

# **Entwicklung eines Nachweisverfahrens zur Frühdiagnose von Alzheimer mittels Tau-Proteinen**

Masterarbeit  
zur Erlangung des akademischen Grades  
***Master of Science***

angefertigt am

Zentrum für Human- und Molekularbiologie (ZHMB)  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät und der Medizinischen Fakultät

Universität des Saarlandes

vorgelegt von  
***Sarah Haenelt***

Saarbrücken, Januar 2020

Die experimentellen Arbeiten im Rahmen der vorliegenden Masterarbeit wurden am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie in der Arbeitsgruppe MicroDiagnostics durchgeführt. Die Arbeit wurde am Lehrstuhl Mikrobiologie der Universität des Saarlandes angefertigt.

Erstgutachter: ***Prof. Dr. Gert-Wieland Kohring***

Zweitgutachter: ***Dr. Dirk Kuhlmeier***

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Morbus Alzheimer.....	1
1.2 Alzheimer-Biomarker .....	2
1.2.1 Amyloid-beta .....	2
1.2.2 Tau .....	3
1.3 Aktuelle Diagnose-Verfahren.....	4
1.3.1 Bildgebende Verfahren.....	4
1.3.2 Liquoranalyse.....	5
1.4 Detektion von Alzheimer-Biomarkern im Blut.....	5
1.5 Extrazelluläre Vesikel .....	7
1.5.1 Biogenese und Funktion .....	7
1.5.2 EVs als diagnostisches Tool .....	8
1.5.3 Isolationsmethoden.....	9
1.6 Zielstellung der Arbeit.....	10
<b>2 Material</b> .....	<b>11</b>
2.1 Chemikalien.....	11
2.2 Molekularbiologische Reagenzien .....	12
2.3 Antikörper .....	12
2.4 Zelllinien.....	12
2.5 Zellkulturmedien und Zusätze .....	13
2.6 Kommerzielle Kits .....	13
2.7 Verbrauchsmaterialien .....	13
2.8 Lösungen und Puffer .....	14
2.9 Geräte und Software.....	15
<b>3 Methoden</b> .....	<b>17</b>
3.1 Zellkultur .....	17
3.1.1 Kultivierung der Zelllinie HDLM-2.....	17
3.1.2 Viabilität der HDLM2-Zellen in Medium ohne Serum .....	18
3.1.3 Kultivierung der Zelllinie SH-SY5Y.....	18
3.2 Gewinnung von Probenmaterial aus den Zelllinien.....	19

---

3.2.1	Herstellung von Gesamtproteinlysate.....	19
3.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	19
3.2.3	Aufkonzentrierung der extrazellulären Vesikel .....	20
3.3	Proteinanalyse .....	21
3.4	ELISA.....	23
3.4.1	Grundprinzip des Tau-ELISA .....	24
3.4.2	Wahl eines geeigneten Fängerantikörpers für den Sandwich-ELISA.....	25
3.4.3	Bindung des Fängerantikörpers an die Platte .....	25
3.4.4	Titration des Fänger- und Detektionsantikörpers .....	25
3.4.5	Titration des Detektionsantikörpers.....	26
3.4.6	Aufnahme einer Kalibrierkurve .....	26
3.5	AlphaLISA .....	27
3.5.1	Titration des Fängerantikörpers .....	28
3.5.2	Optimierung der Bead-Konzentrationen .....	29
3.5.3	Reihenfolge der Zugabe aller Komponenten.....	29
3.5.4	Optimierung der Inkubationszeit .....	30
3.5.5	Aufnahme einer Kalibrierkurve .....	30
3.5.6	Assay mit biologischen Proben.....	31
3.6	Statistische Auswertung.....	31
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
4.1	Viabilität der HDLM2-Zellen in Medium ohne Serum.....	32
4.2	Expression von Tau in humanen Zelllinien.....	33
4.3	ELISA.....	34
4.3.1	Wahl eines geeigneten Fängerantikörpers für den Sandwich-ELISA.....	34
4.3.2	Bindung des Fängerantikörpers an der Platte .....	35
4.3.3	Titration des Fänger- und Detektionsantikörpers .....	36
4.3.4	Titration des Detektionsantikörpers.....	37
4.3.5	Aufnahme einer Kalibrierkurve .....	38
4.4	AlphaLISA .....	39
4.4.1	Titration des Fängerantikörpers .....	39
4.4.2	Optimierung der Bead-Konzentrationen .....	40
4.4.3	Reihenfolge der Zugabe aller Komponenten.....	41
4.4.4	Optimierung der Inkubationszeit .....	42
4.4.5	Aufnahme einer Kalibrierkurve .....	43

---

4.4.6 Assay mit biologischen Proben.....	44
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>45</b>
5.1 Viabilität der HDLM2-Zellen.....	45
5.2 Expression von Tau in humanen Zelllinien.....	46
5.3 ELISA.....	47
5.4 AlphaLISA .....	49
<b>6 Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>53</b>
<b>7 Summary and outlook .....</b>	<b>54</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>XIII</b>

---

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 Ablagerungen von Amyloid-beta und Tau im Gehirn von Alzheimerpatienten .....	2
Abbildung 2 Alternatives Spleißen führt zu sechs Isoformen des Tau-Proteins .....	3
Abbildung 3 Klassifizierung extrazellulärer Vesikel nach ihrer Biogenese .....	8
Abbildung 4 Funktionsprinzip des Sandwich-ELISA.....	24
Abbildung 5 Funktionsprinzip des AlphaLISA.....	27
Abbildung 6 Viabilität der HDLM2-Zellen in Medium ohne Serum.....	32
Abbildung 7 Mikroskopische Aufnahmen der HDLM2-Zellen in Medium mit und ohne Serum	33
Abbildung 8 Untersuchung der Expression von Tau in humanen Zelllinien.....	33
Abbildung 9 Untersuchung der Expression von Tau in HDLM2-Zellen .....	34
Abbildung 10 Wahl eines geeigneten Fänger-Antikörpers für den Sandwich-ELISA .....	34
Abbildung 11 Bindung des Fängerantikörpers an die Platte.....	35
Abbildung 12 Titration des Fänger- und Detektionsantikörpers im ELISA.....	36
Abbildung 13 Titration des Detektionsantikörpers im ELISA .....	37
Abbildung 14 Aufnahme einer Kalibrierkurve für den ELISA .....	38
Abbildung 15 Titration des Fängerantikörpers im AlphaLISA .....	39
Abbildung 16 Optimierung der Bead-Konzentrationen im AlphaLISA .....	40
Abbildung 17 Protokolle für die Entwicklung des AlphaLISAs.....	41
Abbildung 18 Anpassung der Inkubationszeit im AlphaLISA.....	42
Abbildung 19 Aufnahme einer Kalibrierkurve für den AlphaLISA .....	43
Abbildung 20 Interpolation von Proben anhand der Kalibrierkurve des AlphaLISAs.....	44

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 Zelllinien für die Untersuchung der Tau-Expression.....	21
Tabelle 2 Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die Gelelektrophorese.....	22
Tabelle 3 Pipettierschema für die Aufnahme einer ELISA-Kalibrierkurve.....	26
Tabelle 4 Pipettierschema für die Wahl eines geeigneten AlphaLISA-Protokolls.....	30

**Abkürzungsverzeichnis**

[ <sup>18</sup> F]FDG .....	2-Deoxy-2-[ <sup>18</sup> F]-Fluorodeoxyglucose
AlphaLISA.....	Amplified luminescent proximity homogeneous assay linked immunosorbent assay
anti-Kaninchen-AK.....	anti-Kaninchen-Antikörper mit HRP-Enzym
anti-Maus-AK.....	anti-Maus-Antikörper mit HRP-Enzym
APS.....	Ammoniumperoxodisulfat
A $\beta$ .....	Amyloid beta
BCA .....	Bicinchoninsäure
BSA.....	Rinderserumalbumin
CO <sub>2</sub> .....	Kohlenstoffdioxid
ddH <sub>2</sub> O .....	doppelt destilliertes Wasser
DMEM.....	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO .....	Dimethylsulfoxid
DNA .....	Desoxy-Ribonukleinsäure
DSMZ .....	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT .....	Dithiothreitol
EDTA .....	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA .....	enzyme linked immunosorbent assay
EVs .....	extrazelluläre Vesikel
HEPES.....	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hiFBS .....	hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum
HRP .....	Meerrettichperoxidase
IAB .....	Immunoassaypuffer
kDa.....	Kilodalton
LB.....	Laemmli-Puffer
LOD .....	untere Nachweisgrenze
LOQ.....	unteres Quantifizierungslimit
MAPT .....	Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau
miRNA.....	micro-Ribonukleinsäure
MTBD .....	Mikrotubulus-Bindungsdomäne
MTS.....	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
P/S .....	Penicillin/Streptomycin

---

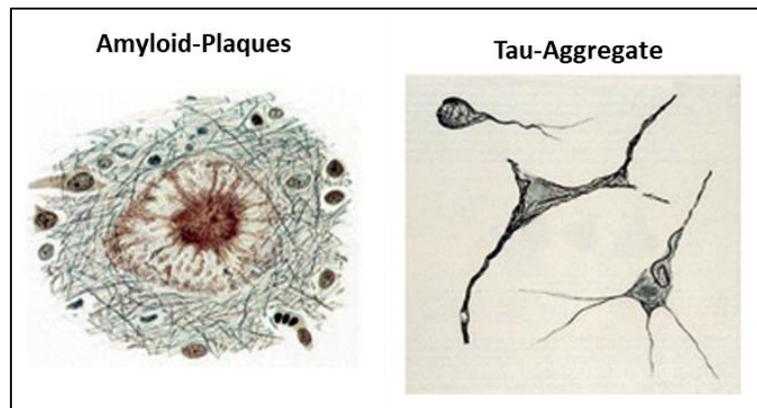
PBS.....	Phosphatgepufferte Saline
PET.....	Positronen-Emissions-Tomographie
PRD.....	Prolin-reiche Domäne
p-Tau.....	hyperphosphoryliertes Tau-Protein
qPCR.....	quantitative Polymerasekettenreaktion
RIPA.....	Radioimmunopräzipitationsassay
RLU.....	Relative Signaleinheiten
RNA.....	Ribonukleinsäure
RPMI.....	Roswell Park Memorial Institute
RT.....	Raumtemperatur
SDS.....	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE.....	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sFIDA.....	surface-based fluorescence intensity distribution analysis
SIMOA.....	Single Molecule Array
SN.....	Überstand
StarBright700-AK.....	anti-Kaninchen-Antikörper StarBright Blue 700
Tau46-AK.....	anti-Tau-Antikörper Tau 46
Tau-AK.....	anti-Tau-Antikörper 7B8
TEMED.....	Tetramethylethylendiamin
TMB.....	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
Tris.....	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tris-HCl.....	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid
t-Tau.....	Gesamtmenge an Tau
t-Tau-AK.....	anti-total-Tau-Antikörper D1M9X
üN.....	über Nacht
WB-Puffer.....	Western Blot Puffer

## **1 Einleitung**

Im Jahr 2018 lag die Prävalenz von Demenzerkrankungen weltweit bei ca. 50 Millionen Menschen, über 70 % waren Alzheimerpatienten. Es wird geschätzt, dass sich diese Zahl bis 2050 auf über 150 Millionen Betroffene verdreifachen wird (Patterson, 2018). Aktuell gibt es nur wenige Medikamente, welche den Krankheitsverlauf verzögern oder Symptome behandeln können, heilbar ist Morbus Alzheimer bislang nicht (Cummings et al., 2014). Deshalb ist es besonders wichtig, frühzeitig mit einer Therapie zu beginnen, um die kognitive Leistungsfähigkeit eines Patienten möglichst lange aufrechterhalten zu können. Hierfür muss die Krankheit allerdings bereits im Anfangsstadium diagnostiziert werden, was mit den heute verwendeten Methoden häufig nicht gewährleistet werden kann. Die momentan im klinischen Alltag zur Anwendung kommenden Diagnoseverfahren sind teuer, risikobelastet und vor allem in einer frühen Phase der Krankheit nicht zuverlässig genug (Hampel et al., 2018). Eine preiswerte und sichere Frühdiagnostik für Morbus Alzheimer wird daher dringend benötigt.

### **1.1 Morbus Alzheimer**

Die Alzheimer-Krankheit ist eine neurodegenerative Erkrankung und führt zu einer dauerhaften Schädigung der Nervenzellen im zentralen Nervensystem (Hampel et al., 2018). Im frühen Stadium leiden Betroffene zunächst unter leichten kognitiven Einschränkungen, Orientierungsverlust, Sprachstörungen oder Verhaltensänderungen (Alzheimer's Association, 2016). Später kommt es zu zunehmenden Schwierigkeiten bei der Bewältigung von Alltagsaufgaben (Koedam et al., 2010). Viele Patienten leiden zudem unter psychischen Problemen wie Depressionen, Schlaflosigkeit oder Aggressionen bis hin zu Halluzinationen (Bathgate et al., 2001). Eine korrekte Diagnose ist besonders in der Anfangsphase der Erkrankung schwierig, da der Abbau kognitiver Fähigkeiten im fortgeschrittenen Alter häufig als eine Begleiterscheinung des Alterungsprozesses eingestuft wird. Hinzu kommt eine starke Ähnlichkeit der Symptomatik zu anderen Demenzformen. Der Begriff Demenz umfasst verschiedene Erkrankungen des Gehirns, die mit Einbußen an kognitiven, emotionalen und sozialen Fähigkeiten in Verbindung gebracht werden können. Hierzu zählen unter anderem auch die vaskuläre Demenz, die Lewy-Körperchen-Demenz und die frontotemporale Demenz (Patterson, 2018). Die Alzheimer-Krankheit wird mit der Anhäufung unlöslicher Formen der Proteine Amyloid-beta (A $\beta$ ) und Tau im Gehirn assoziiert (Abbildung 1). Das Protein A $\beta$  bildet aufgrund von Fehlfaltungen unlösliche Plaques, welche sich im extrazellulären Raum zwischen den Nervenzellen ansammeln. Tau lagert sich in hyperphosphorylierter Form als fibrilläre Bündel in den Neuronen ab (Zvěřová, 2018). Die genauen Auslöser dieser Prozesse sind noch immer unklar, da Betroffene häufig erst Jahrzehnte später aufgrund fortschreitender Nervenschädigungen die ersten Symptome entwickeln. Dieser Umstand erschwert die Ursachenforschung (Masters et al., 2015).



**Abbildung 1 Ablagerungen von Amyloid-beta und Tau im Gehirn von Alzheimerpatienten:** Amyloid-Plaques (links) sind Aggregate aus fehlgefalteten A $\beta$ -Proteinen. Tau-Aggregate (rechts) bilden sich durch die Zusammenlagerung hyperphosphorylierter Tau-Proteine. (geändert nach Masters et al., 2015).

## 1.2 Alzheimer-Biomarker

Biomarker sind messbare biologische Indikatoren, welche objektive Hinweise auf den medizinischen Zustand eines Patienten geben. Ein idealer diagnostischer Biomarker sollte präzise, zuverlässig, empfindlich und spezifisch sein (Strimbu und Tavel, 2010).

In den letzten Jahren gab es eine Reihe von Bestrebungen, um neue Biomarker im Bereich der Alzheimerdiagnostik zu identifizieren. Vielversprechend sind zum Beispiel der Nachweis bestimmter micro-Ribonukleinsäuren (miRNA) (Swarbrick et al., 2019) oder die Detektion von anti-Phospholipid-Autoantikörpern im Blut von Patienten (McIntyre et al., 2015). Auch veränderte Strukturen im Gehirn können als Biomarker für Morbus Alzheimer dienen. Eine Studie von Besson et al. (2015) zeigt, dass das Volumen des Hippocampus bei Alzheimerpatienten deutlich verringert ist. Auch eine verminderte Aktivität des Glukosemetabolismus in bestimmten Bereichen des Gehirns liefert Anhaltspunkte für das Vorliegen einer Erkrankung (Wei et al., 2018). Die meisten Studien fokussieren sich jedoch auf die beiden oben bereits erwähnten Proteine A $\beta$  und Tau.

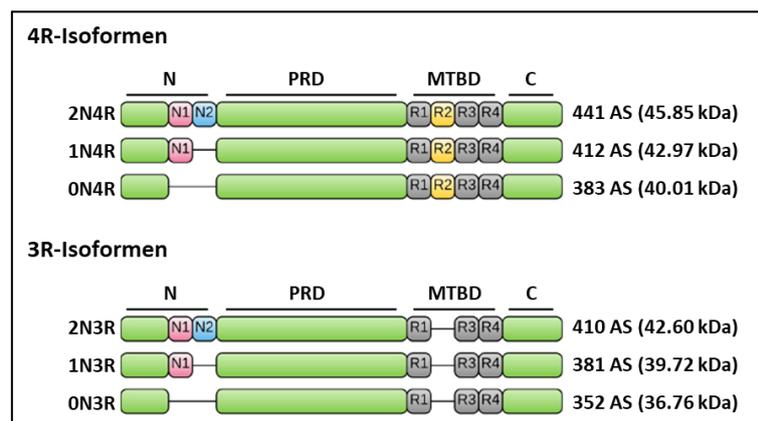
### 1.2.1 Amyloid-beta

Das Protein A $\beta$  wird aus dem Amyloid-Vorläuferprotein gebildet. Während dieses eine wichtige Funktion beim Wachstum und der Reparatur von Neuronen erfüllt, bleibt die physiologische Aufgabe von A $\beta$  trotz intensiver Forschung bis heute ungeklärt (Malm et al., 2016). Es ist hingegen seit langem bekannt, dass sich das 39 bis 42 Aminosäuren lange Peptid unter pathologischen Bedingungen zu Fibrillen zusammenlagert. Diese wiederum bilden unlösliche Plaques, welche vom Körper nicht mehr abgebaut werden können und sich im extrazellulären Raum ablagern. Ursächlich für die Plaquebildung ist vermutlich eine Fehlfaltung der  $\beta$ -Faltblätter des Proteins, ein Auslöser für diese Fehlfaltungen konnte bis jetzt jedoch noch nicht identifiziert werden (Finder und Glockshuber, 2007). Auch alle

potentiellen Medikamente zur Behandlung von Morbus Alzheimer auf Basis von A $\beta$  scheiterten bislang in klinischen Studien aufgrund mangelnder Wirksamkeit oder zu starker Nebenwirkungen (Cummings et al., 2014). Daher richtet sich der Fokus sowohl für diagnostische als auch für therapeutische Zwecke verstärkt auf das Tau-Protein (Li und Götz, 2017).

### 1.2.2 Tau

Das Tau-Protein wird durch das *MAPT*-Gen (*Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau – Gen*) auf Chromosom 17 des humanen Genoms kodiert. Durch alternatives Spleißen entstehen verschiedene Tau-Isoformen. Alle sechs Isoformen werden in einem ausgeglichenen molaren Verhältnis exprimiert und weisen ein Molekulargewicht zwischen 37 und 46 kDa auf. Das Protein lässt sich, wie in Abbildung 2 dargestellt, in vier Domänen unterteilen. In der N-terminalen Domäne (N) werden entweder das Exon 2 (1N, pink), die Exons 2 und 3 (2N, blau) oder keins der beiden Exons (0N) eingefügt. Die Prolin-reiche Domäne (PRD) bildet die zentrale Region des Proteins und ist genau wie die C-terminale Region (C) in allen Isoformen konserviert. Alternatives Spleißen des Exons 10 in der Mikrotubulus-Bindungsdomäne (MTBD) führt zu den 4R- und 3R-Isoformen. (Guo et al., 2017).



**Abbildung 2 Alternatives Spleißen führt zu sechs Isoformen des Tau-Proteins:** Alternatives Spleißen in der N-terminalen Domäne (N) führt zu den Isoformen 0N, 1N und 2N. Die zentrale Region des Proteins wird als Prolin-reiche Domäne (PRD) bezeichnet. Durch Alternatives Spleißen des Exons 10 in der Mikrotubulus-Bindungsdomäne (MTBD) entstehen die 3R- und 4R-Isoformen. Die C-terminale Region (C) ist konserviert. Die Kettenlänge als Anzahl der Aminosäuren (AS), sowie das Molekulargewicht jeder Isoform in Kilodalton (kDa) wurden vermerkt. (geändert nach Li und Götz, 2017).

Tau wird hauptsächlich in Neuronen im Gehirn und dem zentralen Nervensystem gebildet und stabilisiert die Mikrotubuli der Nervenfasern. Unter physiologischen Bedingungen ist das Protein an vielen Stellen posttranskriptional modifiziert. Zumeist handelt es sich hierbei um Phosphorylierungen im Bereich der MTBD, welche als essentiell für die Anlagerung des Proteins an die Mikrotubuli der Nervenfasern angesehen werden. Gleichzeitig bindet der N-Terminus an Bestandteile der Plasmamembran, weshalb Tau eine Bedeutung als Linker-Protein zugeschrieben wird

(Iqbal et al., 2005). Unter pathologischen Bedingungen kommt es zu einer übermäßigen Phosphorylierung des Tau-Proteins, dieser Prozess wird als Hyperphosphorylierung bezeichnet. In Folge dessen verringert sich die Affinität der MTBD zu den Mikrotubuli (Gendreau und Hall, 2013) und das hyperphosphorylierte Tau (p-Tau) bildet intrazelluläre Aggregate, welche als fibrilläre Bündel bezeichnet werden. Tau-Aggregate sind unlöslich und können vom Körper nicht abgebaut werden. Deshalb lagern sie sich vermehrt in den Neuronen ab, was über Jahre hinweg zu einer zunehmenden Blockierung der Signalweiterleitung und schließlich zur Degeneration der Nervenzellen führt (Guo et al., 2017).

### 1.3 Aktuelle Diagnose-Verfahren

Um eine Alzheimerdiagnose zu stellen, kommen neben neurologischen Tests heute vor allem bildgebende Verfahren und die Analyse des Liquors zum Einsatz. Alternative Methoden zum Nachweis von Biomarkern im Blut von Patienten befinden sich noch in der Entwicklungsphase (Chivet et al., 2012; Fiandaca et al., 2015; Guix et al., 2018).

#### 1.3.1 Bildgebende Verfahren

Als bildgebende Verfahren für die Diagnose der Alzheimer-Krankheit sind die Magnetresonanztomographie und die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) etabliert. Bis jetzt kommt vor allem ein PET-Scan auf den Glukosemetabolismus im klinischen Alltag zur Anwendung. Hierbei wird dem Patienten kurz vor dem Scan ein schwach radioaktives Glukose-Analogon namens 2 Deoxy-2-[<sup>18</sup>F]-Fluorodeoxyglucose ([<sup>18</sup>F]FDG) verabreicht. In gesunden Gehirnarealen wird [<sup>18</sup>F]FDG aufgenommen und verstoffwechselt, in den von Morbus Alzheimer betroffenen Bereichen des Gehirns ist die Glukose-Aufnahme jedoch deutlich verringert. Im PET-Scan werden diese Unterschiede sichtbar gemacht und bilden das Stadium einer Alzheimer-Erkrankung ab (Besson et al., 2015). Besonders bei älteren Patienten kommt es aufgrund einer allgemein verminderten Metabolismusrate jedoch sehr häufig zu Fehldiagnosen, weshalb alternative Methoden entwickelt wurden.

