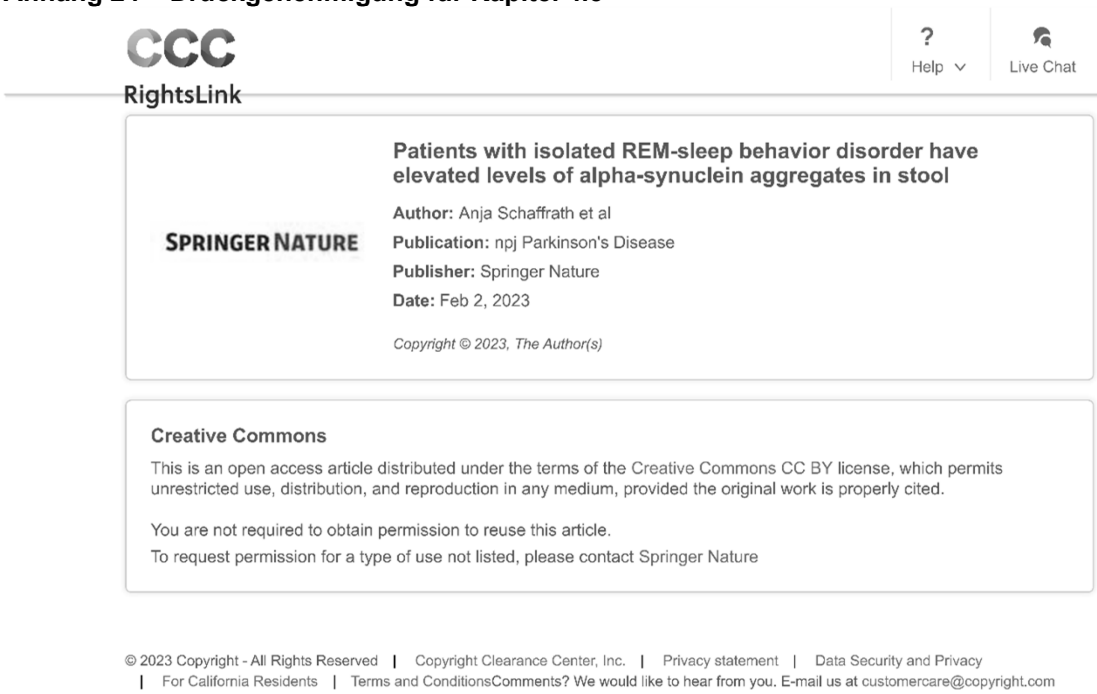
ADDITIONAL DETAILS

The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Marlene Pils

REQUESTED CONTENT DETAILS

Title, Description or Numeric Reference of the Portion(s)	1	Title of the Article / Chapter the Portion Is From	Aβ oligomers peak in early stages of Alzheimer's disease preceding tau pathology
Editor of Portion(s)	Blömeke, Lara; Rehn, Fabian; Kraemer-Schulien, Victoria; Kutzsche, Janine; Pils, Marlene et al.	Author of Portion(s)	Blömeke, Lara; Rehn, Fabian; Kraemer-Schulien, Victoria; Kutzsche, Janine; Pils, Marlene et al.
Volume / Edition	16		
Page or Page Range of Portion	1-12	Publication Date of Portion	2024-04-25

Anhang 24 – Druckgenehmigung für Kapitel 4.5



CCC RightsLink

Help | Live Chat

SPRINGER NATURE

Patients with isolated REM-sleep behavior disorder have elevated levels of alpha-synuclein aggregates in stool

Author: Anja Schaffrath et al
Publication: npj Parkinson's Disease
Publisher: Springer Nature
Date: Feb 2, 2023

Copyright © 2023, The Author(s)

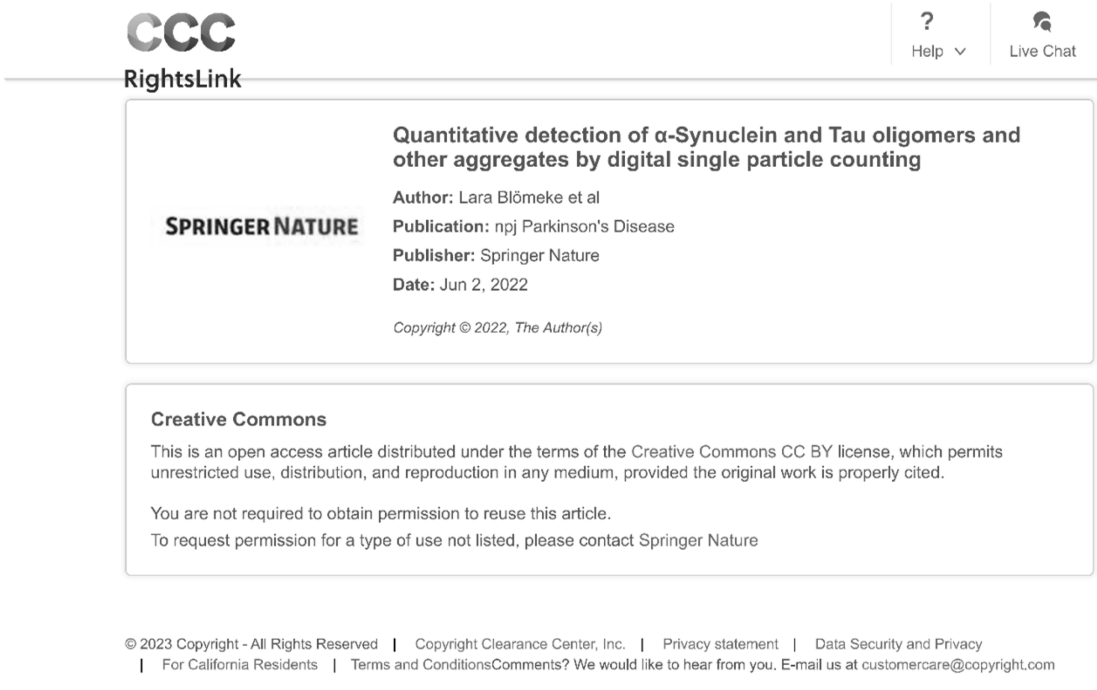
Creative Commons

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons CC BY license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.
To request permission for a type of use not listed, please contact Springer Nature

© 2023 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Data Security and Privacy | For California Residents | Terms and ConditionsComments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

Anhang 25 – Druckgenehmigung für Kapitel 4.6



CCC RightsLink

Help | Live Chat

SPRINGER NATURE

Quantitative detection of α-Synuclein and Tau oligomers and other aggregates by digital single particle counting

Author: Lara Blömeke et al
Publication: npj Parkinson's Disease
Publisher: Springer Nature
Date: Jun 2, 2022

Copyright © 2022, The Author(s)

Creative Commons

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons CC BY license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.
To request permission for a type of use not listed, please contact Springer Nature

© 2023 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Data Security and Privacy | For California Residents | Terms and ConditionsComments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

Anhang 26 – Druckgenehmigung für Kapitel 4.7

CCC Marketplace

This is a License Agreement between Marlene Pils ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	12-Sep-2023	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1395521-1	Publisher	Blackwell Publishing
ISSN	1440-1819	Portion	Chapter/article

LICENSED CONTENT

Publication Title	Psychiatry and clinical neurosciences	Language	English
Article Title	Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) protein aggregates in cerebrospinal fluid are elevated in first-episode psychosis patients.	Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
		Rightsholder	John Wiley & Sons - Books
		Publication Type	e-Journal
Author/Editor	Nihon Seishin Shinkei Gakkai.		
Date	01/01/1995		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chapter/article	Rights Requested	Main product
Page Range(s)	1-31	Distribution	Worldwide
Total Number of Pages	31	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Electronic	Copies for the Disabled?	No
Who Will Republish the Content?	Academic institution	Minor Editing Privileges?	No
Duration of Use	Life of current edition	Incidental Promotional Use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	EUR

NEW WORK DETAILS

Title	Weiterentwicklung und Anwendung der sFIDA-Technologie für den quantiativen Nachweis von Proteinaggregaten zur Diagnose von Proteinfehlfaltungserkrankungen	Institution Name	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
		Expected Presentation Date	2023-10-31
Instructor Name	Marlene Pils		