Im A $\beta$ -PET-Scan wird ein ähnliches Prinzip angewandt, um Plaques im Gehirn sichtbar zu machen (Suppiah et al., 2019). Verschiedene radioaktive Substanzen wie die [<sup>11</sup>C]Pittsburgh Komponente-B, [<sup>18</sup>F]Florbetaben, [<sup>18</sup>F]Flutemetamol und [<sup>18</sup>F]Florbetapir zeigen eine gute Selektivität und Sensitivität für A $\beta$ . Dennoch sind A $\beta$ -PET-Scans vor allem wegen der hohen Kosten der Analyse, dem Mangel an geschultem Personal, sowie der teuren Anschaffung der Geräte bis heute kein Standardverfahren in klinischen Laboren.

Eine Ergänzung zum A $\beta$ -PET-Scan ist der Tau-PET-Scan. Der Ligand [<sup>18</sup>F]AV-1451 wird gerade in klinischen Studien getestet, um Tau-Aggregate in PET-Scans zu adressieren. Eine Untersuchung von

Johnson et al. (2016) konnte zeigen, dass Tau-PET-Scans eine bessere Korrelation zur kognitiven Beeinträchtigung eines Patienten aufwiesen, als ein A $\beta$ -PET-Scan mit [<sup>11</sup>C]Pittsburgh Komponente-B. Allerdings wurden in der gleichen Studie auch unspezifische Bindungen in anderen Gehirnarealen beobachtet. Dennoch ist der Tau-PET-Scan ein vielversprechender Ansatz für eine zuverlässige Alzheimerdiagnose (Schöll et al., 2016).

### 1.3.2 Liquoranalyse

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung von A $\beta$  und Tau ist die Entnahme von Liquor. Liquor wird auch als Nervenwasser bezeichnet und steht im direkten Austausch mit dem Gehirn, wodurch es sich besonders gut für die Analyse biochemischer Vorgänge im Gehirn eignet. Bei der Liquorentnahme wird Nervenwasser aus dem Rückenmarkskanal entnommen und anschließend auf erhöhte Konzentrationen an A $\beta$  und Tau getestet. Als klassisches Verfahren werden hierfür *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) durchgeführt. Sowohl für A $\beta$  als auch für die Gesamtmenge an Tau (t-Tau) und p-Tau sind bereits zahlreiche kommerzielle Kits mit einer Nachweisgrenze im unteren Pikogramm-Bereich erhältlich. In einer umfangreichen Studie von Mattsson et al. (2009) wurde der Liquor von Probanden mittels Sandwich-ELISA auf alle drei genannten Biomarker untersucht. Die Sensitivität lag bei 79, 86 und 84 % für A $\beta$ , t-Tau und p-Tau, die Spezifität bei 65, 56 und 47 %. Die Sensitivität ist ein Maß für die Anzahl der korrekt diagnostizierten Alzheimerpatienten, während die Spezifität Auskunft über die Anzahl der gesunden Probanden gibt, welche tatsächlich als gesund diagnostiziert wurden. Eine Kombination der Messergebnisse für p-Tau und A $\beta$  resultierte in einer verbesserten Sensitivität (83 %) und Spezifität (88 %).

Die Entnahme von Liquor ist jedoch nicht für das Screening einer breiten Bevölkerungsschicht geeignet und deshalb für die Frühdiagnostik kaum praktikabel. Für den Eingriff ist eine hohe Expertise erforderlich und es kann durch die Invasivität sowohl zu Infektionen als auch zu bleibenden neuronalen Schädigungen kommen (Winston et al., 2016). Zudem können Unterschiede in der Durchführung der Liquorpunktion, der Zeit bis zur Analyse und den Lagerbedingungen die Qualität der Proben maßgeblich beeinflussen (Wei et al., 2018). In den letzten Jahren zeichnen sich deshalb verstärkte Bemühungen ab, Alzheimer-Biomarker in Blut nachzuweisen (Hampel et al., 2018).

## 1.4 Detektion von Alzheimer-Biomarkern im Blut

Sowohl der Nachweis des Tau-Proteins im Liquor von Patienten, als auch bildgebende Verfahren zur Detektion von Tau-Aggregaten erweisen sich als unzulänglich für die Frühdiagnostik von Morbus Alzheimer, daher wird ein alternativer Assay zur Detektion von Tau dringend benötigt. Die Verwendung von Blut als Probenmaterial bietet entscheidende Vorteile. Eine Blutabnahme stellt einen weit weniger

invasiven Eingriff dar als eine Liquorpunktion und verursacht deutlich geringere Kosten als bildgebende Verfahren. Zudem wird nur eine minimale Ausstattung benötigt und Transport und Lagerung des Probenmaterials sind in allen klinischen Laboren bereits Routine (Hampel et al., 2018). Ein Bluttest eröffnet auch neue Möglichkeiten im Hinblick auf eine patientennahe Labordiagnostik, welche besonders Bewohnern im ländlichen Raum oder Menschen mit eingeschränkter Mobilität den Zugang zu diagnostischen Untersuchungen ermöglicht (Jack et al., 2016). Um Alzheimer-Biomarker im Blut nachzuweisen, kommen eine Vielzahl neuer Technologien zum Einsatz.

Song et al. (2016) konnten A $\beta$ -Konzentrationen in Blut mit einer unteren Nachweisgrenze von 0.3 pg/mL messen. Dabei kam ein digitaler ELISA mit der *Single Molecule Array* (SIMOA)-Technik zum Einsatz. Diese Methode nutzt Beads, welche mit spezifischen Antikörpern konjugiert werden. An jeden Bead kann genau ein Analyt-Molekül binden, welches im Anschluss mit einem fluoreszenten sekundären Antikörper markiert wird. Anschließend werden alle Beads auf eine miniaturisierte Mikrotiterplatte gegeben, wobei jede Kavität nur einen Bead fasst. Dadurch kann das Fluoreszenzsignal für jeden Bead einzeln ausgewertet und die Analyt-Konzentration sehr sensitiv bestimmt werden (Hanlon, 2013).

Eine weitere Methode ist die *surface-based fluorescence intensity distribution analysis* (sFIDA), welche einen Nachweis speziell von Proteinaggregaten ermöglicht. Das Grundprinzip beruht auf dem eines ELISA, allerdings kommen ein Fänger- und zwei Detektionsantikörper zum Einsatz, welche alle an überlappende Epitope des Analyten binden. Die beiden Detektionsantikörper sind mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und binden aufgrund der überlagerten Epitope nur Proteinaggregate und keine Monomere. Die Proteinaggregate können in der Auswertung hinsichtlich ihrer Größe charakterisiert werden. Kühbach et al. (2016) wiesen mit einer sFIDA A $\beta$ -Plaques in Blutplasma mit einer Sensitivität von 14 fM nach.

Auch Ribonukleinsäure (RNA)-basierte Systeme sind vielversprechend für die Frühdiagnose von Morbus Alzheimer in Blut. Leidinger et al. (2013) identifizierten in einer quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) eine Reihe von miRNAs, deren Konzentrationen sich in Blutproben von Alzheimerpatienten signifikant von der Kontrollgruppe unterschieden. Dabei konnten sie das Vorliegen einer Alzheimer-Erkrankung mit einer Spezifität von 95 % und einer Sensitivität von 92 % bestimmen.

Viele der eben genannten Techniken konzentrieren sich auf die Identifizierung neuer Biomarker. Dennoch bleibt der Nachweis von Tau besonders aufgrund der frühzeitigen Bildung und Ablagerung von Aggregaten im Gehirn ein sehr vielversprechender Ansatz für die Frühdiagnose der Alzheimer-Krankheit. Problematisch im Hinblick auf die Entwicklung eines Bluttests für die Detektion von Tau ist vor allem die geringe Verfügbarkeit des Proteins im Blut. Da Tau hauptsächlich in Neuronen

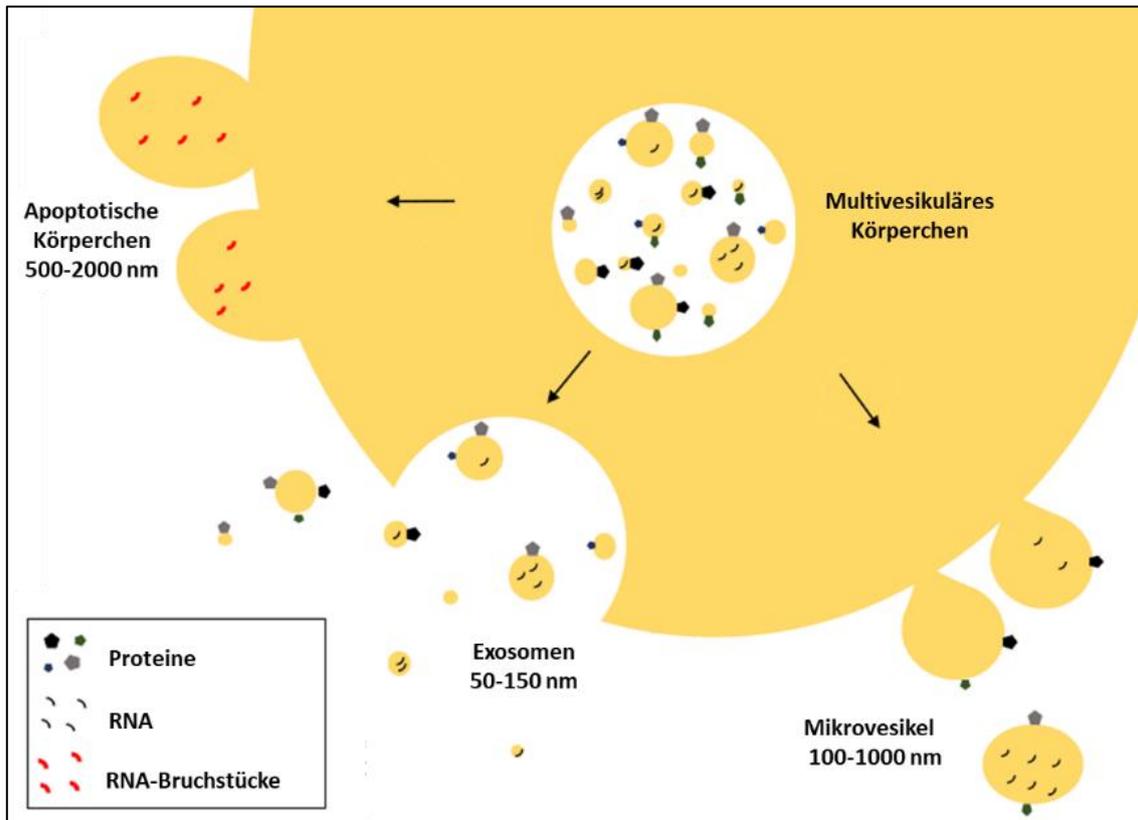
produziert wird, gehen nur sehr geringe Mengen über Diffusion aus dem Liquor ins Blut über (Henriksen et al., 2014). Zudem kann es zur Degradation der Biomarker durch Proteinase oder zum Abbau in der Leber kommen (Hampel et al., 2018). Um höhere Konzentrationen an Tau nachweisen zu können, bietet sich die Verwendung von extrazellulären Vesikeln an (Fiandaca et al., 2015).

## **1.5 Extrazelluläre Vesikel**

### **1.5.1 Biogenese und Funktion**

Extrazelluläre Vesikel (EVs) sind von einer Lipiddoppelschicht umgebene Bläschen, welche von allen Zellen sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen freigesetzt werden. Sie variieren sehr stark hinsichtlich ihrer Größe, Biogenese und Zusammensetzung und können mit Desoxy-Ribonukleinsäuren (DNA), RNA, Proteinen, Lipiden, Metaboliten und anderen Biomolekülen beladen sein (Malm et al., 2016). EVs lassen sich anhand ihrer Biogenese in drei Gruppen klassifizieren (Abbildung 3). Die beim programmierten Zelltod entstehenden apoptotischen Körperchen bilden mit 500 bis 2000 nm Durchmesser die Gruppe der größten EVs (Gould und Raposo, 2013). Mikrovesikel werden durch das Ausstülpfen und Abschnüren der Zellmembran freigesetzt und weisen eine Größe zwischen 50 und 1000 nm auf. Exosomen werden im Inneren der Zelle in sogenannten multivesikulären Körperchen gebildet und anschließend über Exozytose ausgeschleust (Holdenrieder, 2019).

EVs spielen eine entscheidende Rolle bei der interzellulären Kommunikation (Reiners et al., 2017). Sie werden sowohl in festes Gewebe als auch in diverse Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Speichel oder Lymphe abgegeben (Saeedi et al., 2019). Dadurch können sie Informationen sowohl über kurze als auch über lange Distanzen zu verschiedenen Zelltypen transportieren. Zudem sind sie dank ihrer vielfältigen Beladung in der Lage, die Signaltransduktion und Proteinexpression in einer Zielzelle zu modifizieren (Chivet et al., 2012). Die Lipiddoppelschicht sorgt während des Transports durch den Körper für eine hohe Stabilität und schützt die eingeschlossenen Moleküle vor der Degradation. Diese Eigenschaften machen EVs zu einem idealen diagnostischen Tool.



**Abbildung 3 Klassifizierung extrazellulärer Vesikel nach ihrer Biogenese:** Apoptotische Körperchen werden gebildet, wenn eine Zelle den programmierten Zelltod einleitet. Die 50 bis 150 nm großen Exosomen werden in multivesikulären Körperchen gebildet und anschließend über Exozytose aus der Zelle ausgeschleust. Von der Zellmembran abgeschnürte Partikel werden als Mikrovesikel bezeichnet. (geändert nach Masters et al., 2015)

### 1.5.2 EVs als diagnostisches Tool

EVs tragen eine Vielzahl an Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren, welche den Zustand der Ursprungszelle widerspiegeln. Sie sind zudem in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Die genauen Prozesse sind noch unklar, es wird jedoch vermutet, dass der Transport der EVs sowohl aus dem Blut ins Gehirn als auch in die entgegengesetzte Richtung erfolgt (Saeedi et al., 2019). Dadurch wird die Notwendigkeit invasiver Verfahren zur Gewinnung von Gewebebiopsien oder Liquor umgangen, das macht EVs zu einer vielversprechenden Quelle für Biomarker. Eine Studie von Fiandaca et al. (2015) untersuchte die Konzentrationen an A $\beta$ , t-Tau und p-Tau in EVs aus Blutproben. Dabei konnte durch die Kombination aller drei Biomarker eine Sensitivität von 93 % und eine Spezifität von 100 % bei der Diagnose der Alzheimer-Krankheit erreicht werden. Auch Probanden ohne Symptome, welche Jahre später an Morbus Alzheimer erkrankten, konnten von gesunden Probanden diskriminiert werden.

### 1.5.3 Isolationsmethoden

Trotz des hohen Potentials der EVs im Bereich der Diagnostik stellt deren Isolierung aus Probenmaterial noch immer eine große Herausforderung dar, da die Unterschiede hinsichtlich der physikalischen Eigenschaften wie Größe, Morphologie und Auftriebsdichte zwischen Exosomen und anderen Mikrovesikeln nicht ausreichend sind (Guix et al., 2018). Hinzu kommt, dass es momentan noch an einer Standardisierung mangelt. Es kommen unterschiedliche Isolationsmethoden und eine unüberschaubare Vielzahl an Protokollen zum Einsatz (Konoshenko et al., 2018). Diese Varianz spiegelt sich auch in der Ausbeute und Qualität der isolierten EVs wider und erschwert den Vergleich von Ergebnissen zwischen unterschiedlichen Forschungsgruppen (Gould und Raposo, 2013).

Die Ultrazentrifugation gilt als "Goldstandard" in Bezug auf die EV-Isolierung. Im ersten Schritt werden größere Verunreinigungen wie Zellen und Zelltrümmer durch eine Zentrifugation mit niedriger Drehzahl entfernt. Im Anschluss erfolgt die Pelletierung der EVs mittels Hochgeschwindigkeitszentrifugation. Dabei variiert die Drehzahl je nach Protokoll zwischen 70000 und 120000 xg, auch die Anzahl der Zentrifugationsschritte kann abweichen (Greening et al., 2015). Das Verfahren ist sehr zeitaufwendig und erfordert hohe Mengen an Ausgangsmaterial. Zudem werden große Zentrifugen benötigt, die in Krankenhäusern oder kleinen Laboren normalerweise nicht zur Verfügung stehen. Darüber hinaus ist das Zentrifugationsverfahren nicht sehr spezifisch, so dass EVs unterschiedlicher zellulärer Herkunft, sowie Lipoproteine und Proteinaggregate mit vergleichbarer Größe und Dichte ebenfalls isoliert werden (Lobb et al., 2015).

Eine weitere physikalische Methode ist die Ultrafiltration, bei der EVs abhängig von ihrer Größe angereichert werden. Dafür kommen Membranfilter mit unterschiedlichen Toleranzgrenzen für das Molekulargewicht zum Einsatz, so dass nur EVs oberhalb dieser Toleranzgrenze isoliert werden (Li et al., 2017). Die Partikelausbeute und die Reinheit der Probe werden auch hier maßgeblich von den verwendeten Membranen, Waschpuffern und Zentrifugationsschritten beeinflusst (Lobb et al., 2015). Die Präsentation von zellspezifischen Oberflächenmarkern auf der Membran der EVs erlaubt eine Isolation nach ihrem zellulären Ursprung. Hierfür werden Antikörper entweder auf einer Matrix oder auf magnetischen Beads immobilisiert. Mit entsprechenden Oberflächenmarkern ausgestattete EVs binden, alle anderen werden durch die nachfolgenden Waschschrte entfernt. Anschließend können die zellspezifischen EVs mithilfe von Elutionspuffern von den Antikörpern gelöst und analysiert werden (Li et al., 2017). Im Zuge der Alzheimer-Diagnostik können von Neuronen stammende EVs aus dem Blut isoliert und anschließend Biomarker-Konzentrationen von t-Tau, p-Tau und A $\beta$  bestimmt werden (Fiandaca et al., 2015; Guix et al., 2018).

## 1.6 Zielstellung der Arbeit

Tau ist ein vielversprechender Biomarker für Morbus Alzheimer, aktuelle Nachweisverfahren eignen sich jedoch nur bedingt für eine Frühdiagnose der Krankheit. Ziel dieser Arbeit ist daher die Entwicklung eines Assays zur Detektion von Tau in Blutproben. Auf diese Weise ließen sich einerseits gesundheitliche Risiken für den Patienten minimieren und andererseits neue Konzepte zum Screening breiter Bevölkerungsschichten realisieren. Da die Konzentration des freien Biomarkers im Blut sehr gering ist, soll der Nachweis in extrazellulären Vesikeln (EVs) erfolgen. Diese schützen eingeschlossene Biomoleküle wie Tau vor der Degradation.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der Identifizierung geeigneter humaner Zelllinien, welche Tau in extrazellulären Vesikeln sekretieren. Diese sollen mittels Western Blot hinsichtlich der Bildung Tau-beladener EVs untersucht werden und als *in-vitro* Modelle Anwendung finden.

In einem zweiten Schritt soll ein Assay für den Nachweis von Tau entwickelt werden. Hierfür werden zunächst geeignete Antikörper in einem ELISA als vergleichende "Goldstandard"-Methode getestet. Anschließend wird das Testsystem auf einen homogenen Immunoassay mit lumineszenten Beads übertragen. Der Bead-basierte Assay erfordert keine Waschschrte und erlaubt einen schnellen und einfachen Nachweis des Tau-Proteins. Zudem ermöglicht das Assayprinzip die Integration eines weiteren Analyten. So soll langfristig ein hochintegriertes Nachweisverfahren für die simultane Quantifizierung von t-Tau und p-Tau in EVs aus Blut entwickelt werden, welches die Frühdiagnose der Alzheimer-Krankheit in Blutproben ermöglicht.

## **2 Material**

### **2.1 Chemikalien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Katalognummer</b>	<b>Hersteller</b>
1-Step Ultra 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	34028	Thermo Fisher Scientific
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	6763.3	Carl Roth
2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris)	4855	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	9178	Carl Roth
Bromphenolblau	A.11746	Merck Millipore
di-Natriumhydrogenphosphat	P030	Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	6908	Carl Roth
Glycerin	3782	Carl Roth
Glycin	0079	Carl Roth
Isopropanol	9866	Carl Roth
Kaliumchlorid	P017	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	3904	Carl Roth
Methanol	KK39	Carl Roth
Natriumcarbonat	P028.2	Carl Roth
Natriumchlorid	P029	Carl Roth
Natriumcyanoborhydrid	818053	Sigma Aldrich
Natriumdeoxycholat	D6750	Sigma Aldrich
Natriumhydrogencarbonat	6885	Carl Roth
Natriumhydroxid	6771	Carl Roth
Natriumlaurylsulfat (SDS)	2326	Carl Roth
ProClin 300	48912-U	Sigma Aldrich
ROTIPHORESE NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30 % (29:1)	A124	Carl Roth
Schwefelsäure 0.5 M	K027.1	Carl Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	2367	Carl Roth
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	9090	Carl Roth
Triton X100	3051	Carl Roth
Tween-20	9127	Carl Roth

## 2.2 Molekularbiologische Reagenzien

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
Albumin, IgG-frei	3737	Carl Roth
AlphaPlex Tb Acceptor Beads	6782001B	Perkin Elmer
Amersham EC Rainbow Marker	GERPN800E	GE Healthcare
Anti-Mouse IgG Alpha Donor Beads	AS104M	Perkin Elmer
EASYpack Protease Inhibitor Cocktail	4693132001	Roche
Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2	P5726	Sigma Aldrich
Precision Plus Protein All Blue Standards	161-0373	Bio-Rad
Recombinant Human Tau441 protein (n-Tau)	ab84700	Abcam
Recombinant Human Tau441 protein, phosphorylated (p-Tau)	MAPT 38H	Creative Biomart

## 2.3 Antikörper

Bezeichnung	Klone laut Hersteller	Spezifität	Stock	Wirt
t-Tau-AK	D1M9X (#46687, CST)	t-Tau	18 µg/mL	Kaninchen
Tau-AK	7B8 (ab27162, Abcam)	t-Tau	1 mg/mL	Maus
Tau46-AK	Tau46 (ab203179, Abcam)	t-Tau	101 µg/mL	Maus
anti-Maus-AK	anti Mouse HRP (GAMHRP, Dianova)	Maus	800 µg/mL	Ziege
anti-Kaninchen-AK	anti Rabbit HRP (GARHRP, Dianova)	Kaninchen	1 mg/mL	Ziege
StarBright700-AK	StarBright Blue 700 (12004161, Bio-Rad)	Kaninchen	750 µg/mL	Ziege

## 2.4 Zelllinien

Bezeichnung	Ursprung	Zur Verfügung gestellt von
HDLM-2	Humane Suspensions-Zelllinie, gewonnen 1982 aus dem Pleuraerguss eines 74-jährigen Mannes mit Hodgkin-Lymphom im Stadium IV.	Dr. Holger Cynis, Fraunhofer IZI Abteilung Molekulare Wirkstoffbiochemie und Therapieentwicklung
SH-SY5Y	Humane Adhäsions-Zelllinie, klonale Sublinie der Zelllinie SK-N-SH. Diese wurde 1970 aus der Knochenmark-Biopsie eines vierjährigen Mädchens mit metastierendem Neuroblastom gewonnen.	Dr. Holger Cynis, Fraunhofer IZI Abteilung Molekulare Wirkstoffbiochemie und Therapieentwicklung

## 2.5 Zellkulturmedien und Zusätze

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D2650	Sigma Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F-12 (1:1)	31330-038	Thermo Fisher Scientific
Fetal Bovine Serum, heat inactivated (hiFBS)	A3840101	Thermo Fisher Scientific
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	15140122	Thermo Fisher Scientific
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640	21875-034	Thermo Fisher Scientific
Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (0.25%)	25200056	Thermo Fisher Scientific