ADDITIONAL DETAILS

The Requesting Person/Organization to Appear on the License	Marlene Pils

REQUESTED CONTENT DETAILS

Title, Description or Numeric Reference of the Portion(s)	1	Title of the Article/Chapter the Portion Is From	Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) protein aggregates in cerebrospinal fluid are elevated in first-episode psychosis patients.
Editor of Portion(s)	Pils, Marlene; Rutsch, Julia; Eren, Feride; Engberg, Göran; Piehl, Fredrik; Cervenka, Simon; Sellgren, Carl; Troßbach, Svenja; Willbold, Dieter; Erhardt, Sophie; Bannach, Oliver; Korth, Carsten	Author of Portion(s)	Pils, Marlene; Rutsch, Julia; Eren, Feride; Engberg, Göran; Piehl, Fredrik; Cervenka, Simon; Sellgren, Carl; Troßbach, Svenja; Willbold, Dieter; Erhardt, Sophie; Bannach, Oliver; Korth, Carsten
Volume / Edition	N/A		
Page or Page Range of Portion	1-31	Publication Date of Portion	2023-09-05

RIGHTSHOLDER TERMS AND CONDITIONS

No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto. You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley material. This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process. In no instance may the total amount of Wiley Materials used in any Main Product, Compilation or Collective work comprise more than 5% (if figures/tables) or 15% (if full articles/chapters) of the (entirety of the) Main Product, Compilation or Collective Work. Some titles may be available under an Open Access license. It is the Licensors' responsibility to identify the type of Open Access license on which the requested material was published, and comply fully with the terms of that license for the type of use specified Further details can be found on Wiley Online Library

Anhang 27 – Druckgenehmigung für Kapitel 4.8

CCC Marketplace

This is a License Agreement between Marlene Pils ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	10-Aug-2023	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1384772-1		
ISSN	2666-3791	Publisher	Cell Press
		Portion	Chapter/article

LICENSED CONTENT

Publication Title	Cell Reports Medicine	Publication Type	e-Journal
Article Title	Aβ oligomer concentration in mouse and human brain and its drug-induced reduction ex vivo	Start Page	100630
		Issue	5
		Volume	3
Date	01/01/2020		
Country	United States of America		
Rightsholder	Elsevier Science & Technology Journals		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chapter/article	Rights Requested	Main product
Page Range(s)	1-21	Distribution	Worldwide
Total Number of Pages	21	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Electronic	Copies for the Disabled?	No
Who Will Republish the Content?	Academic institution	Minor Editing Privileges?	No
		Incidental Promotional Use?	No
Duration of Use	Life of current edition	Currency	EUR
Lifetime Unit Quantity	Up to 499		

NEW WORK DETAILS

Title	Weiterentwicklung und Anwendung der sFIDA-Technologie für den quantitativen Nachweis von Proteinaggregaten zur Diagnose von Proteinfehlfaltungserkrankungen	Institution Name	Heinrich-Heine Universität Düsseldotf
		Expected Presentation Date	2023-10-31
Instructor Name	Marlene Pils		

ADDITIONAL DETAILS

Order Reference Number	N/A	The Requesting Person/Organization to Appear on the License	Marlene Pils

REQUESTED CONTENT DETAILS

Title, Description or Numeric Reference of the Portion(s)	1	Title of the Article/Chapter the Portion Is From	Aβ oligomer concentration in mouse and human brain and its drug-induced reduction ex vivo
Editor of Portion(s)	Kass, Bettina; Schemmert, Sarah; Zafiu, Christian; Pils, Marlene; Bannach, Oliver; Kutzsche, Janine; Bujnicki, Tuyen; Willbold, Dieter	Author of Portion(s)	Kass, Bettina; Schemmert, Sarah; Zafiu, Christian; Pils, Marlene; Bannach, Oliver; Kutzsche, Janine; Bujnicki, Tuyen; Willbold, Dieter
Volume / Edition	3		
Page or Page Range of Portion	100630	Issue, if Republishing an Article From a Serial	5
		Publication Date of Portion	2022-05-17

Anhang 28 – Druckgenehmigung für Kapitel 4.9

CCC Marketplace

This is a License Agreement between Marlene Pils ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	10-Aug-2023	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1384772-2	Publisher	Elsevier
ISSN	2405-8440	Portion	Chapter/article