## 2.6 Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
CellTiter 96 AQueous One Solution	G3582	Promega
Pierce™ Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit	23225	Thermo Fisher Scientific

## 2.7 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
175 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche	660175	Greiner Bio-One
250 mL Suspensions-Zellkulturflasche	658190	Greiner Bio-One
Amersham 0.2 NC Nitrocellulose Membran	10600006	GE Healthcare
Cellstar, 96-well Mikrotiterplatte	655180	Greiner Bio-One
Centricon Plus-70, 100 kDa	UFC710008	Merck Millipore
Corning Spritzenvorsatzfilter, 28 mm, 0.2 µm Poren	CLS431218	Sigma Aldrich
Extra Thick Blot Paper	1703969	Bio-Rad
Nalgene Kryoröhrchen, 2mL	5000-0020	Thermo Fisher Scientific
Nunc MaxiSorp flat-bottom, 96-well Mikrotiterplatte	44-2404-21	Thermo Fisher Scientific
OptiPlate-384 weiß, 384-well Mikrotiterplatte	6007290	Perkin Elmer
Zählkammer Neubauer Improved 0.1	BR717805	Sigma Aldrich

## 2.8 Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
AlphaLISA Immunoassay Buffer (10x)	AL000C	Perkin Elmer
Odyssey Blocking Buffer	927-40000	LI-COR Biosciences
<hr/>		
Anodenpuffer	5 mL Transferpuffer 15 mL Methanol 30 mL doppelt destilliertes Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	
<hr/>		
Blockierungspuffer 5 % (w/v)	5 g Albumin 100 mL PBS	
<hr/>		
Carbonatpuffer, pH 9.6	4.2 g Natriumhydrogencarbonat 5.3 g Natriumcarbonat In 1000 mL ddH <sub>2</sub> O	
<hr/>		
Immunoassaypuffer (IAB)	1 mL AlphaLISA Immunoassay Buffer (10x) 9 mL ddH <sub>2</sub> O	
<hr/>		
Kathodenpuffer	5 mL Transferpuffer 10 mL Methanol 250 µL SDS 10 %ig 35 mL ddH <sub>2</sub> O	
<hr/>		
Laemmli-Puffer (LB) 6x	3.75 mL 1 M Tris-HCl pH 6.8 1.2 g SDS 6 mL Glycerol 6 mg Bromphenolblau 0.93 g DTT 250 µL ddH <sub>2</sub> O 1 Tropfen 10 M Natriumhydroxid	
<hr/>		
PBST 0.1 % (v/v), pH 7.4	1 mL Tween-20 999 mL PBS	
<hr/>		
Phosphatgepufferte Saline (PBS), pH 7.4	8.18 g Natriumchlorid 0.2 g Kaliumchlorid 0.2 g di-Natriumhydrogenphosphat 1.2 g Kaliumdihydrogenphosphat In 1000 mL ddH <sub>2</sub> O	

Radioimmunopräzipitationsassay-Puffer (RIPA-Puffer), pH 7.6	3.94 g Tris-HCl 8.766 g Natriumchlorid 10 mL Triton X100 5 g SDS 5 g Natriumdeoxycholat In 1000 mL ddH <sub>2</sub> O
Towbin-Puffer, pH 8.6	0.6 g Tris 2.9 g Glycin 20 mL SDS 10 %ig In 1000 mL ddH <sub>2</sub> O
Transferpuffer	29.1 g Tris 14.6 g Glycin In 500 mL ddH <sub>2</sub> O
Western Blot Puffer (WB-Puffer)	50 mL Odyssey Blocking Buffer 50 mL PBS

## 2.9 Geräte und Software

Bezeichnung	Hersteller
<i>Gefrierbehälter</i> Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific
<i>Gelkammer</i> Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad
<i>Heizblock</i> Thermomixer compact	Eppendorf
<i>Imagingsystem</i> ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad
<i>Inkubator</i> HERA Cell 240	Thermo Fisher Scientific
<i>Mikroplattenleser</i> Infinite M1000 PRO	Tecan Group
<i>Mikroplattenleser</i> Infinite M200 PRO	Tecan Group
<i>Mikroplattenleser</i> Mithras LB940	Berthold Technologies
<i>Rollenmischer</i> RM5 Assistent 348	Glaswarenfabrik Karl Hecht
<i>Schüttler</i> Titramax 100	Heidolph Instruments
<i>Schwenker</i> Polymax 1040	Heidolph Instruments
<i>Sterilwerkbank</i> HERA Safe	Thermo Fisher Scientific
<i>Tischzentrifuge</i> Centrifuge 5424R	Eppendorf
<i>Transfer-Kammer</i> Trans-Blot SD Semidry Transfer Cell	Bio-Rad
<i>Ultraschallbad</i> Ultrasonic Cleaner	VWR International

---

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Ultraschallstab</i> Sonopuls	Bandelin electronic
<i>Vortex-Mixer</i> VVR3	VWR International
<i>Zentrifuge</i> Multifuge 3 S-R	Heraeus
<i>Software für Datenauswertung und -darstellung</i> GraphPad Prism	GraphPad Software
<i>Software für den Mikroplattenleser</i> Tecan M1000 i-control	Tecan Group
<i>Software zur Auswertung der Western Blots</i> Image Lab	Bio-Rad

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellkultur**

Laut des humanen Proteinatlas weisen die zwei Zelllinien HDLM-2 und SH-SY5Y eine hohe RNA-Expression des Tau-Proteins auf (The human protein atlas, o. J.), für die Gewinnung von Probenmaterial wurden deshalb beide Zelllinien kultiviert. Alle benötigten Zellkulturmedien und Puffer wurden vor der Verwendung in einem Wasserbad auf 37 °C temperiert.

#### **3.1.1 Kultivierung der Zelllinie HDLM-2**

Für die Kultivierung der Suspensions-Zelllinie HDLM-2 (im Folgenden als HDLM2 bezeichnet) wurde ein in Flüssigstickstoff gelagertes Kryoröhrchen mit 1 mL Zellsuspension für 2 min bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig resuspendiert und in 9 mL frisches Medium (RPMI-Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) und 20 % hiFBS) überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min bei Raumtemperatur (RT) und 300 xg zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Danach wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen in 1 mL frischem Medium resuspendiert. Die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) empfiehlt, HDLM2-Zellen in einer Konzentration von  $1E^6$  Zellen/mL auszusäen (dsmz, o. J.), deshalb wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Hierfür wurde eine Lebend-Tot-Färbung mit Trypanblau durchgeführt. Die Zellsuspension wurde anschließend in frischem Medium auf  $1E^6$  Zellen/mL verdünnt und in einer 250 mL Suspensions-Zellkulturflasche bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) kultiviert.

Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen passagiert und gleichzeitig ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierfür wurde die Zellsuspension für 5 min bei RT und 300 xg zentrifugiert, das alte Medium abgesaugt und die Zellen in 5 mL frischem Medium resuspendiert. Danach wurde wie oben beschrieben eine Zellzählung durchgeführt. Um die Zellen keinem übermäßig hohen Stress durch zu häufiges Passagieren auszusetzen, wurde die Zellsuspension in frischem Medium auf eine Konzentration von  $0.5E^6$  Zellen/mL eingestellt und erneut bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Um die Zellen für spätere Experimente langfristig zu lagern, empfiehlt sich eine Kryokonservierung. Hierfür wurde die Zellsuspension für 5 min bei RT und 300 xg zentrifugiert, das alte Medium abgesaugt und die Zellen in 1 mL frischem Medium mit 10 % DMSO resuspendiert. DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen und schützt die Zellen beim Einfrieren vor Schädigungen (Meryman, 2007). Um die Zelllinie nach dem Auftauen in einer 25 mL Suspensions-Zellkulturflasche mit 5 mL Medium wieder in Kultur nehmen zu können, wurde ein Zellzahl von  $5E^6$  Zellen/mL eingestellt. Die Zellen wurden zu je 1 mL pro 2 mL Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C im mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter Mr. Frosty eingefroren. Dies gewährleistet eine konstante Kühlrate von -1 °C/min und resultiert in

einer hohen Überlebensrate der Zellen (Shu et al., 2010). Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen für die Langzeitlagerung in einen Flüssigstickstofftank mit  $-196\text{ °C}$  überführt.

### 3.1.2 Viabilität der HDLM2-Zellen in Medium ohne Serum

Die Belastung an EVs aus fremden Quellen sollte so gering wie möglich gehalten werden. Da das im Medium verwendete hiFBS eine hohe Anzahl an EVs enthält, empfiehlt es sich, auf Serum zu verzichten (Lehrich et al., 2018). Deshalb wurde zunächst getestet, wie sich die Kultivierung der Zelllinie HDLM2 in Medium ohne hiFBS auf die Viabilität der Zellen auswirkt. Für die Zelllinie SH-SY5Y ist die Zellviabilität in Medium ohne Serum bereits aus früheren Projekten bekannt und wurde deshalb an dieser Stelle nicht untersucht.

Für die Untersuchung der Zellviabilität wurde ein Zellviabilitätsassay mit der CellTiter Aqueous One Solution von Promega durchgeführt. Das Messprinzip beruht auf der Reduktion der Chemikalie MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) zu einem löslichen Farbstoff im Metabolismus lebender Zellen. Die Konzentration des gebildeten Farbstoffs im Medium kann mittels Absorption detektiert werden und dient als Maß für die Viabilität der Zellen (Promega, 2012).

Für den Assay wurde zwei Mal je 1 mL der kultivierten Zellsuspension ( $1.5 \times 10^6$  Zellen/mL) für 5 min bei RT und 300 xg abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen entweder in 1 mL Serum-freiem Medium (RPMI mit 1 % P/S) oder in 1 mL Medium mit Serum (RPMI mit 20 % hiFBS und 1 % P/S) resuspendiert. Die Zellzahl wurde in beiden Ansätzen wie unter 3.1.1 beschrieben bestimmt und mit dem entsprechenden Medium auf  $0.5 \times 10^6$  Zellen/mL eingestellt. Anschließend wurden jeweils 100  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension in Triplikaten auf eine Cellstar 96-well Mikrotiterplatte pipettiert und 24, 48 bzw. 72 h bei  $37\text{ °C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Medium mit und ohne Serum ebenfalls in Triplikaten mitgeführt. Eine Stunde vor Ende der Inkubationszeit wurden 20  $\mu\text{L}$  CellTiter Aqueous One Solution in die entsprechenden Kavitäten gegeben und eine weitere Stunde bei  $37\text{ °C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Absorptionsmessung bei 490 nm im Mikroplattenleser Tecan M200.

### 3.1.3 Kultivierung der Zelllinie SH-SY5Y

Für die Kultivierung der adhärennten Zelllinie SH-SY5Y (im Folgenden als SH bezeichnet) wurde ein bei  $-196\text{ °C}$  gelagertes Kryotube mit 1 mL Zellsuspension für 2 min bei  $37\text{ °C}$  im Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und in 9 mL frisches Medium (DMEM/F-12 (1:1) mit 10 % hiFBS und 1 % P/S) überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension in einer 175  $\text{cm}^2$  Zellkulturflasche bei  $37\text{ °C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach 12 h wurde das Medium gewechselt, um zytotoxische DMSO-Reste zu entfernen, indem das alte Medium abgesaugt und 30 mL frisches Medium

hinzugegeben wurde. Dieser Vorgang wurde alle zwei bis drei Tage wiederholt, um die Zellen mit frischen Nährstoffen zu versorgen und zelltoxische Ausscheidungen zu entfernen. Bei sehr dichtem Zellwachstum wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen einmal vorsichtig mit 20 mL PBS gewaschen, um Reste von hiFBS zu entfernen. Um die SH-Zellen zu passagieren, wurden 2 mL Trypsin/EDTA in die Zellkulturflasche gegeben und nach 5 min die abgelösten Zellen in 10 mL frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde aliquotiert und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Für die Kryokonservierung wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen wie oben beschrieben einmal mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Die abgelösten Zellen wurden in 10 mL frischem Medium mit 10 % DMSO resuspendiert und es wurde wie in 3.1.1 beschrieben eine Zellzählung durchgeführt. Durch Zugabe von frischem Medium mit 10 % DMSO wurde eine Zellzahl von 2E<sup>6</sup> Zellen/mL eingestellt und jeweils 1 mL Aliquots der Zellsuspension in 2 mL Kryoröhrchen überführt. Diese wurden bei -80 °C im mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter Mr. Frosty eingefroren. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen in einen Flüssigstickstofftank überführt.

## **3.2 Gewinnung von Probenmaterial aus den Zelllinien**

### **3.2.1 Herstellung von Gesamtproteinlysate**

Die beiden Zelllinien HDLM2 und SH sollten hinsichtlich ihrer Tau-Expression untersucht werden. Hierfür wurden Gesamtproteinlysate beider Zelllinien hergestellt.

Die SH-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90 bis 100 % wie unter 3.1.2 beschrieben trypsinisiert und anschließend in 10 mL frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei RT und 300 xg abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet bei -80 °C gelagert.

Die HDLM2-Zellen wurden bei einer Zelldichte von etwa 1.5E<sup>6</sup> Zellen/mL für 10 min bei RT und 300 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet bei -80 °C gelagert.

Für die Herstellung der Gesamtproteinlysate wurden die Zellpellets auf Eis aufgetaut. 1mL RIPA-Puffer wurde mit 1/8 Tablette Protease-Inhibitor versetzt, um die Proteine vor dem Abbau durch Proteasen zu schützen. Anschließend wurden die Zellpellets im präparierten RIPA-Puffer resuspendiert, gevortext, 15 min auf Eis inkubiert, 2 min ins Ultraschallbad gegeben und abschließend für 15 min bei 14000 xg und 4 °C zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu sedimentieren. Der Überstand wurde aliquotiert, die Proteinkonzentration bestimmt und die Aliquote bei -20 °C eingefroren.

### **3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Um bei der Gelelektrophorese vergleichbare Mengen an Protein auftragen zu können, wurde die Proteinkonzentration der Lysate mittels Pierce BCA Protein Assay Kit bestimmt. In diesem Assay

kommen zwei Reaktionen zum Tragen. Bei der Biuret-Reaktion wird Kupfer in Form von  $\text{Cu}^{2+}$  im alkalischen Milieu durch Proteine zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert. In einem zweiten Schritt bildet  $\text{Cu}^{1+}$  mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure einen löslichen Farbstoff, welcher bei 562 nm detektiert werden kann. Da bei der Biuret-Reaktion speziell die Peptidbindungen der Proteine mit den Kupferionen aus der Lösung reagieren, ist die Intensität der Farbreaktion proportional zur Anzahl der Peptidbindungen (Gornali et al., 1949). Die Bildung des Farbstoffs führt zu einer höheren Absorption und korreliert mit der Proteinkonzentration.

*Reagenz A* und *Reagenz B* aus dem Kit wurden in einem Verhältnis von 50:1 gemischt. Für alle weiteren Schritte wurde der so entstandene Puffer verwendet. Um eine Standardkurve aufzunehmen, wurde Rinderserumalbumin (BSA) auf 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  verdünnt. Jeweils 25  $\mu\text{L}$  jedes Standards und der Gesamtproteinlysate von HDLM2- und SH-Zellen wurden in Triplikaten in eine Cellstar 96-well Mikrotiterplatte pipettiert und 200  $\mu\text{L}$  Puffer hinzugegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 30 s bei 500 rpm auf dem Schüttler gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wurde im Mikroplattenleser Tecan M200 bei 562 nm gemessen.

Die Messwerte wurden gemittelt und, um die Werte zu normalisieren, der Mittelwert für die Negativkontrolle (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA) von allen Standards und Proben abgezogen. Die normalisierten Standards wurden gegen die entsprechende BSA-Konzentration aufgetragen und eine nicht-lineare Regression durchgeführt. Mithilfe der so ermittelten Gleichung für die Standardkurve wurde die Protein-Konzentration der Proben SH und HDLM2 berechnet.

### 3.2.3 Aufkonzentrierung der extrazellulären Vesikel

Für die Aufkonzentrierung der EVs aus dem Überstand der beiden kultivierten Zelllinien wurde das Verfahren der Ultrafiltration angewendet. Hierfür wurden die Zellen zunächst in Medium ohne Serum inkubiert, um Verunreinigungen durch EVs aus dem hiFBS zu vermeiden.

Die Zelllinie SH wurde bei einer Konfluenz von etwa 70 bis 80 % für 24 h in Medium ohne hiFBS kultiviert. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit jeweils 20 mL PBS gewaschen, um Reste von hiFBS zu entfernen. Danach wurden 30 mL DMEM/F-12 mit 1 % P/S zugegeben und die Zellen für 24 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und für 10 min bei RT und 300 xg zentrifugiert, um Zellen und Zelltrümmer zu pelletieren. Zur Entfernung nicht pelletierter Zellen und apoptotischer Körperchen wurde der Überstand im Anschluss durch einen 0.2  $\mu\text{m}$  Spritzenvorsatzfilter gefiltert. Bis zur Aufkonzentrierung wurde der Überstand bei -80 °C gelagert, da höhere Temperaturen zur Degradation der EVs führen können (Jeyaram und Jay, 2017).

Die HDLM2-Zellen wurden für 5 min bei RT und 300 xg zentrifugiert, das alte Medium abgesaugt, die Zellen wie unter 3.1.1 beschrieben in einer Neubauer-Kammer gezählt, in RPMI-Medium mit 1 % P/S

auf eine Konzentration von  $1.5E^6$  Zellen/mL eingestellt und für 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurde die Zellsuspension wie oben beschrieben zentrifugiert, durch einen 0.2 µm Spritzenvorsatzfilter gegeben und bei -80 °C gelagert. Weitere 100 µL des Überstands wurden für eine spätere Untersuchung im Western Blot (siehe Abschnitt 3.3) als Überstand (SN) markiert und ebenfalls bei -80 °C gelagert.

Für die Ultrafiltration der Zellkulturüberstände wurden diese über Nacht (üN) bei 4 °C aufgetaut und die Centricon-Filtereinheiten für 10 min bei 4 °C und 3500 xg mit PBST gewaschen. Das Volumen der Überstände wurde ermittelt und für eine anschließende Bestimmung des Konzentrationsfaktors notiert. Die Überstände wurden auf die Filtereinheiten gegeben und für 10 min bei 4 °C und 1500 xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das Retentat für 2 min über Kopf bei 4 °C und 1000 xg in die Auffangeinheit des Filters zentrifugiert. Zur Berechnung des Konzentrationsfaktors wurde das Volumen des Retentats durch das Volumen des Überstands dividiert und der errechnete Konzentrationsfaktor notiert. Anschließend wurden die aufkonzentrierten EVs aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.3 Proteinanalyse

Für die beiden durchgeführten Western Blots wurden zunächst Proteine in einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Der Transfer der Proteine auf eine Membran erlaubt die Detektion der Proteine mit spezifischen Antikörpern.

Im ersten Western Blot wurden die Gesamtproteinlysate der Zelllinien HEK293, SH-SY5Y, PNT1A, PC3, 22Rv1 und LnCaP hinsichtlich ihrer Expression von Tau untersucht. In nachfolgender Tabelle 1 werden die Zellen kurz charakterisiert.

**Tabelle 1 Zelllinien für die Untersuchung der Tau-Expression**

Zelllinie	Spezies	Zelltyp	Referenz
HEK293	<i>Homo sapiens</i>	Embryonale Niere	(Graham et al., 1977)
SH-SY5Y	<i>Homo sapiens</i>	Neuroblastom	(Biedler et al., 1978)
PNT1A	<i>Homo sapiens</i>	Immortalisierte Prostatazellen	(Cussenot et al., 1991)
PC3	<i>Homo sapiens</i>	Prostatakarzinom	(Kaighn et al., 1979)
22Rv1	<i>Homo sapiens</i>	Prostatakarzinom	(Sramkoski et al., 1999)
LnCaP	<i>Homo sapiens</i>	Prostata-Adenokarzinom	(Horoszewicz et al., 1963)

Alle sechs Zelllinien waren bereits im Bestand der Arbeitsgruppe vorhanden, die benötigten Lysate wurden von Arbeitskollegen zur Verfügung gestellt. Sie wurden in PBS auf eine Proteinmenge von 20 µg Protein verdünnt, im Verhältnis 1:5 mit 6x LB versetzt und für 5 min bei 65 °C auf dem Heizblock erhitzt. Durch die im LB-Puffer enthaltenen Reagenzien DTT und SDS werden die Proteine denaturiert und negativ beladen, eine Temperaturerhöhung beschleunigt den Prozess. Die Neutralisierung der Eigenladung und die Auflösung aller Proteinfaltungen ermöglicht eine Auftrennung im Gel nur in Abhängigkeit der Molekülmasse (Corley, 2004).

Für die SDS-PAGE wurde ein Polyacrylamid-Gel mit einer Schichtdicke von 1.5 mm und zehn Taschen verwendet. Um die Auftrennung zu verbessern, wurde erst das 10 %ige Trenngel und darüber ein 5 %iges Sammelgel gegossen (siehe Tabelle 2). Das Sammelgel hat eine größere Maschenweite, welche alle Proteine rasch durchwandern. Auf diese Weise werden zu Beginn der Gelelektrophorese die Proteine konzentriert, wodurch im Anschluss die Bandenschärfe erhöht wird. Für die Gelelektrophorese wurde das Gel in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt, diese mit Towbin-Puffer gefüllt und die Proben geladen. Als Marker wurden 4 µL Amersham Rainbow (12 bis 225 kDa) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde für 20 min bei konstant 80 V und für weitere 1.5 h bei konstant 150 V durchgeführt.

**Tabelle 2 Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die Gelelektrophorese**

Sammelgel 5 %	
5	mL Acrylamid/Bis-Lösung 30 %ig
3.8	mL 1.5 M Tris-HCl pH 8.6
5.9	mL ddH <sub>2</sub> O
150	µL SDS 10 %ig
150	µL APS 10 %ig
6	µL TEMED
Trenngel 10 %	
625	µL Acrylamid/Bis-Lösung 30 %ig µL
630	µL 1 M Tris-HCl pH 6.8
3.645	mL ddH <sub>2</sub> O
50	µL SDS 10 %ig
50	µL APS 10 %ig
5	µL TEMED

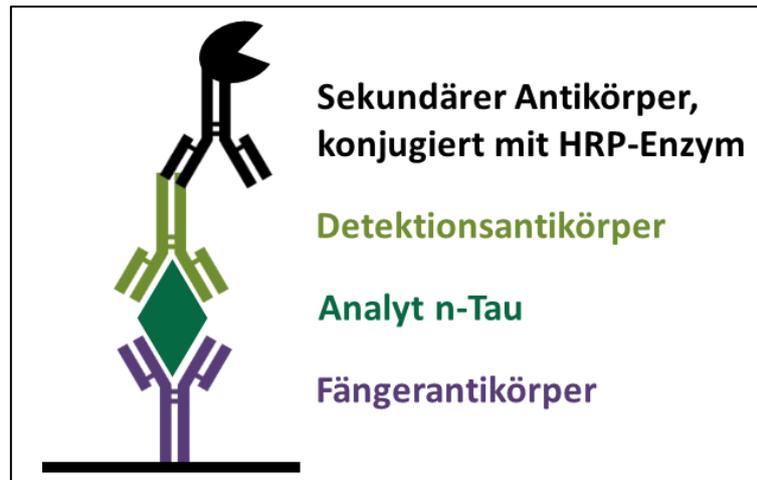
Für den Western Blot wurde das nicht mehr benötigte Sammelgel entfernt und das Trenngel mit ddH<sub>2</sub>O gespült, um Reste des Towbin-Puffers zu entfernen. Ein Filterpapier und die Nitrozellulose-Membran wurden in Anoden-Puffer getränkt, das Gel und ein weiteres Filterpapier in Kathoden-Puffer. Anschließend wurde der Sandwich aus Filterpapier (Anoden-Puffer), Membran, Gel und Filterpapier (Kathoden-Puffer) von unten nach oben in der Transfer-Kammer aufgebaut. Der Transfer der Proteine

erfolgte durch das Anlegen einer konstanten Spannung von 25 V für 45 min. Hierbei bildet sich zwischen Anode und Kathode ein elektrisches Feld aus, in dem die negativ beladenen Proteine in Richtung der Anode und damit aus dem Gel in die Nitrozellulose-Membran wandern. Nach dem Blotting wurde das Gel verworfen. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde die Membranoberfläche für 1 h bei RT und 10 rpm auf dem Schwenker mit 10 mL Odyssey Blocking Buffer 1:1 in PBS abgeblockt. Anschließend wurde die Membran üN bei 4 °C und 10 rpm auf dem Schwenker mit 10 mL t-Tau-AK (1:1000 in WB-Puffer) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran vier Mal für je 4 min in PBST gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurden 10 mL Starbright700-AK 1:10000 in WB-Puffer verdünnt und für 1 h bei RT und 10 rpm auf dem Schwenker inkubiert. Abschließend wurde erneut vier Mal für je 4 min mit PBST gewaschen. Die Membranen wurden im Imagingsystem ChemiDoc mit dem Filter *Starbright 700* fotografiert, die Auswertung erfolgte mit der Software ImageLab. Hier wurden manuell alle Spuren und Banden, sowie die Molekularmassen des verwendeten Markers definiert. ImageLab interpoliert anhand dieser die Größe aller anderen markierten Banden.

In einem zweiten Western Blot wurde das Gesamtproteinlysate, die aufkonzentrierten EVs und der Überstand (SN) von HDLM2-Zellen auf Tau untersucht. Es wurden 20 und 40 µg Proteinmenge in der Gelelektrophorese eingesetzt, für die Untersuchung der EVs und des Überstands wurden jeweils 25 µL der unverdünnten Proben verwendet. Alle Proben wurden mit 6x LB im Verhältnis 1:5 versetzt und die SDS-PAGE und der Western Blot wie oben beschrieben durchgeführt. Als Marker wurden 4 µL All Blue Standard (2 bis 250 kDa) verwendet, da der Amersham Rainbow Marker nicht mehr zur Verfügung stand.

### 3.4 ELISA

Für den Nachweis von Tau in EVs wurde zunächst ein ELISA mit dem rekombinanten Protein n-Tau entwickelt (siehe Abbildung 4). In dem hier verwendeten Sandwich-ELISA ist ein Fängerantikörper (lila) an eine MaxiSorp 96-well Mikrotiterplatte gebunden. An diesen Antikörper bindet das rekombinante Protein n-Tau (dunkelgrün) und an n-Tau wiederum ein Detektionsantikörper (hellgrün). Der sekundäre Antikörper ist an ein Meerrettichperoxidase-Enzym (HRP) gekoppelt und spezifisch gegen den Detektionsantikörper gerichtet. Das HRP-Enzym setzt nach der Zugabe eines Substrats dieses in einen löslichen Farbstoff um, welcher anschließend mittels Absorption quantifiziert werden kann.



**Abbildung 4 Funktionsprinzip des Sandwich-ELISA:** Ein Fänger-Antikörper wird an eine feste Oberfläche gebunden. Der Analyt n-Tau bindet sowohl an den immobilisierten Fängerantikörper, als auch an den Detektionsantikörper. Dieser "Sandwich" wird durch einen sekundären Antikörper detektiert. Der sekundäre Antikörper ist mit einem HRP-Enzym gekoppelt, welches die Quantifizierung des Analyten durch die Umsetzung eines Substrats ermöglicht.

### 3.4.1 Grundprinzip des Tau-ELISA

Für den ELISA wurden 100 µL Tau-AK oder Tau46-AK als Fängerantikörper in Carbonatpuffer üN bei 4 °C und 450 rpm auf einer MaxiSorp 96-well Mikrotiterplatte inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden entfernt indem alle Kavitäten mit jeweils 300 µL PBS oder PBST gewaschen wurden. Verbliebene Reste wurden durch mehrmaliges Klopfen auf eine weiche, saugfähige Oberfläche sorgfältig entfernt. Dieser Waschschrift wurde zwei Mal wiederholt. Die Oberfläche wurde anschließend für 2 h bei RT und 450 rpm mit 200 µL Blockierungspuffer (5 % BSA in PBS) abgeblockt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Danach wurde erneut wie oben beschrieben drei Mal gewaschen. Anschließend wurde der Analyt n-Tau, soweit nicht anders erwähnt, in PBS auf eine Konzentration von 50 ng/mL verdünnt und je 100 µL der Verdünnung in eine Kavität pipettiert. Als Negativkontrolle diente reines PBS. Es folgten weitere 90 min Inkubationszeit bei RT und 450 rpm und drei Waschschriffe mit PBS oder PBST. Anschließend wurden jeweils 100 µL Detektionsantikörper t-Tau-AK in Blockierungspuffer für 2 h bei RT und 450 rpm auf der Platte inkubiert. Um das Hintergrundsignal zu minimieren, wurde vor der Inkubation mit dem sekundären Antikörper vier Mal mit je 300 µL PBS oder PBST gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde der Antikörper anti-Kaninchen-AK 1:10000 in Blockierungspuffer verdünnt und je 100 µL pro Kavität eingesetzt. Nach 1 h Inkubation bei RT und 450 rpm wurde weitere vier Male mit PBS oder PBST gewaschen. Für den Nachweis wurde TMB-Substrat verwendet, welches durch das Enzym HRP zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird. Jeweils 100 µL des Substrates wurden in jede Kavität pipettiert und die Reaktion nach

5 min Inkubationszeit mit 100  $\mu\text{L}$  0.5 M Schwefelsäure abgestoppt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 450 nm im Mikroplattenleser Mithras.

Für die Auswertung wurde das Signal der Negativkontrollen gemittelt, von dem jeweiligen Signal der Proben subtrahiert und anschließend Mittelwert und Standardabweichung der normalisierten Proben berechnet.

### **3.4.2 Wahl eines geeigneten Fängerantikörpers für den Sandwich-ELISA**

Die beiden Antikörper Tau-AK und Tau46-AK wurden hinsichtlich ihrer Eignung als Fängerantikörper untersucht. Hierfür wurden sie mit einer Konzentration von 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\bar{u}\text{N}$  auf der Maxisorp-Platte inkubiert und anschließend wie oben beschrieben ein ELISA durchgeführt. Der Analyt n-Tau wurde in PBS auf 1, 2.5 und 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  verdünnt, der Detektionsantikörper t-Tau-AK in einer Verdünnung von 1:1000 (18 ng/mL) verwendet. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt, alle Waschschritte erfolgten mit PBS.

### **3.4.3 Bindung des Fängerantikörpers an die Platte**

Es wurde überprüft, ob die Adsorption des Fängerantikörpers Tau-AK an die Platte ausreichend reproduzierbar ist oder ob eine andere Immobilisierungsstrategie notwendig ist. Hierfür wurden drei separate Ansätze mit jeweils 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  des Tau-AK in Carbonatpuffer hergestellt. Auf einer Maxisorp-Platte wurde jeder Ansatz in Triplikaten  $\bar{u}\text{N}$  bei 4 °C und 450 rpm inkubiert. Auf einer zweiten Platte wurde jeder Ansatz in Duplikaten  $\bar{u}\text{N}$  bei 4 °C ohne Schütteln (0 rpm) inkubiert. Danach wurde drei Mal mit PBS gewaschen und die Oberfläche mit 200  $\mu\text{L}$  Blockierungspuffer abgeblockt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde der Antikörper anti-Maus-AK 1:10000 in Blockierungspuffer verdünnt und zum Nachweis des Tau-AK je 100  $\mu\text{L}$  in jede Kavität pipettiert. Nach 1 h Inkubation wurde erneut drei Mal gewaschen und anschließend das Substrat TMB zugegeben. Der Farbumschlag wurde nach 5 min mit Schwefelsäure abgestoppt und wie oben beschrieben die Platte bei 450 nm gemessen und der Versuch ausgewertet.

### **3.4.4 Titration des Fänger- und Detektionsantikörpers**

Um die optimale Konzentration des Fänger- und Detektionsantikörpers im Sandwich-ELISA zu ermitteln, wurden beide Antikörper titriert. Hierfür wurde der Tau-AK mit 0, 2, 3.5, 5, 7.5 und 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in Duplikaten auf einer MaxiSorp-Platte inkubiert und wie oben beschrieben ein ELISA durchgeführt. Der Detektionsantikörper t-Tau-AK mit einer Ausgangskonzentration von 18  $\mu\text{g}/\text{mL}$  wurde 1:500, 1:1000, 1:1500 und 1:2000 in PBS verdünnt. Gewaschen wurde ebenfalls mit PBS.

### 3.4.5 Titration des Detektionsantikörpers

In einem weiteren Experiment wurden die beiden Verdünnungen 1:500 und 1:1000 des Detektionsantikörpers t-Tau-AK erneut getestet. Der Tau-AK wurde in den Konzentrationen 0 und 5 µg/mL auf einer Platte inkubiert und wie oben beschrieben ein ELISA durchgeführt. Es wurde wieder in Duplikaten gearbeitet, gewaschen wurde hier jedoch mit PBST.

### 3.4.6 Aufnahme einer Kalibrierkurve

Um die Sensitivität des ELISAs zu bestimmen, wurde eine Kalibrierkurve aufgenommen. Es wurde in Triplikaten gearbeitet und das Experiment an drei Tagen wiederholt, die einzelnen Kurven wurden mit Kalibrierkurve A, B und C bezeichnet. Der Tau-AK wurde mit einer Konzentration von 5 µg/mL auf der Platte inkubiert. Die verwendeten Analyt-Konzentrationen können aus Tabelle 3 entnommen werden, in Kalibrierkurve B kam es aufgrund eines Verdünnungsfehlers zu abweichenden Konzentrationen von n-Tau. Der Detektionsantikörper t-Tau-AK wurde 1:1000 in PBS verdünnt, gewaschen wurde wieder mit PBST.

**Tabelle 3 Pipettierschema für die Aufnahme einer ELISA-Kalibrierkurve**

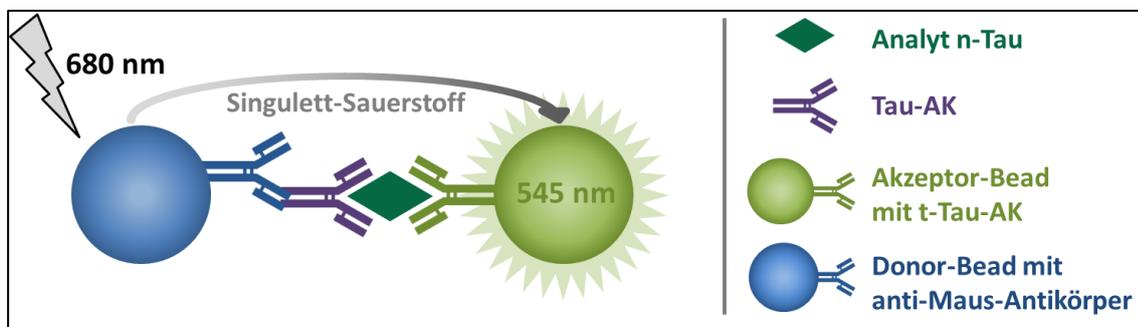
n-Tau [g/mL]	A	B	C
0	✓	✓	✓
1.3E <sup>-13</sup>		✓	
1.3E <sup>-12</sup>		✓	
2.5E <sup>-12</sup>		✓	
1.0E <sup>-10</sup>	✓		✓
2.5E <sup>-10</sup>		✓	
5.0E <sup>-10</sup>	✓		✓
1.0E <sup>-9</sup>	✓		✓
5.0E <sup>-9</sup>		✓	✓
1.0E <sup>-8</sup>	✓		✓
5.0E <sup>-8</sup>	✓	✓	✓
1.0E <sup>-7</sup>	✓	✓	✓
5.0E <sup>-7</sup>	✓		

Als Maß für die Sensitivität des ELISAs wurden die untere Nachweisgrenze (LOD) und das untere Quantifizierungslimit (LOQ) des Assays berechnet. Für die Berechnung von LOD und LOQ wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aller Negativkontrollen ermittelt und für das LOD-Signal die dreifache, für das LOQ-Signal die zehnfache Standardabweichung zum Mittelwert der Negativkontrollen addiert. Anschließend wurden die Tau-Konzentrationen in logarithmische Werte

transformiert und eine nicht-lineare Regression durchgeführt. Anhand der Standardkurve wurden der LOD und LOQ ermittelt.

### 3.5 AlphaLISA

Der *Amplified luminescent proximity homogeneous assay linked immunosorbent assay* (AlphaLISA) ist ein homogener Immunoassay und basiert auf der Verwendung von lumineszenten Beads. Er ähnelt in seinem Aufbau dem Sandwich-ELISA, der Nachweis erfolgt jedoch nicht immobilisiert auf einer Platte, sondern frei in Lösung. Das Grundprinzip des Assays ist in Abbildung 5 dargestellt. Der Detektionsantikörper t-Tau-AK ist an den Terbium-Akzeptorbead (hellgrün) konjugiert und bindet n-Tau. Der Fänger-Antikörper Tau-AK (lila) bindet ebenfalls an den Analyten. Der Donorbead ist mit anti-Maus-Antikörpern konjugiert (blau), welche wiederum an den Tau-AK binden. So werden Donor- und Akzeptorbeads in unmittelbare Nähe zueinander gebracht. Durch die Anregung des Donorbeads bei einer Wellenlänge von 680 nm wird Singulett-Sauerstoff freigesetzt. Dieser hat nur eine sehr begrenzte Halbwertszeit von 4  $\mu$ s und kann in Lösung eine Entfernung von ca. 200 nm zurücklegen. Befindet sich ein Akzeptorbead innerhalb dieser Distanz, wird die Energie des Sauerstoffs auf den Akzeptorbead übertragen, woraufhin dieser bei 545 nm luminesziert. Anderenfalls geht der Singulett-Sauerstoff wieder in seinen Grundzustand über und es wird kein Signal generiert (Beaudet et al., 2008).



**Abbildung 5 Funktionsprinzip des AlphaLISA:** Der Akzeptorbead bindet mittels Tau-spezifischer Antikörper an den Analyten. Der Donorbead wird mit anti-Maus-Antikörpern an einen weiteren Tau-spezifischen Antikörper gekoppelt. Durch Anregung der Donorbeads bei 680 nm wird Singulett-Sauerstoff auf die Akzeptorbeads übertragen, die resultierende Lumineszenz ist bei 545 nm messbar.

Der t-Tau-AK wurde nach dem Protokoll des Herstellers Perkin Elmer an die Akzeptorbeads konjugiert. Hierfür wurden zuerst 45  $\mu$ L Akzeptorbeads (20 mg/mL) mit 50  $\mu$ L PBS gemischt und für 15 min bei 16000 xg und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Beads in einem Ansatz aus 100  $\mu$ L t-Tau-AK (1 mg/mL), 100  $\mu$ L HEPES-Lösung (100 mM in ddH<sub>2</sub>O, pH 7.4), 1.25  $\mu$ L Tween-20 (10 % in ddH<sub>2</sub>O) und 10  $\mu$ L einer frisch angesetzten Natriumcyanoborhydrid-Lösung (400 mM in

ddH<sub>2</sub>O) resuspendiert. Die Konjugation erfolgte für 22 h bei 37 °C und 200 rpm. Anschließend musste die Oberfläche der Beads abgeblockt werden. Hierfür wurde eine Carboxymethoxylamin-Lösung (65 mg/mL in 800 mM Natriumhydroxid-Lösung) frisch angesetzt und 10 µL zu den Beads pipettiert. Es erfolgte erneut eine Inkubation für 1 h bei 37 °C und 200 rpm. Danach wurden die Beads für 15 min bei 14000 xg und 4 °C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Pellet in 200 µL einer Tris-HCl-Lösung (100 mM, pH 8.0) resuspendiert. Die Beads wurden auf Eis zehn Mal für je 1 s mit dem Ultraschallstab Sonopuls bei 20 % der maximalen Energie behandelt und erneut für 15 min bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, die Beads in Tris-HCl resuspendiert und erneut mit Ultraschall behandelt. Abschließend wurde noch einmal für 15 min bei 14000 xg und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Beads in 180 µL Proclin-300 (0.05 % in PBS) resuspendiert. Der Zusatz des Biozids Proclin-300 verhindert die Kontamination der Beads mit Mikroorganismen (Morkus et al., 2019). Die konjugierten Beads [5 mg/mL] wurden bis zur weiteren Verwendung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Für die Durchführung des AlphaLISAs wurde der Puffer IAB jedes Mal frisch angesetzt und für alle nachfolgenden Verdünnungen verwendet. Es wurde immer in Optiplate 384-well Mikrotiterplatten gearbeitet und die Messung der Lumineszenzintensität erfolgte im Mikroplattenleser Tecan M1000 mit der Software i-control. Hierfür wurde der AlphaScreen-Modus mit einem Fluoreszenzscan zwischen 520 und 620 nm verwendet.

Für die Auswertung wurde das Signal der Negativkontrollen gemittelt, von dem jeweiligen Signal der Proben subtrahiert und anschließend Mittelwert und Standardabweichung der normalisierten Proben berechnet.

### **3.5.1 Titration des Fängerantikörpers**

Als erster Optimierungsschritt wurde die optimale Konzentration des Fängerantikörpers Tau-AK im Assay ermittelt. Der Analyt n-Tau diente als Positivkontrolle und wurde in IAB auf eine Konzentration von 200 ng/mL verdünnt. Die Akzeptorbeads wurden auf eine Konzentration von 10 µg/mL verdünnt. Der Tau-AK wurde in Konzentrationen von 0,5, 1, 1,5 und 2 nM getestet. Für den ersten Inkubationsschritt wurden je 5 µL n-Tau mit 2,5 µL Tau-AK und 2,5 µL Akzeptorbeads in eine Kavität pipettiert, alle Ansätze erfolgten in Duplikaten.

Der Assay wurde für 1 h bei RT und 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Donorbeads auf 40 µg/mL verdünnt, zu jeder Kavität 40 µL Donorbeads gegeben und der Assay für 1 h lichtgeschützt bei RT und 200 rpm inkubiert. Danach wurde das Signal gemessen und der Versuch wie oben beschrieben ausgewertet.

### 3.5.2 Optimierung der Bead-Konzentrationen

Für die Optimierung des Verhältnisses zwischen Donor- und Akzeptorbeads hinsichtlich des besten Signal-Rausch-Verhältnisses wurde wieder mit einer n-Tau-Konzentration von 200 ng/mL und IAB als Negativkontrolle gearbeitet. Die Akzeptorbeads wurden auf 10, 20 und 30 µg/mL, der Tau-AK wurde auf 0.75, 1.125 und 1.5 nM verdünnt. Sowohl die Positivkontrollen als auch die Negativkontrollen wurden in Duplikaten angesetzt. Nach 1 h Inkubation bei RT und 200 rpm wurden die Donorbeads lichtgeschützt auf 20, 30 und 40 µg/mL verdünnt und jeweils 40 µL zu jeder Kavität gegeben. Nach 1 h Inkubation lichtgeschützt bei RT und 200 rpm wurde wie oben beschrieben das Signal gemessen. Für die statistische Auswertung des Versuchs wurde die Signifikanz aller Ergebnisse in Bezug auf das Verhältnis Akzeptor zu Donor = 10:40 µg/mL bestimmt.

### 3.5.3 Reihenfolge der Zugabe aller Komponenten

Die Reihenfolge der Zugabe aller Komponenten zur Reaktion kann die Sensitivität des Assays beeinflussen. Um die optimale Reihenfolge zu ermitteln, wurden nach Empfehlung des Herstellers Perkin Elmer vier verschiedene Protokolle getestet (siehe Tabelle 4). Als Positivkontrolle diente n-Tau mit einer Konzentration von 200 ng/mL, als Negativkontrolle IAB. Der Tau-AK wurde mit einer Konzentration von 1.5 nM eingesetzt, die Akzeptorbeads auf 10 µg/mL und die Donorbeads auf 40 µg/mL verdünnt. Anschließend wurden abhängig vom Protokoll die Komponenten pipettiert. Dabei wurden immer je 5 µL n-Tau oder IAB, 2.5 µL Tau-AK, 2.5 µL Akzeptorbeads und 40 µL Donorbeads verwendet. Für jedes Protokoll wurden Positiv- und Negativkontrollen in Duplikaten angesetzt.

Für die Variante A wurden n-Tau, der Tau-AK und die Akzeptorbeads zusammen für 1 h bei RT und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Donorbeads hinzugegeben und der Assay für eine weitere Stunde lichtgeschützt bei RT und 200 rpm inkubiert. Für die Variante B wurden die Donorbeads mit dem Tau-AK getrennt von n-Tau und den Akzeptorbeads für 1 h bei RT und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze vereint und für eine weitere Stunde lichtgeschützt bei RT und 200 rpm inkubiert. Die beiden Varianten A und B benötigen jeweils zwei Inkubationsschritte und werden deshalb als *zweistufig* bezeichnet.

Die Varianten C und D sind *dreistufig*, da hier drei separate Inkubationsschritte erfolgten. In Variante C erfolgte zuerst ein Inkubationsschritt für 1 h bei RT und 200 rpm nur mit n-Tau und dem Tau-AK. Danach wurden die Akzeptorbeads hinzugegeben und wieder für 1 h bei RT und 200 rpm inkubiert. In einem dritten Schritt wurden die Donorbeads hinzugegeben und für eine weitere Stunde lichtgeschützt bei RT und 200 rpm inkubiert. Für die Variante D wurden erst n-Tau und Akzeptorbeads für 1 h bei RT und 200 rpm inkubiert, anschließend für eine weitere Stunde der Tau-AK hinzugegeben und in einem dritten Schritt der Assay mit den Donorbeads für 1 h bei RT und 200 rpm inkubiert. Das entsprechende

Schema ist in Tabelle 4 dargestellt. Nach einer Inkubationszeit von zwei bzw. drei Stunden wurde das Signal gemessen und der Versuch wie oben beschrieben ausgewertet.

**Tabelle 4 Pipettierschema für die Wahl eines geeigneten AlphaLISA-Protokolls**

Variante	60 min	60 min	60 min
A		n-Tau + Tau-AK + Akzeptor	+ Donor
B		Donor + Tau-AK n-Tau + Akzeptor	Zusammen
C	n-Tau + Tau-AK	+ Akzeptor	+ Donor
D	n-Tau + Akzeptor	+ Tau-AK	+ Donor

### 3.5.4 Optimierung der Inkubationszeit

Auch die Inkubationszeit hat einen Einfluss auf die Sensitivität des Assays und sollte nach Möglichkeit optimiert werden. Für die Ermittlung der optimalen Inkubationszeit wurden zwei verschiedene Protokolle getestet, ein Einstufiges und ein Zweistufiges. Für das zweistufige Protokoll wurde Variante A aus dem vorhergehenden Versuch 3.5.3 verwendet. Es wurden 5 µL n-Tau oder IAB mit 2.5 µL Tau-AK und 2.5 µL Akzeptorbeads gemischt und für 1 h bei RT und 200 rpm inkubiert. Danach wurden 40 µL Donorbeads hinzugegeben und lichtgeschützt für weitere 30, 60, 120 bzw. 240 min bei RT und 200 rpm inkubiert. Für das einstufige Protokoll wurden alle Komponenten gleichzeitig pipettiert und der Assay lichtgeschützt bei RT und 200 rpm wie das Zweistufige inkubiert. n-Tau als Positivkontrolle hatte eine Konzentration von 200 ng/mL, die Negativkontrolle war IAB. Es wurde mit 1.5 nM Tau-AK, 10 µg/mL Akzeptorbeads und 40 µg/mL Donorbeads gearbeitet, der Versuch wurde in Duplikaten durchgeführt. Um eine Schädigung der lichtempfindlichen Donorbeads während der Messungen zu vermeiden, wurde für jede Inkubationszeit eine separate Platte verwendet.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten gemessen und der Versuch wie oben beschrieben ausgewertet.