LICENSED CONTENT

Publication Title	Heliyon	Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Article Title	Oral treatment with the all-d-peptide RD2 enhances cognition in aged beagle dogs – A model of sporadic Alzheimer's disease	Rightsholder	Elsevier Science & Technology Journals
		Publication Type	e-Journal
Date	01/01/2015	Start Page	e18443
Language	English		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chapter/article	Rights Requested	Main product
Page Range(s)	1-14	Distribution	Worldwide
Total Number of Pages	14	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Electronic	Copies for the Disabled?	No
Who Will Republish the Content?	Academic institution	Minor Editing Privileges?	No
		Incidental Promotional Use?	No
Duration of Use	Life of current edition	Currency	EUR
Lifetime Unit Quantity	Up to 499		

NEW WORK DETAILS

Title	Weiterentwicklung und Anwendung der sFIDA-Technologie für den quantitativen Nachweis von Proteinaggregaten zur Diagnose von Proteinfehlfaltungserkrankungen	Institution Name	Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
		Expected Presentation Date	2023-10-31
Instructor Name	Marlene Pils		

ADDITIONAL DETAILS

Order Reference Number	N/A	The Requesting Person/Organization to Appear on the License	Marlene Pils

REQUESTED CONTENT DETAILS

Title, Description or Numeric Reference of the Portion(s)	1	Title of the Article/Chapter the Portion Is From	Oral treatment with the all-d-peptide RD2 enhances cognition in aged beagle dogs – A model of sporadic Alzheimer's disease
Editor of Portion(s)	Kutzsche, J.; Schemmert, S.; Bujnicki, T.; Zafiu, C.; Halbgebauer, S.; Kraemer-Schulien, V.; Pils, M.; Blömeke, L.; Post, J.; Kulawik, A.; Jürgens, D.; Rossberg, W.M.; Hümpel, M.; Bannach, O.; Otto, M.; A., J.A.; Willuweit, A.; Willbold, D.	Author of Portion(s)	Kutzsche, J.; Schemmert, S.; Bujnicki, T.; Zafiu, C.; Halbgebauer, S.; Kraemer-Schulien, V.; Pils, M.; Blömeke, L.; Post, J.; Kulawik, A.; Jürgens, D.; Rossberg, W.M.; Hümpel, M.; Bannach, O.; Otto, M.; A., J.A.; Willuweit, A.; Willbold, D.
Volume / Edition	9		
Page or Page Range of Portion	e18443	Issue, if Republishing an Article From a Serial	N/A
		Publication Date of Portion	2023-07-01

Weitere Informationen zu Kapitel 5

Anhang 29 – Berechnung theoretische Anzahl an Proteinaggregaten pro Bild (Kapitel 5.3.1).

Beispielrechnung mit folgenden Annahmen

$Konzentration_{Probe}$	1 fM → 10^{-15} M
$Volumen_{Probe}$	20 µL → 0,00002 L
Avogadro Konstante	$6{,}022 \times 10^{23} \times mol^{-1}$
$Größe_{Bild}$	0,113 mm × 0,113 mm = 0,012769 mm^2
$Größe_{Well}$	3,3 mm × 3,3 mm = 10,89 mm^2

Prozentuale $Fläche_{Bild}$ $\frac{Größe_{Bild}\,[mm^2]}{Größe_{Well}\,[mm^2]} \times 100\,\% = \frac{0{,}012769\ mm^2}{10{,}89\ mm^2} \times 100\% = 0{,}12\%$

$$\text{Proteinaggregate pro Bild} = \frac{\text{Konzentration}_{\text{Probe}}\,[\text{M}] \times \text{Volumen}_{\text{Probe}}\,[\text{L}] \times \text{N}_\text{A}\,[\text{mol}^{-1}]}{\text{prozentuale Fläche}_{\text{Bild}}} \quad (10)$$

$$\text{Proteinaggregate pro Bild} = \frac{10^{-15}\,[\text{M}] \times 0{,}00002\,[\text{L}] \times 6{,}022 \times 10^{23}\,[\text{mol}^{-1}]}{0{,}12\,\%} = 14{,}1 \quad (11)$$