### 3.5.5 Aufnahme einer Kalibrierkurve

Um die Sensitivität des AlphaLISAs zu ermitteln, wurde eine Kalibrierkurve mit dem einstufigen Protokoll aus 3.5.4 aufgenommen. Für die Bestimmung von LOD und LOQ wurden Negativkontrollen im 12-fachen Ansatz mitgeführt. Um die Kalibrierkurve zu erstellen, wurde der Analyt n-Tau auf  $1E^{-8}$ ,  $3E^{-8}$ ,  $1E^{-7}$ ,  $3E^{-7}$ ,  $1E^{-6}$ ,  $3E^{-6}$ ,  $1E^{-5}$ ,  $3E^{-5}$  und  $1E^{-4}$  g/mL verdünnt. Danach wurden jeweils 5 µL n-Tau oder IAB mit 2.5 µL Tau-AK (1.5 nM), 2.5 µL Akzeptorbead (10 µg/mL) und 40 µL Donorbead (40 µg/mL) gemischt und für 120 min lichtgeschützt bei RT und 200 rpm inkubiert. Das Signal wurde im Mikroplattenleser Tecan M1000 im AlphaScreen-Modus gemessen und die Auswertung mithilfe von GraphPad Prism durchgeführt. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die erste Kalibrierkurve wurde

---

ohne die Tau-Konzentrationen  $1E^{-4}$  und  $3E^{-5}$  g/mL aufgenommen, danach wurde der Assay-Bereich erweitert.

### 3.5.6 Assay mit biologischen Proben

Um Tau in EVs nachzuweisen, wurden Gesamtproteinlysate und EV-Lysate ebenfalls in Triplikaten in der ersten Kalibrierkurve mitgeführt. Dafür wurden jeweils 5  $\mu$ L Gesamtproteinlysate von SH ( $\approx 5$   $\mu$ g Protein) und HDLM2 ( $\approx 9.5$   $\mu$ g Protein) sowie 5  $\mu$ L EV-Lysat von SH (Konzentrationsfaktor 172 x) und HDLM2 (Konzentrationsfaktor 35 x) verwendet. Um die EVs zu lysieren, wurden sie zuvor 1:1 in IAB verdünnt, gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Die hohe Konzentration an Detergenzien im IAB (nach Angabe des Herstellers 0.25 bis 1.0 % Triton-X 100) ermöglicht die Lyse der EVs. In der zweiten Kalibrierkurve wurde zu allen vier Proben zusätzlich  $2.5E^{-6}$  g/mL n-Tau gegeben, dieser Vorgang wird als *Spiken* bezeichnet. Die dritte Kalibrierkurve wurde ohne weitere Proben aufgenommen.

Die Auswertung der Kalibrierkurven und des Assays mit biologischen Proben erfolgten analog zum ELISA (siehe Abschnitt 3.4.6).

## 3.6 Statistische Auswertung

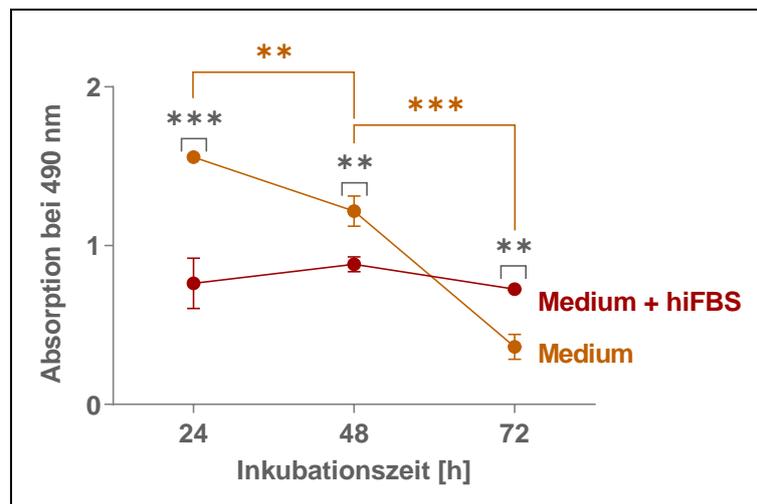
Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels zweiseitiger t-Tests für unabhängige Stichproben untersucht. Signifikante Unterschiede wurden in den Diagrammen durch Asterisken kenntlich gemacht.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Viabilität der HDLM2-Zellen in Medium ohne Serum

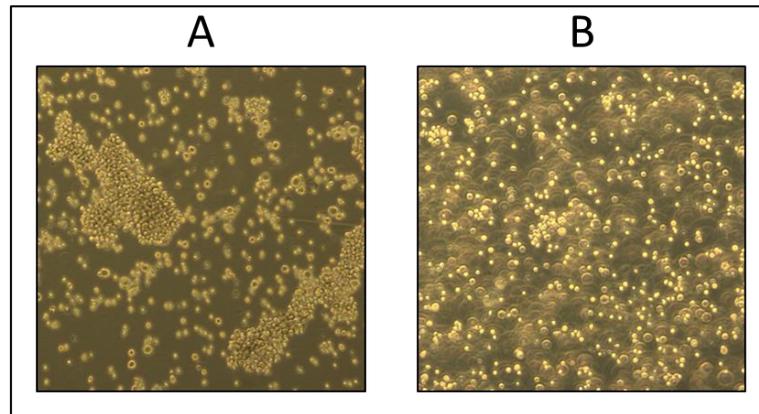
Um aus dem Überstand der HDLM2-Zellen EVs aufkonzentrieren zu können, wurde zunächst getestet, wie sich die Kultivierung von HDLM2 in Medium ohne hiFBS auf die Viabilität der Zellen auswirkt.

Die HDLM2-Zellen wurden für 24, 48 und 72 h in Medium mit und ohne Serum inkubiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 6 dargestellt, eine hohe Absorption steht für eine hohe Zellviabilität. Im Medium mit Serum (rot) sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Zeitpunkten zu erkennen. Im Medium ohne Serum (orange) sinkt die Zellviabilität nach 48 h signifikant ab ( $p \leq 0.01$ ), nach 72 h ist der Abfall noch deutlicher ( $p \leq 0.001$ ). Unabhängig davon lag die Zellviabilität in den ersten 48 h in Medium ohne Serum signifikant höher als in Medium mit Serum. Nach der Auswertung des Zellviabilitätsassays wurde eine Inkubationszeit von 48 h für die Kultivierung der Zellen in Serum ohne hiFBS gewählt.



**Abbildung 6 Viabilität der HDLM2-Zellen in Medium ohne Serum:** Die Zellviabilität der HDLM2-Zellen in Medium mit und ohne Serum wurde nach 24, 48 und 72 h gemessen. Für die Zellen in Medium mit hiFBS (rot) ist kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Zeitpunkten festzustellen. Für die Zellen in Medium ohne Serum sinkt die Zellviabilität nach 48 und 72 h signifikant ab. Unabhängig davon ist in den ersten 48 h eine signifikant höhere Zellviabilität für die Zellen in Medium ohne Serum im Vergleich zu HDLM2-Zellen in Medium mit Serum zu beobachten.  $n=3$ ,  $p \leq 0.01$  für \*\*,  $p \leq 0.001$  für \*\*\*, Fehlerbalken zeigen die  $\pm$  Standardabweichung.

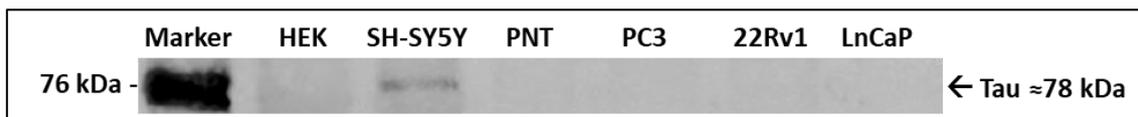
Auffällig ist, dass HDLM2-Zellen in Medium ohne Serum innerhalb weniger Minuten agglutinieren (Abbildung 7A). Sobald die Zellen in Medium mit hiFBS resuspendiert werden, vereinzeln sie sich wieder (Abbildung 7B).



**Abbildung 7 Mikroskopische Aufnahmen der HDLM2-Zellen in Medium mit und ohne Serum:** Die HDLM2-Zellen wurden in Medium mit und ohne Serum kultiviert. (A) In Medium ohne Serum agglutinieren die Zellen innerhalb weniger Minuten. (B) Durch die Zugabe von Medium mit hiFBS können die Zellen wieder vereinzelt werden.

## 4.2 Expression von Tau in humanen Zelllinien

Um humane Zelllinien mit einer hohen Tau-Expression zu identifizieren, wurden Gesamtproteinlysate der Zelllinien HEK293, SH-SY5Y, PNT1A, PC3, 22Rv1 und LnCaP in einem Western Blot analysiert. In Abbildung 8 ist nur für die Zelllinie SH eine Bande bei etwa 78 kDa zu erkennen, humanes Tau weist ein Molekulargewicht zwischen 37 und 46 kDa auf.



**Abbildung 8 Untersuchung der Expression von Tau in humanen Zelllinien:** Es wurden sechs verschiedene Zelllinien mit jeweils 20 µg Gesamtproteinlysate in einem Western Blot auf die Expression von Tau getestet. Bei der Zelllinie SH-SY5Y ist eine Bande bei etwa 78 kDa zu erkennen, für alle anderen Zelllinien ist keine Bande zu erkennen. Für humanes Tau wird eine Bande zwischen 37 und 46 kDa erwartet.

In einem weiteren Western Blot wurde die Zelllinie HDLM2 ebenfalls auf die Expression von Tau getestet. Hierfür wurden 20 und 40 µg Gesamtproteinlysate, sowie der Zellkulturüberstand und das EV-Lysat (Konzentrationsfaktor 35 x) aufgetragen. In Abbildung 9 ist zu erkennen, dass sowohl für die Gesamtproteinlysate (Spuren 2 und 3) als auch für das EV-Lysat (Spur 4) eine Bande bei etwa 68 kDa detektiert werden konnte. Die Banden für humanes Tau wurden in etwa zwischen 37 und 46 kDa erwartet. Gut zu erkennen ist außerdem, dass die Proteinmenge mit der Bandendicke korreliert, die Bande für 40 µg ist stärker ausgeprägt als für 20 µg. Im Überstand (Spur 1) ist keine Bande zu erkennen.

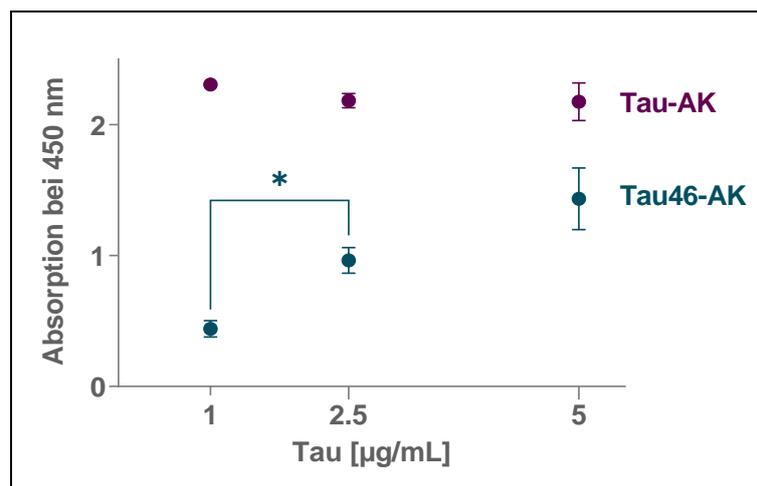


**Abbildung 9 Untersuchung der Expression von Tau in HDLM2-Zellen:** Die Zelllinie HDLM2 wurde in einem Western Blot auf die Expression von Tau untersucht. (Spur 1) Im Zellkulturüberstand (SN) ist keine Bande zu sehen. (Spur 2 und 3) Sowohl für 40 µg, als auch für 20 µg Gesamtproteinlysate ist eine Bande bei etwa 68 kDa zu erkennen. (Spur 4) Im Lysat aus 35 x angereicherten EVs konnte ebenfalls eine Bande bei etwa 68 kDa detektiert werden. Humanes Tau variiert in der Größe zwischen 37 und 46 kDa.

## 4.3 ELISA

### 4.3.1 Wahl eines geeigneten Fängerantikörpers für den Sandwich-ELISA

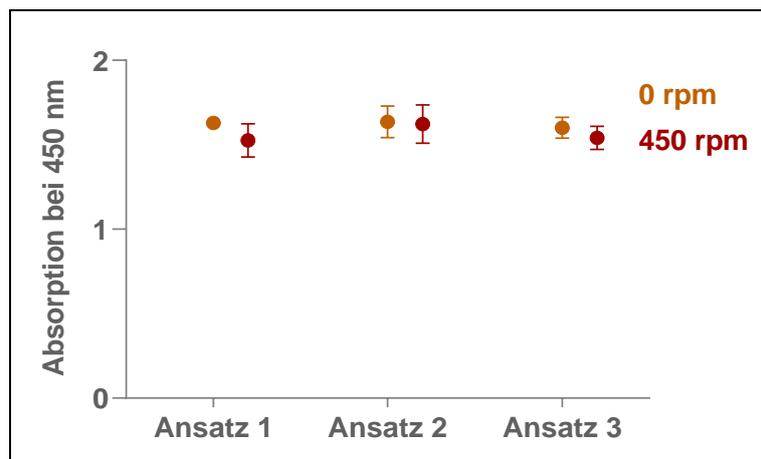
Für den Sandwich-ELISA wurden zwei verschiedene Antikörper (Tau-AK und Tau46-AK) hinsichtlich ihrer Eignung als Fängerantikörper getestet. Das Diagramm in Abbildung 10 zeigt die Absorption bei 450 nm in Abhängigkeit von der Konzentration an n-Tau. Für den Tau-AK (lila) ist zu erkennen, dass die Absorption unabhängig von der Konzentration des Analyten konstant bleibt, es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. Für den Tau46-AK (blau) ist hingegen ein signifikanter Anstieg ( $p \leq 0.05$ ) der Absorption zwischen 1 und 2.5 µg/mL n-Tau zu erkennen. Auch zwischen 2.5 und 5 µg/mL ist ein Trend zu erkennen, hier ist der Anstieg jedoch nicht mehr signifikant. Im Vergleich zum Tau-AK konnte der Tau46-AK also n-Tau weniger effektiv binden, so dass für eine starke Absorption auch eine höhere Analytkonzentration benötigt wurde. Deshalb wurde der Tau-AK als Fängerantikörper für den Sandwich-ELISA ausgewählt.



**Abbildung 10 Wahl eines geeigneten Fänger-Antikörpers für den Sandwich-ELISA:** Die beiden Fängerantikörper Tau-AK und Tau46-AK wurden auf einer MaxiSorp 96-well Mikrotiterplatte adsorbiert und mit unterschiedlichen Analytkonzentrationen inkubiert. Für den Tau-AK ist eine konstante Absorption über alle Konzentrationen an n-Tau zu erkennen, es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. Der ELISA mit Tau46-AK als Fängerantikörper weist eine signifikant geringere Absorption bei 1 µg/mL n-Tau im Vergleich zu 2.5 µg/mL n-Tau auf. Zwischen 2.5 und 5 µg/mL n-Tau ist ebenfalls ein Trend zu erkennen.  $n=2$ ,  $p \leq 0.05$  für \*, Fehlerbalken zeigen die  $\pm$  Standardabweichung.

#### 4.3.2 Bindung des Fängerantikörpers an die Platte

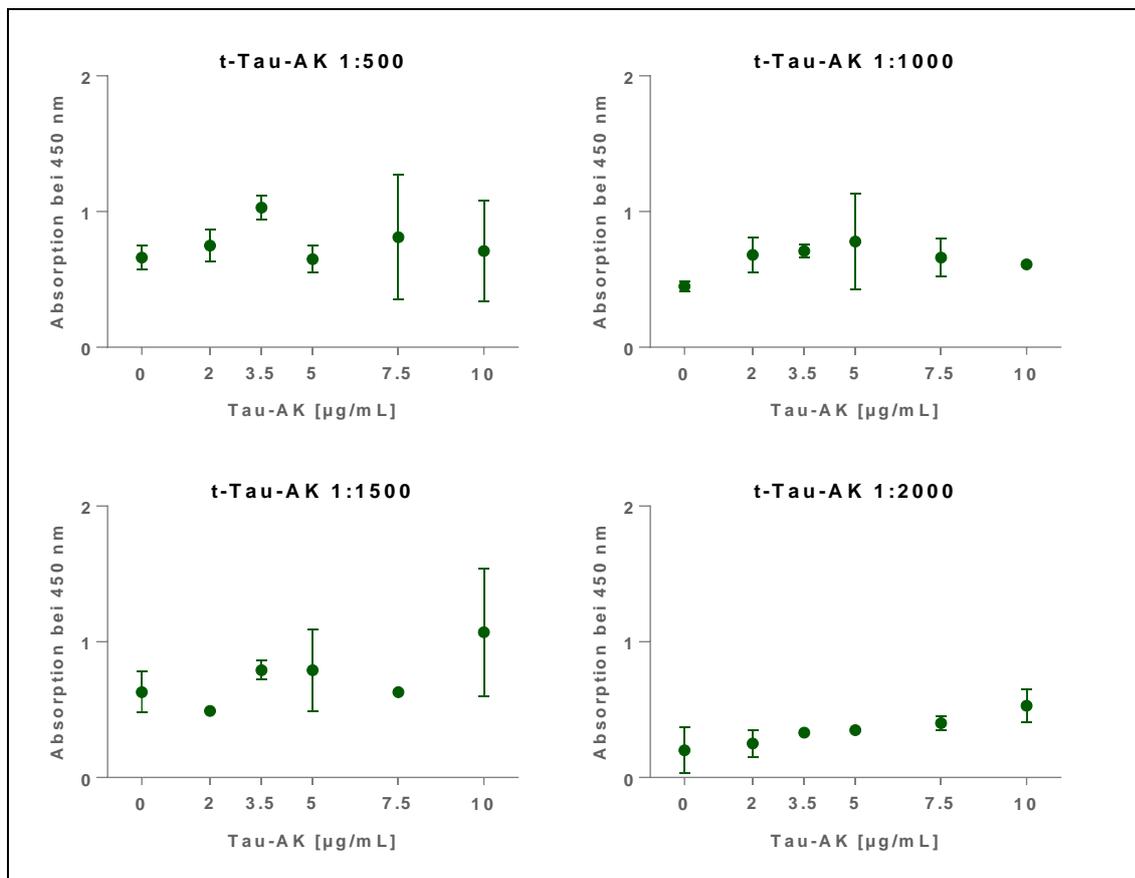
Für den ELISA wurde der Fängerantikörper Tau-AK auf einer MaxiSorp 96-well Mikrotiterplatte adsorbiert. Nachfolgend wurde überprüft, ob die Adsorption als Immobilisierungsstrategie ausreichend reproduzierbar ist und ob die Schüttelrate einen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Immobilisierung hat. Dafür wurde der Tau-AK unabhängig voneinander in drei verschiedenen Ansätzen verdünnt und anschließend bei 0 und 450 rpm üN inkubiert (Abbildung 11). Es zeigt sich weder zwischen den Ansätzen noch zwischen 0 und 450 rpm ein signifikanter Unterschied. Daher wurde für den Sandwich-ELISA das Protokoll zur Adsorption des Tau-AK üN bei 450 rpm beibehalten.



**Abbildung 11 Bindung des Fängerantikörpers an die Platte:** Es wurde überprüft ob die Bindung des Fängerantikörpers Tau-AK an die MaxiSorp-Platte mittels Adsorption reproduzierbar ist. Es konnte weder zwischen den unabhängig voneinander verdünnten Ansätzen 1 bis 3 noch zwischen einer Inkubation üN bei 0 und 450 rpm ein signifikanter Unterschied in der Signalintensität festgestellt werden. n=3 für 450 rpm, n=2 für 0 rpm, Fehlerbalken zeigen die  $\pm$  Standardabweichung.

### 4.3.3 Titration des Fänger- und Detektionsantikörpers

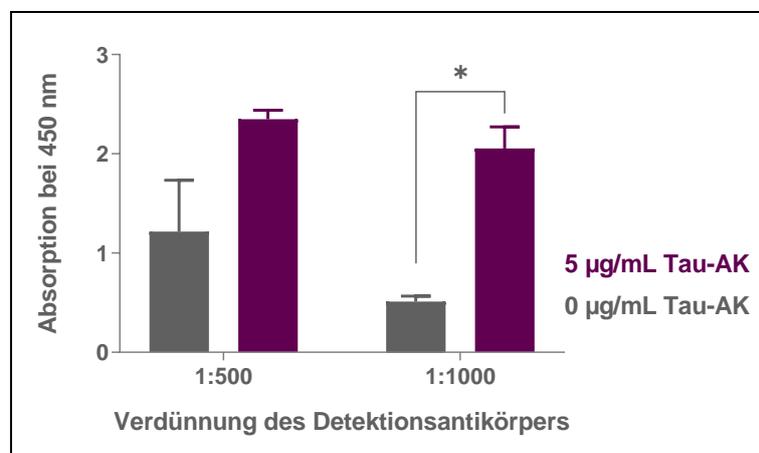
Um die optimale Konzentration des Fängerantikörpers Tau-AK und des Detektionsantikörpers t-Tau-AK zu bestimmen, wurden beide Antikörper titriert. In Abbildung 12 sind die vier getesteten Verdünnungen für den Detektionsantikörper t-Tau-AK jeweils in Abhängigkeit von den Tau-AK-Konzentrationen dargestellt. Die Daten weisen eine sehr hohe Standardabweichung auf, so dass eine Interpretation der Ergebnisse nur schwer möglich ist. Gut erkennbar ist, dass eine Verdünnung des t-Tau-AK von 1:2000 (entspricht einer Konzentration von 9 ng/mL) im Gesamten deutlich geringere Absorptionswerte liefert als die anderen drei Verdünnungen. Das zeigt, dass der t-Tau-AK mit 1:2000 zu stark verdünnt wurde.



**Abbildung 12 Titration des Fänger- und Detektionsantikörpers im ELISA:** Der Detektionsantikörper t-Tau-AK wurde 1:500, 1:1000, 1:1500 und 1:2000 verdünnt und ein ELISA mit 2, 3.5, 5, 7.5 und 10 µg/mL Tau-AK durchgeführt. Aufgrund der hohen Standardabweichungen ist die optimale Konzentration für die beiden Antikörper nicht zu bestimmen. Bei einer Verdünnung des Detektionsantikörpers von 1:2000 [9 ng/mL] sind die Absorptionswerte jedoch insgesamt deutlich geringer als bei den anderen Verdünnungen. n=2, Fehlerbalken zeigen die  $\pm$  Standardabweichung.

#### 4.3.4 Titration des Detektionsantikörpers

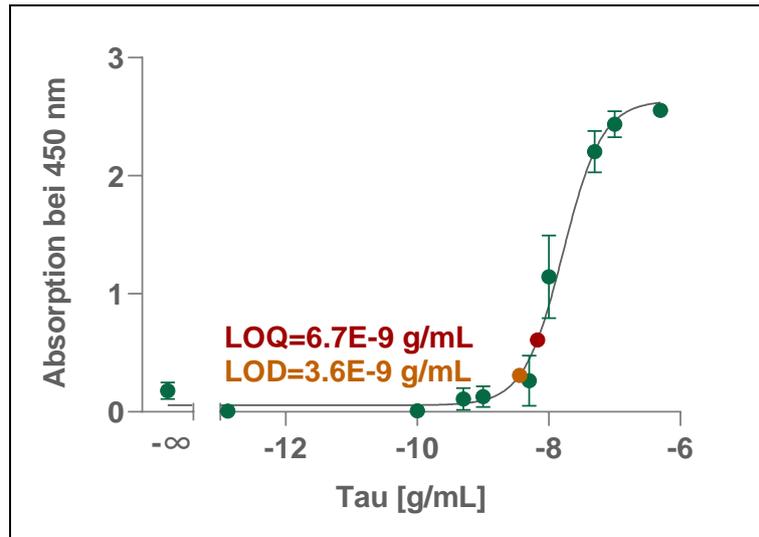
Um die Standardabweichungen zu reduzieren, wurden noch einmal die Verdünnungen 1:500 und 1:1000 des Detektionsantikörpers getestet, diesmal allerdings mit PBST statt PBS als Waschpuffer. Im Diagramm in Abbildung 13 sind die beiden Verdünnungen des t-Tau-AK mit und ohne Fängerantikörper Tau-AK dargestellt. Das Experiment wurde mit 0 µg/mL Tau-AK (lila) und 5 µg/mL Tau-AK (grau) durchgeführt. Weder die Absorption bei 5 µg/mL noch bei 0 µg/mL unterscheidet sich signifikant zwischen den beiden Verdünnungen 1:500 und 1:1000. Allerdings unterscheidet sich nur bei einer Verdünnung von 1:1000 das Hintergrundsignal (0 µg/mL Tau-AK) signifikant ( $p \leq 0.05$ ) von der Positivkontrolle (5 µg/mL Tau-AK). Daher wurde für die nachfolgende Aufnahme einer Kalibrierkurve mit 5 µg/mL Tau-AK und einer Verdünnung des Detektionsantikörpers von 1:1000 gearbeitet.



**Abbildung 13 Titration des Detektionsantikörpers im ELISA:** Der Detektionsantikörper t-Tau-AK wurde in den beiden Verdünnungen 1:500 und 1:1000 gegen eine Konzentration von 0 (lila) und 5 µg/mL Tau-AK (grau) getestet. Weder für 0, noch für 5 µg/mL ist ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Verdünnungen festzustellen. Allerdings unterscheidet sich bei einer Verdünnung des Detektionsantikörpers von 1:1000 das Hintergrundsignal (0 µg/mL Tau-AK) signifikant von der Positivkontrolle (5 µg/mL Tau-AK).  $n=2$ ,  $p \leq 0.05$  für \*, Fehlerbalken zeigen die  $\pm$  Standardabweichung.

#### 4.3.5 Aufnahme einer Kalibrierkurve

Um die Sensitivität des ELISAs zu bestimmen, wurde eine Kalibrierkurve zwischen  $1.3E^{-13}$  g/mL und  $5E^{-7}$  g/mL n-Tau aufgenommen. In Abbildung 14 ist die Absorption bei 450 nm gegen die Konzentration des Analyten n-Tau in logarithmischer Form aufgetragen. Es ist deutlich der für eine Kalibrierkurve charakteristische sigmoidale Kurvenverlauf zu erkennen, bei einer Konzentration von etwa  $1E^{-7}$  g/mL n-Tau beginnt die Absättigung der Kurve. Aus den drei aufgenommenen Kalibrierkurven ergibt sich im Mittel ein LOD von 3.6 ng/mL n-Tau, der LOQ liegt bei 6.7 ng/mL n-Tau.

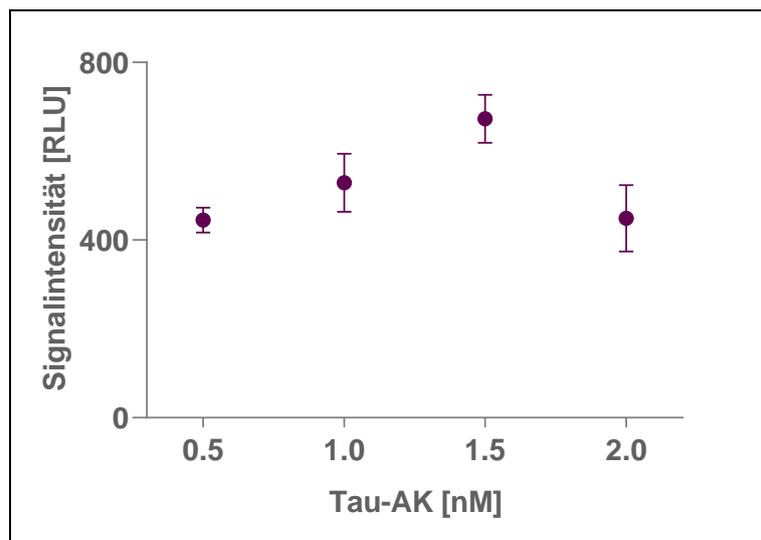


**Abbildung 14 Aufnahme einer Kalibrierkurve für den ELISA:** Es wurde eine Kalibrierkurve im Bereich  $1.3E^{-13}$  bis  $5E^{-7}$  g/mL n-Tau aufgenommen. Für die Konzentration des Analyten wurde eine logarithmische Darstellung gewählt, ein sigmoidaler Kurvenverlauf ist gut zu erkennen. Es ergibt sich ein LOD von 3.6 ng/mL und ein LOQ von 6.7 ng/mL.  $n=3$  für  $0$ ,  $5E^{-8}$  und  $1E^{-7}$  g/mL n-Tau.  $n=2$  für  $1E^{-10}$ ,  $5E^{-10}$ ,  $1E^{-9}$ ,  $5E^{-9}$  und  $1E^{-8}$  g/mL n-Tau.  $n=1$  für  $1.3E^{-13}$ ,  $1.3E^{-12}$ ,  $2.5E^{-12}$ ,  $2.5E^{-10}$  und  $5E^{-7}$  g/mL n-Tau. Fehlerbalken zeigen die  $\pm$  Standardabweichung.

## 4.4 AlphaLISA

### 4.4.1 Titration des Fängerantikörpers

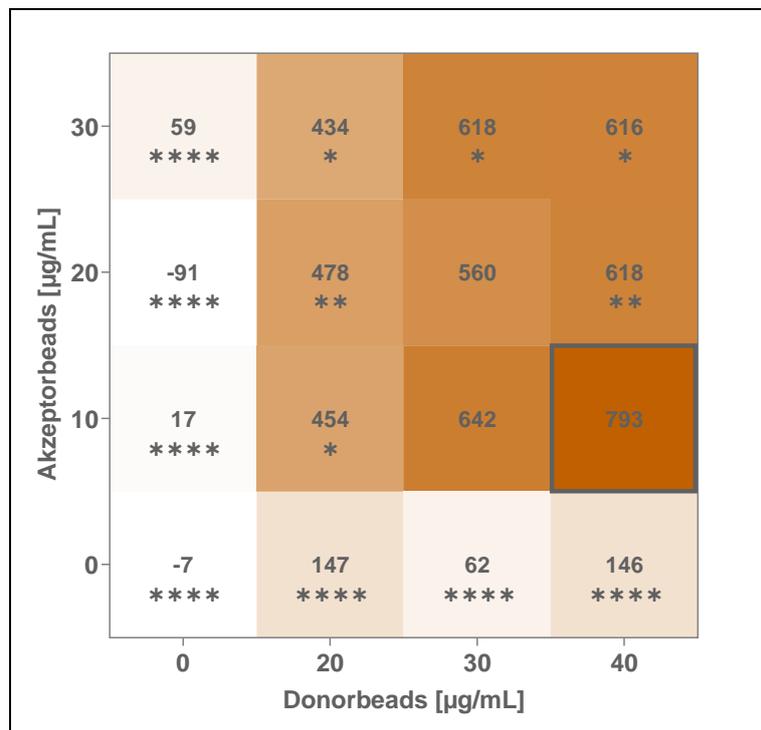
Um die Konzentration des Fängerantikörpers Tau-AK im Assay zu optimieren, wurden Konzentrationen zwischen 0.5 und 2 nM Tau-AK getestet. Das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt. Obwohl die Unterschiede in der Signalintensität nicht signifikant sind, ist ein Trend hinsichtlich einer erhöhten Signalintensität mit geringerer Standardabweichung für 1.5 nM zu erkennen. Deshalb wurde diese Konzentration für alle weiteren Assays verwendet.



**Abbildung 15 Titration des Fängerantikörpers im AlphaLISA:** Der Fängerantikörper Tau-AK wurde im AlphaLISA in den Konzentrationen 0.5, 1, 1.5 und 2 nM getestet, um die optimale Konzentration zu ermitteln. Bei 1.5 nM Tau-AK wurde die höchste Signalintensität erreicht. Die Ergebnisse sind nicht signifikant, jedoch ist ein Trend erkennbar.  $n=2$ , Fehlerbalken zeigen die  $\pm$  Standardabweichung.

#### 4.4.2 Optimierung der Bead-Konzentrationen

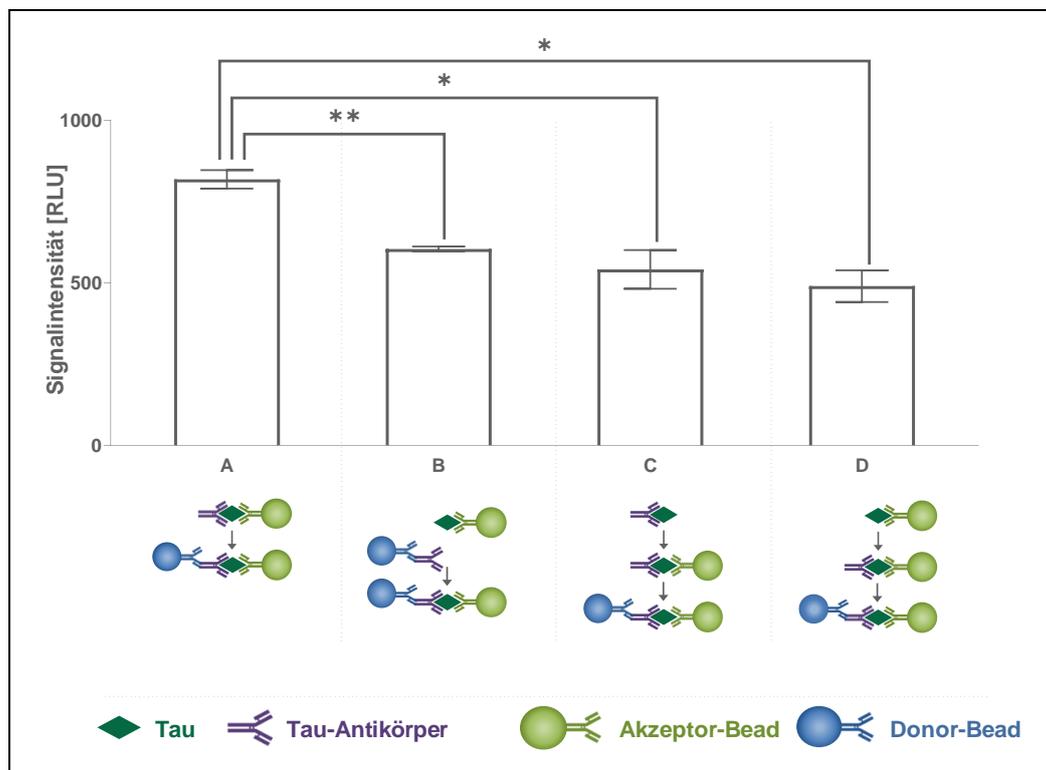
Nachfolgend wurde die Konzentration der Donor- und Akzeptorbeads angepasst, um das optimale Verhältnis im AlphaLISA zu ermitteln. Hierfür wurden die Donorbeads in den Konzentrationen 20, 30 und 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gegen die Akzeptorbeads in den Konzentrationen 10, 20 und 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  getestet. Die Heatmap in Abbildung 16 verdeutlicht, dass bei einer Konzentration von 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Donorbeads und 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Akzeptorbeads die höchste Signalintensität erreicht wird. Das Ergebnis unterscheidet sich nicht signifikant von den Bead-Verhältnissen Akzeptor zu Donor = 20:30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und 10:30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Allerdings ist ein Trend erkennbar, weshalb für alle weiteren Optimierungen ein Verhältnis von 10:40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  für Akzeptor zu Donor beibehalten wurde.



**Abbildung 16 Optimierung der Bead-Konzentrationen im AlphaLISA:** Die beiden Beads wurden gegeneinander mit Konzentrationen von 10, 20 und 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Akzeptorbeads und 20, 30 und 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Donorbeads titriert. Die Werte in der Heatmap zeigen die normalisierten mittleren Signalintensitäten [RLU]. Es ist ein Trend zu erkennen, dass für 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Akzeptorbeads und 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Donorbead das höchste Signal generiert werden kann. Allerdings unterscheidet sich die Signalintensität nicht signifikant von den Bead-Verhältnissen 20:30 und 10:30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .  $n=2$ ,  $p \leq 0.05$  für \*,  $p \leq 0.01$  für \*\*,  $p \leq 0.0001$  für \*\*\*\*.

#### 4.4.3 Reihenfolge der Zugabe aller Komponenten

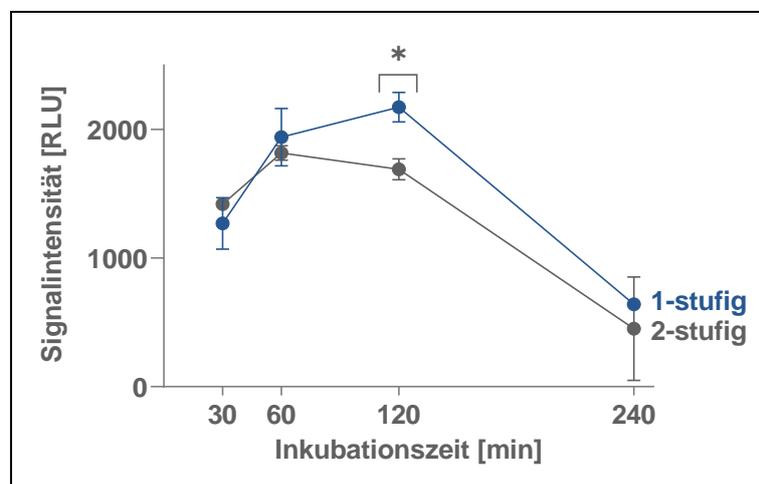
Für den AlphaLISA wurden nach einer Empfehlung des Herstellers Perkin Elmer vier verschiedene Protokolle für die Reihenfolge der Zugabe aller Komponenten zur Reaktion getestet. Das Ergebnis ist in Abbildung 17 dargestellt. Die vier Protokolle wurden mit A bis D bezeichnet, darunter ist die Reihenfolge der Zugabe der Komponenten jeweils schematisch dargestellt. Die beiden Varianten A und B sind zweistufig, daher mit zwei separaten Inkubationsschritten, C und D sind dreistufig. Das genaue Vorgehen für die einzelnen Protokolle ist im Abschnitt 3.5.3 beschrieben. Die Signalintensität bei Variante A ist signifikant erhöht ( $p \leq 0.05$ ), während sich alle anderen Varianten nicht signifikant voneinander unterscheiden. Daher wird für weitere Optimierungen Variante A verwendet.



**Abbildung 17 Protokolle für die Entwicklung des AlphaLISAs:** Es wurden vier verschiedene Protokolle getestet, um die optimale Reihenfolge der Zugabe aller Komponenten zum AlphaLISA zu bestimmen. Für die Variante A wurde zuerst der Analyt n-Tau mit dem Tau-AK und den Akzeptorbeads inkubiert und in einem zweiten Schritt die Donorbeads hinzugegeben. Für Variante B wurden n-Tau und Akzeptorbeads, sowie Tau-AK und Donorbeads zunächst separat und anschließend gemeinsam inkubiert. In den beiden Protokollen C und D erfolgten drei Inkubationsschritte. Für die Variante C wurde erst der Analyt n-Tau mit Tau-AK inkubiert, anschließend die Akzeptorbeads hinzugegeben und in einem dritten Schritt die Donorbeads mit inkubiert. Für die Variante D wurde n-Tau zuerst mit den Akzeptorbeads und dann mit dem Tau-AK inkubiert und als letztes die Donorbeads zugegeben. Variante A zeigt eine signifikant höhere Signalintensität im Vergleich zu allen anderen Protokollen. Die Varianten B bis D unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Signalintensität nicht signifikant voneinander.  $n=2$ ,  $p \leq 0.05$  für \*,  $p \leq 0.01$  für \*\*, Fehlerbalken zeigen die  $\pm$  Standardabweichung.

#### 4.4.4 Optimierung der Inkubationszeit

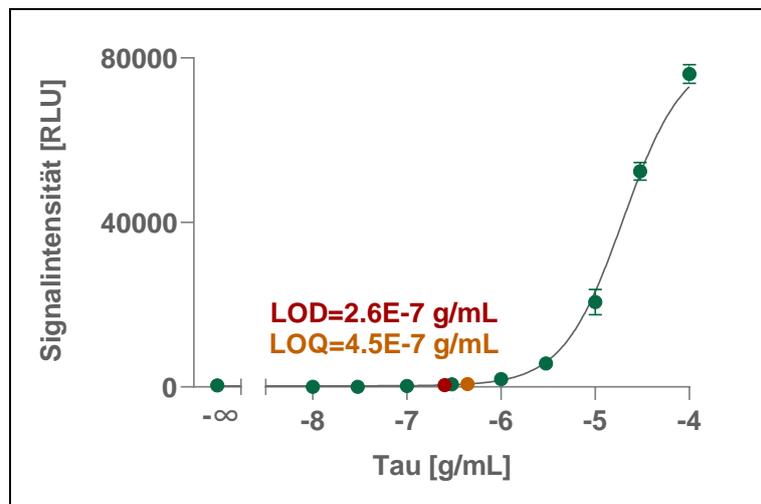
Für eine weitere Optimierung des AlphaLISAs wurde Variante A (zweistufig) aus dem vorhergehenden Versuch mit einem einstufigen Protokoll hinsichtlich der Signalintensität nach vier unterschiedlichen Inkubationszeiten verglichen. Bei der einstufigen Variante wurden alle Komponenten gleichzeitig zum Analyten n-Tau gegeben und der Assay inkubiert. Die Signalintensität wurde für beide Protokolle nach 30, 60, 120 und 240 min Inkubationszeit mit den Donorbeads gemessen (Abbildung 18). In den ersten 60 min zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem einstufigen und dem zweistufigen Protokoll. Nach 120 min ist die Signalintensität bei der einstufigen Variante jedoch signifikant erhöht ( $p \leq 0.05$ ) im Vergleich zur Zweistufigen. Nach 240 min ist für beide Protokolle ein deutlicher Signalabfall zu erkennen. Für die Kalibrierkurve wurde daher die einstufige Variante mit einer Inkubationszeit von 120 min gewählt.



**Abbildung 18 Anpassung der Inkubationszeit im AlphaLISA:** Ein einstufiges und ein zweistufiges Protokoll wurden nach 30, 60, 120 und 240 min Inkubationszeit hinsichtlich der Signalintensität verglichen. Für die einstufige Variante wurden alle Komponenten gleichzeitig inkubiert. Für die zweistufige Variante wurde der Analyt n-Tau zunächst für 1 h mit dem Tau-AK und den Akzeptorbeads inkubiert und anschließend die Donorbeads hinzugegeben. In den ersten 60 min Inkubation mit Donorbeads unterscheidet sich die Signalintensität der beiden Protokolle nicht signifikant voneinander. Nach 120 min Inkubationszeit ist jedoch die Signalintensität für die einstufige Variante signifikant erhöht im Vergleich zur Zweistufigen. Nach 240 min Inkubationszeit ist für beide Protokolle ein starkes Absinken der Signalintensität im Vergleich zum vorherigen Messpunkt zu verzeichnen.  $n=2$ ,  $p \leq 0.05$  für \*, Fehlerbalken zeigen die  $\pm$  Standardabweichung.

#### 4.4.5 Aufnahme einer Kalibrierkurve

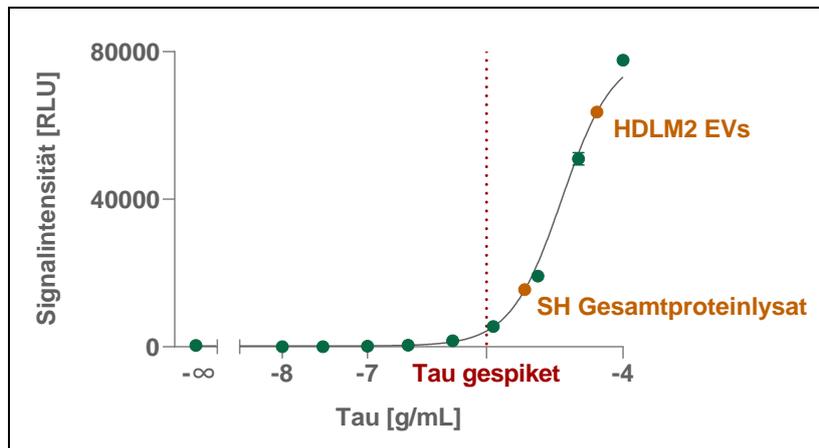
Um die Sensitivität des AlphaLISAs zu bestimmen, wurde eine Kalibrierkurve im Bereich zwischen  $1\text{E}^{-8}$  und  $1\text{E}^{-4}$  g/mL n-Tau aufgenommen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und für jede Kalibrierkurve separat LOD und LOQ bestimmt. Die erste Kalibrierkurve wurde ohne die Analyt-Konzentrationen  $1\text{E}^{-4}$  und  $3\text{E}^{-5}$  g/mL n-Tau aufgenommen. Danach wurde der Assaybereich auf ein oberes Limit von  $1\text{E}^{-4}$  g/mL erweitert, um den Übergang in die Plateauphase abbilden zu können. Die in Abbildung 19 dargestellte Kurve ergibt sich aus dem Mittel aller drei Kalibrierkurven. Hier ist gut zu erkennen, dass die Standardabweichung in allen Messpunkten sehr gering ist. Der AlphaLISA weist im Mittel eine Nachweisgrenze von 260 ng/mL n-Tau und eine Quantifizierungsgrenze von 450 ng/mL n-Tau auf.



**Abbildung 19 Aufnahme einer Kalibrierkurve für den AlphaLISA:** Es wurde im Bereich zwischen  $1\text{E}^{-8}$  und  $1\text{E}^{-4}$  g/mL n-Tau eine Kalibrierkurve aufgenommen. Der LOD liegt bei 260 ng/mL, der LOQ bei 450 ng/mL n-Tau.  $n=3$  ( $n=2$  für  $1\text{E}^{-4}$  und  $3\text{E}^{-5}$  g/mL n-Tau), Fehlerbalken zeigen die  $\pm$  Standardabweichung.

#### 4.4.6 Assay mit biologischen Proben

Um Tau in humanen Zelllinien nachzuweisen, wurden Gesamtproteinlysate und EV-Lysate von SH- und HDLM2-Zellen in einem AlphaLISA getestet. Hierfür wurden die Proben in der ersten Kalibrierkurve mitgeführt. Es konnten keine Tau-Konzentrationen bestimmt werden, da die entsprechenden Signalintensitäten unterhalb des LODs lagen. Deshalb wurden die Proben anschließend für die nächste Kalibrierkurve mit jeweils  $2.5 \cdot 10^{-6}$  g/mL n-Tau gespiket (Abbildung 20). Die Werte für das Gesamtproteinlysate von HDLM2 (87777 RLU) und das EV-Lysate von SH (126095 RLU) lagen weit oberhalb der Kalibrierkurve, so dass keine Tau-Konzentration berechnet werden konnte. Für das Gesamtproteinlysate von SH und das EV-Lysate von HDLM2 (beide in orange) lagen die berechneten Tau-Konzentrationen ebenfalls deutlich höher als die tatsächlich gespikete Konzentration an n-Tau (rot). Für das SH-Gesamtproteinlysate wurde ein Wert von  $8 \cdot 10^{-6}$  g/mL Tau berechnet, das entspricht einer dreifach höheren Tau-Konzentration als tatsächlich gespiket wurde. Für das EV-Lysate von HDLM2 ergibt sich mit einem Wert von  $5 \cdot 10^{-5}$  g/mL sogar eine zwanzigfach erhöhte Konzentration.



**Abbildung 20 Interpolation von Proben anhand der Kalibrierkurve des AlphaLISAs:** Die Gesamtproteinlysate sowie die EV-Lysate von SH und HDLM2 wurden in einer AlphaLISA-Kalibrierkurve mitgeführt. Die Signalintensitäten für das EV-Lysate von SH und das Gesamtproteinlysate von HDLM2 lagen mit 126095 und 87777 RLU außerhalb der Kalibrierkurve. Die Werte für das Gesamtproteinlysate von SH ( $8 \cdot 10^{-6}$  g/mL Tau) und das EV-Lysate von SH ( $5 \cdot 10^{-5}$  g/mL Tau) lagen ebenfalls oberhalb der gespiketen Konzentration von  $2.5 \cdot 10^{-6}$  g/mL n-Tau.  $n=3$ , Fehlerbalken zeigen die  $\pm$  Standardabweichung.

---

## **5 Diskussion**

### **5.1 Viabilität der HDLM2-Zellen**

Eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen wird in der Zellkultur in der Regel über die Zugabe von FBS gewährleistet. Das Serum beinhaltet verschiedene Proteine, Hormone, Nukleinsäuren, Spurenelemente und Mineralstoffe, die meist essenziell für das Wachstum und die Teilung der Zellen sind (Gstraunthaler, 2003). FBS wird aus dem Blut von Kälberföten gewonnen, welches wie alle Körperflüssigkeiten eine erhebliche Anzahl an EVs enthält (Lehrich et al., 2018). Shelke et al. (2014) konnten nachweisen, dass diese EVs das Verhalten von Zellen in Kultur beeinflussen können. Darüber hinaus beeinflussen sie auch quantitative und qualitative Analysen von isolierten Vesikeln (Lehrich et al., 2018). Daher ist es ratsam, vor der Isolation von EVs aus Zellen das Serum im Medium nach Möglichkeit zu reduzieren bzw. darauf zu verzichten. Da FBS wie bereits erwähnt wichtig für das Wachstum der Zellen ist, muss bei einem Verzicht überprüft werden, wie die entsprechende Zelllinie auf den Nährstoffmangel reagiert. Die Zellen müssen ausreichend lange in Medium ohne FBS inkubiert werden, um eine genügend hohe Anzahl an EVs in das Medium zu sekretieren. Allerdings sollte auch keine zu lange Inkubationszeit gewählt werden. Durch den Nährstoffmangel gehen viele Zellen in das Stadium der Apoptose über, wodurch vermehrt die in Abschnitt 1.5.1 beschriebenen apoptotischen Körperchen freigesetzt werden. Diese beeinflussen ebenfalls die Analyse der isolierten Vesikel, da nur von vitalen Zellen ausgeschleustes Tau in Exosomen untersucht werden soll. Deshalb sollte eine Inkubationszeit gewählt werden, bei der noch kein drastisches Absinken der Zellviabilität erkennbar ist. Der für die HDLM2-Zellen durchgeführte Zellviabilitätsassay hat gezeigt, dass es bei den Zellen in Medium ohne Serum nach 48 und 72 h zu einem signifikanten Absinken der Zellviabilität kommt. Um einen Kompromiss zwischen zu kurzer Inkubationszeit (wenig Vesikel) und zu langer Inkubationszeit (apoptotische Körperchen) zu finden, wurden die HDLM2-Zellen vor der Aufkonzentrierung der EVs für 48 h in Medium ohne FBS kultiviert. Da extrazelluläre Vesikel der Zell-Zell-Kommunikation dienen, ist jedoch davon auszugehen, dass diese auch wieder aus dem Medium aufgenommen werden. Deshalb korreliert die Menge an EVs im Medium nicht zwingend mit der Zellviabilität. Um eine genauere Aussage über die Anzahl der EVs im Medium zu verschiedenen Zeitpunkten treffen zu können, empfiehlt sich daher eine Partikelzählung z. B. in einer Nanopartikel-Tracking-Analyse (Akers et al., 2016).

Auffällig am Ergebnis des Zellviabilitätsassays ist, dass die Zellen in Medium ohne FBS in den ersten 48 h eine höhere Zellviabilität aufweisen als die Kontrolle in Medium mit FBS. Es war zu erwarten, dass durch den Nährstoffmangel die Zellviabilität über alle Zeitpunkte niedriger ist. Möglicherweise kann dieses Phänomen auf die in Abschnitt 4.1 beschriebene Agglutination der Zellen in Medium ohne Serum zurückgeführt werden. Die dabei entstandenen Zellaggregate haben eventuell den

Strahlengang des Lasers bei der Messung der Absorption behindert und so zu höheren Messwerten und einer scheinbar erhöhten Zellviabilität geführt.

## 5.2 Expression von Tau in humanen Zelllinien

Insgesamt wurden sieben verschiedene Zelllinien hinsichtlich ihrer Expression des Tau-Proteins untersucht. Eine Recherche im humanen Proteinatlas (The human protein atlas, o. J.) ergab, dass die RNA-Transkription des MAPT-Gens in den Zelllinien HDLM2, HEK293, PC3 und SH erhöht ist. Eine hohe RNA-Transkription lässt eine ebenfalls hohe Protein-Expression vermuten. Die Zelllinien LnCaP, PNT1A und 22Rv1 wurden im humanen Proteinatlas nicht untersucht. Die höchste Expression aller 63 im humanen Proteinatlas untersuchten Zelllinien zeigen die HDLM2-Zellen. Die Ergebnisse der Western Blots konnten bestätigen, dass Tau in SH- und HDLM2-Zellen exprimiert wird. Für die anderen Zelllinien war die Konzentration an Tau in den Gesamtproteinlysaten möglicherweise zu gering für einen Nachweis mittels Western Blot, gegebenenfalls wurde auch kein Tau-Protein exprimiert.

Die Zelllinie SH wurde ursprünglich aus dem Knochenmark eines vierjährigen Mädchens mit einem Neuroblastom isoliert, es handelt sich demzufolge um entartetes Nervengewebe. Uberti et al. (1997) konnten nachweisen, dass Tau von SH-Zellen exprimiert wird. Das Ergebnis seiner Studie stimmt gut mit den eigenen Beobachtungen überein. Katsinelos et al. (2018) konnten belegen, dass Tau zudem auch im Zellkulturüberstand von SH-Zellen detektiert werden kann. Dabei handelte es sich nur zu rund 7 % um Tau in EVs, 93 % waren freies Tau. Die Sekretion ins Medium wurde besonders durch die Hyperphosphorylierung des Proteins begünstigt. Daher ist es essenziell, in weiteren Versuchen sowohl den Zellkulturüberstand als auch die aufkonzentrierten EVs der SH-Zellen auf Tau zu untersuchen. Zudem begründet die Studie von Katsinelos et al. (2018) die Notwendigkeit, auch den Überstand von HDLM2-Zellen auf Tau zu untersuchen. Hier konnte allerdings kein Tau detektiert werden. Das spricht dafür, dass in HDLM2-Zellen freies Tau-Protein nur in geringen Mengen oder gar nicht in den extrazellulären Raum ausgeschleust wird. Die Banden in den Spuren für das EV-Lysat und die Gesamtproteinlysate sind hingegen klar zu erkennen. Durch den Einschluss von Tau in den extrazellulären Vesikeln ist das Protein während der Aufkonzentrierung gut geschützt und kann so seine native Form behalten. Erst durch Zugabe des Laemmli-Puffers während der SDS-PAGE werden die EVs aufgeschlossen und Tau kann detektiert werden.

Bei einem Vergleich der Ergebnisse beider Western Blots fällt auf, dass das Tau-Protein auf unterschiedlicher Höhe lokalisiert wurde. Grund hierfür kann eine abweichende posttranslationale Modifikation des Tau-Proteins in den beiden Zelllinien sein (Li und Götz, 2017). Zudem können die Unterschiede in der Höhe der Banden auch auf eine geringfügig unterschiedliche Polymerisation des Gels, die Verwendung unterschiedlicher Marker oder Ungenauigkeiten bei der Auswertung durch die

Unschärfe der Banden zurückzuführen sein. Generell liegen die Banden mit 68 bzw. 78 kDa höher als es anhand des Molekulargewichts von Tau zwischen 37 und 46 kDa der Fall sein sollte. Laut Guo et al. (2017) ist dieses Phänomen auf eine reduzierte Mobilität der Isoformen in einer SDS-PAGE zurückzuführen, so dass das scheinbare Molekulargewicht im Gel nicht dem wirklichen Molekulargewicht des Proteins entspricht.

In weiteren Western Blot Analysen sollten beide Zelllinien hinsichtlich ihrer Tau-Abundanz verglichen werden. Hierfür können sowohl EV-Lysate in einem vergleichbaren Konzentrationsfaktor, als auch Gesamtproteinlysate mit gleichen Proteinmengen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot analysiert werden. Um eine relative Quantifizierung der Tau-Konzentrationen zu ermöglichen, kann zusätzlich das rekombinante Protein n-Tau in unterschiedlichen Mengen aufgetragen werden.

### 5.3 ELISA

Für den ELISA zur Detektion von n-Tau wurde zunächst ein geeigneter Fängerantikörper identifiziert. In einem Sandwich-ELISA sollte der Fängerantikörper eine hohe Affinität zum Analyten aufweisen, nicht an das gleiche Epitop wie der Detektionsantikörper binden und die Konfirmation des Analyten nicht derartig verändern, dass der Detektionsantikörper nicht mehr binden kann (Wild, 2013). Um die Eignung der möglichen Fängerantikörper Tau-AK und Tau46-AK zu überprüfen, wurden beide in einem ELISA mit t-Tau-AK als Detektionsantikörper eingesetzt. Erwartungsgemäß zeigte der Tau-AK eine deutlich höhere Sensitivität als der Tau46-AK, dieses Ergebnis ist auf die Bindungsstellen der Antikörper an den Analyten n-Tau zurückzuführen. Der Tau-AK bindet laut Herstellerangaben an das N-terminale Ende des Proteins, der t-Tau-AK an eine Region um Asp430 des Tau-Proteins. Da Tau in seiner nativen Form fast ausschließlich ungefaltet vorliegt und nur wenige Sekundärstrukturen ausbildet, ist es unwahrscheinlich, dass es hier zu einer sterischen Behinderung kommt (Guo et al., 2017). Die genaue Bindungsstelle des Tau46-AK ist nicht bekannt, laut Herstellerangaben ist sie jedoch am C-terminalen Ende des Tau-Proteins lokalisiert. In der Datenbank UniProt ist ersichtlich, dass sich nur für die Isoform 2N4R (UniProt-Nummer P10636) eine Asparaginsäure an der Stelle 430 befindet (UniProtKB, 2019). Da diese Isoform nur 441 Aminosäuren lang ist, sind die Bindungsstellen von Tau46-AK und t-Tau-AK sehr dicht aneinander. Daher kam es hier im Sandwich-ELISA vermutlich zu sterischen Behinderungen und damit zur Konkurrenz um die Bindung an den Analyten. Für weitere Versuche wurde deshalb der Tau-AK als Fängerantikörper gewählt und mittels Adsorption auf der Maxisorp-Platte immobilisiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Immobilisierung reproduzierbar und somit gut geeignet für den Sandwich-ELISA ist, dennoch sollten auch andere Immobilisierungsstrategien getestet werden. Schon Butler et al. (1992) konnten zeigen,

dass bei der Adsorption von Antikörpern an eine Polystyrol-Platte der überwiegende Teil der Bindungsstellen nicht mehr zugänglich ist. Dadurch kann die Sensitivität des ELISAs verringert werden. Alternative Immobilisierungsstrategien sind zum Beispiel eine Immobilisierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) oder Carboxymethyldextran (CMD). Bei der Immobilisierung mit APTES wird eine mit Sauerstoff-Plasma aktivierte Oberfläche mit APTES silanisiert (Dixit et al., 2011). An die Aminogruppe eines APTES-Moleküls kann dann jeweils genau ein Antikörper binden. Vorteil der Methode ist die korrekte Ausrichtung der Antikörper, so dass anschließend alle Bindungsstellen zugänglich sind. Allerdings ist die Anzahl der gebundenen Antikörper abhängig von der Anzahl der silanierten APTES-Moleküle und damit sehr begrenzt (Vashist, 2012). Um diese Limitierung zu umgehen, kann an die silanierte Oberfläche zusätzlich CMD gebunden werden. Diese langkettigen Moleküle sorgen für eine enorme Oberflächenvergrößerung und erhöhen so die Bindungskapazität. Außerdem hat CMD einen vergleichbaren Effekt zu BSA und blockt die Oberfläche ab, so dass ein separater Blockierungsschritt im Anschluss nicht notwendig ist (Liberelle et al., 2013). Beide Methoden sind allerdings deutlich aufwändiger und kostenintensiver als eine Immobilisierung durch Adsorption, so dass Kosten und Nutzen gründlich gegeneinander abgewogen werden sollten.

Um die Antikörper-Konzentrationen im ELISA zu optimieren, wurden Fänger- und Detektionsantikörper gegeneinander titriert. In der ersten Antikörper-Titration waren die Standardabweichungen zu hoch, um eine statistische Aussage treffen zu können. Eine mögliche Fehlerquelle ist die Verwendung von PBS als Waschpuffer, wodurch unspezifische Bindungen nicht gut genug gelöst werden konnten. Hierfür ist PBST besser geeignet, da Tween-20 helfen kann, unspezifische Bindungen zu lösen (Gibbs et al., 2017). Der Versuch wurde daraufhin in einem kleineren Maßstab und mit PBST als Waschpuffer wiederholt. Die Standardabweichungen konnten erwartungsgemäß reduziert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass bei einer Verdünnung des Detektionsantikörpers t-Tau-AK von 1:500 ein hohes Hintergrundsignal generiert wird. Trotz des viermaligen Waschens konnten offensichtlich nicht alle ungebundenen t-Tau-AK entfernt werden. Bei einer Verdünnung von 1:1000 war der Unterschied in den Signalintensitäten zwischen 0 und 5 µg/mL des Fängerantikörpers Tau-AK hingegen signifikant. Daher wurde für die Aufnahme der Kalibrierkurve eine Verdünnung von 1:1000 gewählt.

Der ELISA für den Nachweis von n-Tau weist ein unteres Quantifizierungslimit von 6.7 ng/mL auf. Kommerziell erhältliche Kits sind mit einem LOQ von 25 pg/mL (Analytic Jena und Creative Diagnostics) bzw. 31 pg/mL (ThermoFisher und Abcam) etwa um ein 200-faches sensitiver. Daher ist es wichtig, den ELISA weiter zu optimieren. Hierfür sollten zunächst die Inkubationszeiten der einzelnen Schritte angepasst werden, auch der Blockierungspuffer kann optimiert werden. Hier wurde eine Konzentration von 5 % (w/v) Albumin verwendet, geringere Konzentrationen ab 1 % können ebenfalls

getestet werden. Auch andere Blockierungspuffers wie Milchpulver, Fisch-Gelatine oder Serum können in einem ELISA verwendet werden (Walker, 1994). Milchpulver in Konzentrationen zwischen 0.1 und 3 % kommt für viele Assays zum Einsatz. Forscher um Nobuhara et al. (2017) entwickelten einen sehr sensitiven Sandwich-ELISA zur Detektion von Tau mit Milchpulver und 0.02 % Tween-20 als Blockierungspuffer. Fisch-Gelatine weist keine Kreuzreaktionen zu Säuger-Antikörpern auf, führt jedoch häufig zu einem erhöhten Hintergrund und einem geringeren Signal. Serum ist ebenfalls ein sehr diverser Blockierungspuffer, es kann jedoch zu Kreuzreaktionen mit anti-IgG-Antikörpern kommen (G-Biosciences, 2017).

Insgesamt gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten, um die Sensitivität des ELISAs auf n-Tau weiter zu erhöhen.

#### **5.4 AlphaLISA**

Für den AlphaLISA wurden eine Reihe an Optimierungsschritten durchgeführt, um die Sensitivität zu steigern. Dabei wurde sich an einem Leitfaden vom Hersteller Perkin Elmer orientiert. Typischerweise liegt die optimale Antikörper-Konzentration zwischen 1 und 3 nM, der AlphaLISA für den Nachweis von n-Tau lag mit 1.5 nM Tau-AK im erwarteten Konzentrationsbereich. Auch die Bead-Konzentrationen lagen im empfohlenen Bereich zwischen 10 und 40 µg/mL.

Perkin Elmer rät zu Inkubationszeiten zwischen 30 min und 2 h, abhängig von der Kinetik der Bindung. In Versuch 4.4.4 wurde deutlich, dass eine längere Inkubationszeit nicht zu einer weiteren Verbesserung des Signals führte. Hier wurden ein einstufiges und ein zweistufiges Protokoll hinsichtlich der Inkubationszeit optimiert. Für beide Varianten ist ein starker Abfall der Signalintensität zwischen 120 und 240 min Inkubationszeit mit den Donorbeads zu verzeichnen. Für die zweistufige Variante erfolgte bereits im Vorfeld ein einstündiger Inkubationsschritt ohne die Donorbeads, dennoch ist der Signalabfall zur gleichen Zeit zu beobachten wie beim einstufigen Protokoll. Daher scheint der Zeitpunkt der Donorbead-Zugabe entscheidend für die optimale Dauer der Inkubation zu sein.

Die einstufige Variante lieferte ab einer Inkubationszeit mit Donorbeads von 60 min höhere Signalwerte als die Zweistufige. Möglicherweise kommt es während der einstündigen Inkubation von Tau, Tau-AK und Akzeptorbeads in der zweistufigen Variante nach einiger Zeit zu einer Schädigung der Beads oder zur Dissoziation der Bindungspartner. Durch die direkte Zugabe aller Komponenten und eine im Gesamten kürzere Inkubationszeit kann dies verhindert werden.

Alle Messungen für den AlphaLISA wurden mit dem Mikroplattenleser Tecan M1000 im AlphaScreen-Modus vorgenommen. Der AlphaScreen-Modus durchläuft einen Scan mit einer Anregung bei 680 nm und einer Messung der Emission zwischen 520 und 620 nm. Dieser Scan ist nicht für die Verwendung von Terbium-Beads konzipiert, stattdessen sollten die Messungen im

Mikroplattenleser EnVision von Perkin Elmer erfolgen. Die Terbium-Beads liegen mit einer Wellenlänge von 545 nm jedoch genau im Messbereich des AlphaScreen-Modus, zudem erfolgt die Anregung der Donorbeads hier ebenfalls bei 680 nm. Um die Eignung für einen AlphaLISA mit Terbium-Beads zu überprüfen, wurde das Experiment 3.5.1 zur Kontrolle in einem anderen Forschungsinstitut mit einem Mikroplattenleser EnVision wiederholt. Dieser Mikroplattenleser kann die Messung der spezifischen Emissionswellenlänge von Terbium bei 545 nm mit der Anregung bei 680 nm kombinieren. Das Experiment lieferte vergleichbare Ergebnisse [Daten nicht gezeigt]. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Messung im AlphaScreen-Modus mit dem Mikroplattenleser Tecan M1000 zuverlässige Ergebnisse generiert.

Die Kalibrierkurve für n-Tau erreichte einen LOD von 260 ng/mL und einen LOQ von 450 ng/mL. Damit ist der Assay bei weitem nicht sensitiv genug für den Nachweis von Tau in Blut. Fiandaca et al. (2015) konnten nach der Isolation von EVs aus Blutproben Tau-Konzentrationen von 191 pg/mL in Alzheimerpatienten und 130 pg/mL in gesunden Probanden nachweisen. Ein kommerzielles AlphaLISA Kit von Perkin Elmer erreicht mit einem LOD von 14.3 pg/mL Tau diesen Konzentrationsbereich. Eine mögliche Ursache für die verminderte Sensitivität des hier entwickelten AlphaLISAs ist eine unzureichende Konjugation des t-Tau-AK an die Akzeptorbeads. Im originalen Protokoll zur Bead-Konjugation von Perkin Elmer wurde eine Schüttelrate von 10 rpm bei einer Temperatur von 37 °C empfohlen. Da kein entsprechendes Gerät zur Verfügung stand, wurde eine Schüttelrate von 200 rpm bei 37 °C gewählt. Möglicherweise führte diese Abänderung des Protokolls zu einer verminderten Bindung des Antikörpers an die Beads. Auch die Akzeptorbeads an sich können ursächlich für die verminderte Sensitivität des Assay sein. Die verwendeten Terbium-Beads weisen laut Perkin Elmer typischerweise eine um 12 bis 20 % verringerte Signalintensität im Vergleich zu standardmäßig verwendeten Europium-Beads auf. Da in späteren Versuchen ein zeitgleicher Nachweis von t-Tau und p-Tau in einem sogenannten AlphaPlex erfolgen soll, werden zwei verschiedene Akzeptorbeads mit unterschiedlicher Emissionswellenlänge benötigt, um die Signale getrennt auswerten zu können. Nach Fiandaca et al. (2015) liegt die Konzentration an p-Tau in EVs allerdings bei 106 pg/mL im Blut von Alzheimerpatienten und bei nur 17 pg/mL im Blut gesunder Probanden. Deshalb sollte der Assay für die Detektion von p-Tau noch empfindlicher sein als der AlphaLISA für den Nachweis von t-Tau und demzufolge hier die sensitiveren Europium-Beads verwendet werden.

Für den hier vorliegenden Assay wurden bereits sehr viele Optimierungen vorgenommen, die jedoch keine deutlichen Verbesserungen im Hinblick auf LOD und LOQ brachten, weshalb weitere Optimierungsschritte benötigt werden. Armstrong et al. (2018) erhöhten die Sensitivität in einem AlphaLISA, indem die Konzentration aller Komponenten in einem konstanten Assayvolumen verdoppelt bzw. verdreifacht wurden. Um nicht auch die Kosten im gleichen Maß zu erhöhen, kann

untersucht werden, wie sich die Reduktion des Assayvolumens bei gleichbleibender Menge an eingesetztem Material auf die Sensitivität des AlphaLISAs auswirkt. Auch eine höhere Temperatur während der Inkubation kann die Sensitivität des Assay erhöhen (Bin et al., 2011). Mechaly et al. (2013) konnten zudem beobachten, dass die Verwendung einer zusätzlichen Interaktion einen nachteiligen Effekt auf die Performance des Assays hatte. Eine solche zusätzliche Interaktion ist hier die Verwendung des Tau-AK als Fängerantikörper und eine anschließende Bindung des Tau-AK an die Donorbeads mittels anti-Maus-Antikörpern. Um dies zu vermeiden, empfiehlt sich die Entwicklung eines direkten Assayformats. Hierfür könnte der Tau-AK über eine Biotinylierung direkt an einen streptavidinierten Donorbead gebunden werden.

Sollten die hier vorgeschlagenen Optimierungen die Sensitivität des AlphaLISAs nicht auf das erforderliche Maß erhöhen können, empfiehlt sich ein Screening verschiedener anti-Tau-Antikörper. Das optimale Antikörperpaar kann dadurch ermittelt und der Assay neu optimiert werden (Liu et al., 2013).

Dass Tau in den Gesamtprotein- und EV-Lysaten der Zelllinien HDLM2 und SH nicht detektiert werden konnte, ist ebenfalls auf die geringe Sensitivität zurückzuführen. Die Proben wiesen eine Konzentration von etwa 1000 µg/mL auf. Es ist davon auszugehen, dass nur ein sehr geringer Anteil davon Tau-Protein ist, so dass die Nachweisgrenze des Assay mit einem LOD bei etwa 260 ng/mL oberhalb dieser Konzentration liegt. Gleiches gilt auch für die EV-Lysate, wobei hier die Konzentration an Tau vermutlich noch einmal geringer ist. Bei den gespikten Proben hingegen lagen alle Messwerte deutlich über der gespikten Tau-Konzentration von  $2.5 \cdot 10^{-6}$  g/mL. Alle vier Werte unterscheiden sich zudem erheblich untereinander, obwohl die Standardabweichung innerhalb der Replikate sehr niedrig ist. Das deutet darauf hin, dass verschiedene Bestandteile des Zellkultur-Mediums oder andere Proteine einen starken Einfluss auf das Ergebnis des Assays hatten. Andere Forschungsgruppen konnten zeigen, dass Matrix-Effekte in Kaninchen-Serum (Mechaly et al., 2013) und humanem Serum (Liu et al., 2013) im AlphaLISA zu vernachlässigen waren. Bin et al. (2011) empfehlen eine Verdünnung der Proben um möglicherweise auftretende Matrix-Effekte abzuschwächen. Da im hier entwickelten AlphaLISA bereits eine zu niedrige Konzentration des Analyten vorliegt, sollte dieser Empfehlung nicht gefolgt werden. Der Assay für die Detektion von Tau in biologischen Proben wurde nur einmal durchgeführt. Deshalb sollte überprüft werden, ob die starken Schwankungen der Signalintensität bei einer Wiederholung des Versuchs erneut auftreten, möglicherweise kommt es zu Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen aus dem Lysat. Da der finale Assay in humanen Blutproben angewendet wird, sollte der Fokus für die Beseitigung der Matrix-Effekte jedoch bei Blutplasma bzw. Serum liegen.

Obwohl der AlphaLISA momentan eine geringere Sensitivität als der ELISA aufweist, bietet er den Vorteil, dass er ohne Sensitivitätsverluste einfach zu miniaturisieren ist (Beaudet et al., 2008) und die

Assayzeit im Vergleich zum ELISA deutlich verkürzt werden kann. Zudem kann durch die Entwicklung des oben bereits erwähnten AlphaPlex der parallele Nachweis von t-Tau und p-Tau in einer Probe realisiert werden. Dadurch kann die Sensitivität und Selektivität in Bezug auf die Alzheimer-Frühdagnostik deutlich verbessert werden (Fiandaca et al., 2015). Vorherige Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten außerdem zeigen, dass die benötigten Beads durch Lyophilisierung vorgelagert werden können und über mehrere Wochen stabil bleiben. In Kombination mit dem hier etablierten einstufigen Protokoll ermöglicht der Assay daher eine schnelle und leicht in den Laboralltag zu integrierende Detektion von Tau-Proteinen in Blutproben.

## **6 Zusammenfassung und Ausblick**

Das Tau-Protein ist ein vielversprechender Biomarker für die Frühdiagnose von Morbus Alzheimer in Blutproben. Problematisch ist allerdings die geringe Konzentration des freien Biomarkers im Blut, sowie die variable Probenmatrix. Um diese Schwierigkeiten zu vermeiden, bietet sich der Nachweis in extrazellulären Vesikeln (EVs) an, da aus Nervenzellen stammende EVs spezifisch isoliert und anschließend analysiert werden können.

Um ein geeignetes *in-vitro* Modell für die Detektion des Tau-Proteins in EVs zu identifizieren, wurden sieben humane Zelllinien in einem Western Blot untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass HDLM2-Zellen Tau in EVs sekretieren. Auch SH-Zellen exprimieren Tau, die Sekretion in EVs muss in weiterführenden Versuchen jedoch noch überprüft werden. Anschließend sollten beide Zelllinien im Hinblick auf ihre Tau-Abundanz verglichen werden, um das besser geeignete *in-vitro* Modell wählen zu können. Die anderen fünf Zelllinien zeigten keine Tau-Expression.

Für den Nachweis von Tau wurde zunächst ein ELISA als "Goldstandard"-Methode etabliert. Anschließend wurde das Testsystem auf einen AlphaLISA übertragen und dieser in verschiedenen Schritten optimiert. Der ELISA konnte mit einem LOD von 3.6 ng/mL und einem LOQ von 6.7 ng/mL n-Tau deutlich sensitiver detektieren als der AlphaLISA mit einem LOD von 260 ng/mL und einem LOQ von 450 ng/mL. Beide Assays wiesen jedoch nicht die erforderliche Sensitivität auf, um Tau in aus Blutproben isolierten EVs nachzuweisen und müssen dahingehend weiter optimiert werden. Dabei sollte der Fokus auf der Optimierung des AlphaLISAs liegen, da dieser schneller und einfacher durchzuführen ist und keine Waschschriffe benötigt. Zudem kann durch die parallele Quantifizierung von nativem und phosphoryliertem Tau in einem "AlphaPlex"-Assay eine höhere Sensitivität und Spezifität des Tests in Bezug auf die Alzheimer-Frühdiagnostik erreicht werden. Nach der erfolgreichen Optimierung des AlphaLISAs für die Detektion von Tau sollte daher der Nachweis von p-Tau implementiert werden. Da sich das einstufige Protokoll als die beste Variante erwiesen hat, konnte die Assayzeit noch weiter verkürzt und die Durchführung vereinfacht werden. Im Vergleich zu anderen kommerziell erhältlichen Tests ist dieser Assay daher leichter in die bestehende Laborroutine zu integrieren. Um die Handhabbarkeit im klinischen Alltag zu steigern, können die benötigten Beads und Antikörper zusätzlich durch Lyophilisierung vorgelagert werden, so dass für den Nachweis von Tau nur die zuvor aufgereinigten EVs zugegeben werden müssen.

Das geplante Assayformat bietet die Möglichkeit eines preiswerten, schnellen und leicht in den klinischen Alltag integrierbaren Testsystems für die Frühdiagnose von Morbus Alzheimer.

## **7 Summary and outlook**

Tau protein is a promising biomarker for the early diagnosis of Alzheimer's disease in blood samples. However, the low concentration of the free biomarker in blood and the variable sample matrix are problematic. In order to avoid these difficulties, detection in extracellular vesicles (EVs) is a good option, as EVs originating from neuronal cells can be specifically isolated and subsequently analyzed. To identify a suitable *in vitro* model for the detection of Tau in EVs, seven human cell lines were investigated in a Western blot. It was shown that HDLM2 cells secrete the protein Tau in EVs. SH cells also express Tau, but the secretion in EVs still needs to be investigated in further experiments. Next, both cell lines should be compared with regard to their Tau abundance in order to select the more suitable *in vitro* model. The other five cell lines didn't show any Tau expression.

For the detection of Tau, an ELISA was initially established as the "gold standard" method. Then the test system was transferred to an AlphaLISA, where several parameters were optimized. The ELISA with a LOD of 3.6 ng/mL and a LOQ of 6.7 ng/mL was able to detect Tau much more sensitively than the AlphaLISA with a LOD of 260 ng/mL and a LOQ of 450 ng/mL. However, both assays did not have the sensitivity required to detect Tau in EVs isolated from blood samples and need to be further optimized. In the future, the focus should be on optimizing the AlphaLISA, as it is faster and easier to perform and does not require any washing steps. In addition, the parallel quantification of native and phosphorylated tau in an "AlphaPlex" assay can achieve a higher sensitivity and specificity in relation to early diagnosis of Alzheimer's disease. After successful optimization of the AlphaLISA for the detection of tau, the detection of p-tau should therefore be implemented. Since the one-step protocol has proven to be the best option, the assay time has been reduced even further and the execution was simplified. Compared to other commercially available tests, this assay is therefore easier to integrate into the existing laboratory routine. In order to increase the manageability in clinical routine, the required beads and antibodies can additionally be pre-prepared by lyophilization, so that only the previously purified EVs need to be added for the detection of Tau. The established assay format then offers the possibility of an inexpensive, fast and easily integrated test system for the early diagnosis of Alzheimer's disease.

---

## **Literaturverzeichnis**

### **Bücher**

Corley R. B. (2004): *A Guide to Methods in the Biomedical Sciences*. 1. Auflage: Springer US.

Wild D. (2013): *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*. 4. Auflage: Elsevier Science.

### **Zeitschriftenartikel**

Akers J. C., Ramakrishnan V., Nolan J. P., et al. (2016): *Comparative Analysis of Technologies for Quantifying Extracellular Vesicles (EVs) in Clinical Cerebrospinal Fluids (CSF)*. PLoS one, 11 (2), S. 1-11.

Alzheimer's Association (2016): *2016 Alzheimer's disease facts and figures*. Alzheimer's & dementia, 12 (4), S. 459–509.

Armstrong C. M., Ruth L. E., Capobianco J. A., et al. (2018): *Detection of Shiga Toxin 2 Produced by Escherichia coli in Foods Using a Novel AlphaLISA*. Toxins, 10 (11).

Bathgate D., Snowden J. S., Varma A., Blackshaw A., Neary D. (2001): *Behaviour in frontotemporal dementia, Alzheimer's disease and vascular dementia*. Acta neurologica Scandinavica, 103 (6), S. 367–378.

Beaudet L., Rodriguez-Suarez R., Venne M.-H., et al. (2008): *AlphaLISA immunoassays: the no-wash alternative to ELISAs for research and drug discovery*. Nature Methods, 5 (12).

Besson F. L., La Joie R., Doeuvre L., et al. (2015): *Cognitive and Brain Profiles Associated with Current Neuroimaging Biomarkers of Preclinical Alzheimer's Disease*. The Journal of Neuroscience, 35 (29), S. 10402–10411.

Biedler J. L., Roffler-Tarlov S., Schachner M., Freedman L. S. (1978): *Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones*. Cancer Research, 38, S. 3751–3757.

Bin Z., Ke W., Jian J., et al. (2011): *Quantitative Determination of Deoxynivalenol (DON) Using the Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay (AlphaLISA)*. Food Analytical Methods, 4 (2), S. 228–232.

Butler J. E., Ni L., Nessler R., et al. (1992): *The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene*. Journal of Immunological Methods, 150, S. 77–90.

Chivet M., Hemming F., Pernet-Gallay K., Fraboulet S., Sadoul R. (2012): *Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system*. Frontiers in physiology, 3, S. 145.

Cummings J. L., Morstorf T., Zhong K. (2014): *Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures*. Alzheimer's research & therapy, 6 (37).

Cussenot O., Berthon P., Berger R., et al. (1991): *Immortalization of Human Adult Normal Prostatic Epithelial Cells by Liposomes Containing Large T-SV40 Gene*. Journal of Urology, 146 (3), S. 881–886.

Dixit C. K., Vashist S. K., MacCraith B. D., O'Kennedy R. (2011): *Multisubstrate-compatible ELISA procedures for rapid and high-sensitivity immunoassays*. Nature protocols, 6 (4), S. 439–445.

- Fiandaca M. S., Kapogiannis D., Mapstone M., et al. (2015): *Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study*. *Alzheimer's & dementia*, 11 (6), S. 600-607.
- Finder V. H., Glockshuber R. (2007): *Amyloid-beta aggregation*. *Neuro-degenerative diseases*, 4 (1), S. 13–27.
- Gendreau K. L., Hall G. F. (2013): *Tangles, Toxicity, and Tau Secretion in AD - New Approaches to a Vexing Problem*. *Frontiers in neurology*, 4, S. 160.
- Gibbs J., Vessels M., Rothenberg M. (2017): *Effective Blocking Procedures in ELISA Assays*. Corning.
- Gornali A. G., Bardawill C. J., David M. M. (1949): *Determination of serum proteins by means of the biuret reaction*. *The Journal of Biological Chemistry*, 177, S. 751–766.
- Gould S. J., Raposo G. (2013): *As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles*. *Journal of extracellular vesicles*, 2.
- Graham F. L., Smiley J., Russell W. C., Nairn R. (1977): *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. *The Journal of general virology*, 36 (1), S. 59–74.
- Greening D. W., Xu R., Ji H., Tauro B. J., Simpson R. J. (2015): *A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods*. *Methods in Molecular Biology*, 1295, S. 179–209.
- Gstraunthaler G. (2003): *Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture*. *Alternatives to animal experimentation*, 20 (4), S. 275–281.
- Guix F. X., Corbett G. T., Cha D. J., et al. (2018): *Detection of Aggregation-Competent Tau in Neuron-Derived Extracellular Vesicles*. *International journal of molecular sciences*, 19 (3).
- Guo T., Noble W., Hanger D. P. (2017): *Roles of tau protein in health and disease*. *Acta neuropathologica*, 133 (5), S. 665–704.
- Hampel H., O'Bryant S. E., Molinuevo J. L., et al. (2018): *Blood-based biomarkers for Alzheimer disease: mapping the road to the clinic*. *Nature reviews. Neurology*, 14 (11), S. 639–652.
- Hanlon D. (2013): *Scientific Principle of Simoa™ (Single Molecule Array) Technology*. Quanterix Corporation.
- Henriksen K., O'Bryant S. E., Hampel H., et al. (2014): *The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease*. *Alzheimer's & dementia*, 10 (1), S. 115–131.
- Holdenrieder S. (2019): *Extracellular vesicles as gold mine for new diagnostic and therapeutic approaches in medicine*. *trillium extracellular vesicles*, 1 (1).
- Horoszewicz J. S., Leong S. S., Kawinski E., et al. (1963): *LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma1*. *Cancer Research*, 43, S. 1809–1818.
- Iqbal K., del C. Alonso A., Chen S., et al. (2005): *Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1739 (2), S. 198–210.
- Jack C. R., Bennett D. A., Blennow K., et al. (2016): *A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers*. *Neurology*, 87 (5), S. 539–547.

- Jeyaram A., Jay S. M. (2017): *Preservation and Storage Stability of Extracellular Vesicles for Therapeutic Applications*. The AAPS journal, 20 (1).
- Johnson K. A., Schultz A., Betensky R. A., et al. (2016): *Tau positron emission tomographic imaging in aging and early Alzheimer disease*. Annals of neurology, 79 (1), S. 110–119.
- Kaighn M. E., Narayan K. S., Ohnuki Y., Lechner J. F., Jones L. W. (1979): *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. Investigative urology, 17 (1), S. 16–23.
- Katsinelos T., Zeitler M., Dimou E., et al. (2018): *Unconventional Secretion Mediates the Trans-cellular Spreading of Tau*. Cell reports, 23 (7), S. 2039–2055.
- Koedam E. L., Lauffer V., van der Vlies A. E., et al. (2010): *Early-versus late-onset Alzheimer's disease: more than age alone*. Journal of Alzheimer's disease, 19 (4), S. 1401–1408.
- Konoshenko M. Y., Lekchnov E. A., Vlassov A. V., Laktionov P. P. (2018): *Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends*. BioMed research international.
- Kühbach K., Hülsemann M., Herrmann Y., et al. (2016): *Application of an Amyloid Beta Oligomer Standard in the sFIDA Assay*. Frontiers in neuroscience, 10, S. 8.
- Lehrich B. M., Liang Y., Khosravi P., Federoff H. J., Fiandaca M. S. (2018): *Fetal Bovine Serum-Derived Extracellular Vesicles Persist within Vesicle-Depleted Culture Media*. International journal of molecular sciences, 19 (11).
- Leidinger P., Backes C., Deutscher S., et al. (2013): *A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients*. Genome biology, 14 (7).
- Li C., Götz J. (2017): *Tau-based therapies in neurodegeneration: opportunities and challenges*. Nature reviews. Drug discovery, 16 (12), S. 863–883.
- Li P., Kaslan M., Lee S. H., Yao J., Gao Z. (2017): *Progress in Exosome Isolation Techniques*. Theranostics, 7 (3), S. 789–804.
- Liberelle B., Merzouki A., Crescenzo G. de (2013): *Immobilized carboxymethylated dextran coatings for enhanced ELISA*. Journal of Immunological Methods, 389 (1-2), S. 38–44.
- Liu T.-C., Huang H., Dong Z.-N., et al. (2013): *Development of an amplified luminescent proximity homogeneous assay for quantitative determination of hepatitis B surface antigen in human serum*. Clinica Chimica Acta, 426, S. 139–144.
- Lobb R. J., Becker M., Wen S. W., et al. (2015): *Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma*. Journal of extracellular vesicles, 4, S. 27031.
- Malm T., Loppi S., Kanninen K. M. (2016): *Exosomes in Alzheimer's disease*. Neurochemistry international, 97, S. 193–199.
- Masters C. L., Bateman R., Blennow K., et al. (2015): *Alzheimer's disease*. Nature reviews. Disease primers, 1.
- Mattsson N., Zetterberg H., Hansson O., et al. (2009): *CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment*. JAMA, 302 (4), S. 385–393.
- McIntyre J. A., Ramsey C. J., Gitter B. D., et al. (2015): *Antiphospholipid autoantibodies as blood biomarkers for detection of early stage Alzheimer's disease*. Autoimmunity, 48 (5), S. 344–351.

- Mechaly A., Cohen N., Weiss S., Zahavy E. (2013): *A novel homogeneous immunoassay for anthrax detection based on the AlphaLISA method: detection of B. anthracis spores and protective antigen (PA) in complex samples*. Analytical and bioanalytical chemistry, 405 (12), S. 3965–3972.
- Meryman H. T. (2007): *Cryopreservation of living cells: principles and practice*. Transfusion, 47 (5), S. 935–945.
- Morkus P., Zolfaghari M., Parrello D., et al. (2019): *Optimization of microorganism preservation conditions for the development of an acute toxicity bioassay for biocides*. Chemosphere, 221, S. 45–54.
- Nobuhara C. K., DeVos S. L., Commins C., et al. (2017): *Tau Antibody Targeting Pathological Species Blocks Neuronal Uptake and Interneuron Propagation of Tau in Vitro*. The American journal of pathology, 187 (6), S. 1399–1412.
- Patterson C. (2018): *World Alzheimer Report 2018 - The state of the art of dementia research: New frontiers*. Alzheimer's Disease International.
- Promega (2012): *CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*.
- Reiners K. S., Dassler-Plenker J., Coch C., Hartmann G. (2017): *Funktion von extrazellulären Vesikeln und Bedeutung für die labormedizinische Diagnostik*. LaboratoriumsMedizin, 41 (6), S. 299–308.
- Saeedi S., Israel S., Nagy C., Turecki G. (2019): *The emerging role of exosomes in mental disorders*. Translational psychiatry, 9 (122).
- Shelke G. V., Lasser C., Gho Y. S., Lotvall J. (2014): *Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum*. Journal of extracellular vesicles, 3.
- Shu Z., Kang X., Chen H., et al. (2010): *Development of a reliable low-cost controlled cooling rate instrument for the cryopreservation of hematopoietic stem cells*. Cytotherapy, 12 (2), S. 161–169.
- Song L., Lachno D. R., Hanlon D., et al. (2016): *A digital enzyme-linked immunosorbent assay for ultrasensitive measurement of amyloid- $\beta$  1-42 peptide in human plasma with utility for studies of Alzheimer's disease therapeutics*. Alzheimer's research & therapy, 8 (1), S. 58.
- Sramkoski R. M., Pretlow T. G., Giaconia J. M., et al. (1999): *A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1*. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 35 (7), S. 403–409.
- Strimbu K., Tavel J. A. (2010): *What are Biomarkers?* Current opinion in HIV and AIDS, 5 (6), S. 463–466.
- Suppiah S., Didier M.-A., Vinjamuri S. (2019): *The Who, When, Why, and How of PET Amyloid Imaging in Management of Alzheimer's Disease-Review of Literature and Interesting Images*. Diagnostics, 9 (2).
- Swarbrick S., Wragg N., Ghosh S., Stolzing A. (2019): *Systematic Review of miRNA as Biomarkers in Alzheimer's Disease*. Molecular neurobiology, 56 (9), S. 6156–6167.
- Uberti D., Rizzini C., Spano P. F., Memo M. (1997): *Characterization of tau proteins in human neuroblastoma SH-SY5Y cell line*. Neuroscience letters, 235 (3), S. 149–153.
- Vashist S. K. (2012): *Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications*. Diagnostics, 2 (3), S. 23–33.

Walker J. M. (1994): *Basic Protein And Peptide Protocol*. Methods in Molecular Biology (32).

Wei T.-Y., Fu Y., Chang K.-H., et al. (2018): *Point-of-Care Devices Using Disease Biomarkers To Diagnose Neurodegenerative Disorders*. Trends in biotechnology, 36 (3), S. 290–303.

Winston C. N., Goetzl E. J., Akers J. C., et al. (2016): *Prediction of conversion from mild cognitive impairment to dementia with neuronally derived blood exosome protein profile*. Alzheimer's & dementia, 3, S. 63–72.

Zvěřová M. (2018): *Alzheimer's disease and blood-based biomarkers - potential contexts of use*. Neuropsychiatric disease and treatment, 14, S. 1877–1882.

### **Quellen aus dem Internet**

dsmz (o. J.): *HDLM-2*. URL: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-17> (Zugriff am 10.01.20).

G-Biosciences (2017): *ELISA Blocking Agents & Blocking Solutions*. URL: <https://info.gbiosciences.com/blog/elisa-blocking-agents-blocking-solutions> (Zugriff am 14.01.20).

The human protein atlas (o. J.): *MAPT*. URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000186868-MAPT/cell> (Zugriff am 09.01.20).

UniProtKB (2019): *P10636 (TAU\_HUMAN)*. URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P10636#sequences> (Zugriff am 09.01.20).

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Stellen der Arbeit, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, wurden unter Angabe der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht. Bei Zeichnungen, Skizzen und Plänen sowie bildlichen und grafischen Darstellungen wurde angegeben, ob sie selbständig gefertigt, nach eigenen Angaben durch andere ausgeführt oder übernommen worden sind.

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit mit der elektronischen Version übereinstimmt.

Ich erkläre darüber hinaus mit meiner Unterschrift, dass ich

- keine im Merkblatt „Hinweise zur Vermeidung von Plagiaten“ der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät und des ZHMB beschriebene Form des Plagiats begangen habe,
- alle Methoden, Daten und Arbeitsabläufe wahrheitsgetreu dokumentiert habe und
- keine Daten manipuliert habe.

Leipzig, den 29.01.2020