

Diplomarbeit

**Bindung von Amyloid- β an humanes
Serumalbumin:
Einfluss des Redox-Zustands des Albumins**

eingereicht von

Katharina Saar

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Drⁱⁿ. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Lehrstuhl für Physiologische Chemie

unter der Anleitung von

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. rer. nat. Karl Öttl

und

Mag. Dr. rer. nat. Margret Paar

Graz, am 25.08.2021

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 25.08.2021

Katharina Saar eh.

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei all denjenigen, die mich bei der Erstellung dieser Diplomarbeit unterstützt und gefördert haben.

Großer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Karl Öttl, der mir das Diplomarbeitsthema angeboten, mir spannende Einblicke in die universitäre Forschung ermöglicht, stets fachlichen Rat sowie wichtige Anregungen gegeben und sich immer Zeit für die Beantwortung meiner Fragen genommen hat.

Weiters möchte ich mich bei meiner Zweitbetreuerin Frau Mag. Dr. Margret Paar bedanken, ohne deren weitreichendes Fachwissen und außerordentliches Engagement die Erstellung meiner Diplomarbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre. Mit ihrer Unterstützung habe ich sehr viel Neues gelernt.

Außerdem ein herzliches Dankeschön an Frau Doris Payerl und Frau Martina Maiold. Beide haben mich während und über die Arbeit im Labor hinaus durchwegs tatkräftig unterstützt und hatten stets ein offenes Ohr für meine Anliegen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungen und deren Erklärung	7
Abbildungsverzeichnis	9
Zusammenfassung	12
Abstract	14
1 Einleitung	16
1.1 Symptomatik und Klassifikation der Demenzerkrankungen	16
1.1.1 Demenz vom Alzheimer-Typ	17
1.1.1.1 Nicht-genetische und genetische Risikofaktoren	18
1.1.1.2 Pathogenese der Alzheimer-Krankheit	18
1.1.1.2.1 Das Peptid Amyloid- β (A β)	19
1.2 Therapeutische Interventionsstrategien zur Behandlung der Alzheimer-Demenz	21
1.3 Humanes Serum Albumin (HSA)	21
1.3.1 Bindung von Amyloid- β an Albumin und Unterdrückung der Fibrillenbildung	23
1.3.1.1 Anwesenheit hydrophober Moleküle	24
1.4 Methoden zum Nachweis der Bindung zwischen Albumin und A β	25
1.4.1 Thioflavin T-Assay	26
1.4.2 „Quenching“ der Eigenfluoreszenz von Albumin	26
1.4.3 Western Blot	27
1.4.4 Enzym-vermittelter Immunsorptionsstest (Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay, ELISA)	27
1.4.4.1 Antikörper-ELISA	28
1.4.4.1.1 Direkter ELISA	28
1.4.4.1.2 Indirekter ELISA	28
1.4.4.2 „Sandwich“-ELISA	29
1.4.4.3 Kompetitiver ELISA	29

1.4.4.4	Amyloid- β ELISA	30
2	Fragestellung	31
3	Methoden	32
3.1	Quantifizierung von Albumin	32
3.2	Quantifizierung von freien Fettsäuren („non-esterified fatty acids“, NEFA)	32
3.3	Bestimmung des Lipopolysaccharidgehalts des Albumins anhand des Limulus-Amöbozyten-Lysat-Tests	33
3.4	Photometrischer Farbtest zur Bestimmung des Gesamtbilirubingehalts	34
3.5	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie („high performance liquid chromatography“, HPLC)	34
3.6	Präparation der HSA Fraktionen HMA, HNA1 und HNA2	36
3.7	In-vitro-Komplexierung von HSA mit Palmitinsäure	36
3.8	Lösen von Amyloid- β 40/ 42	37
3.9	Thioflavin T-Fluoreszenz Assay zur Detektion amyloider Fibrillen (ThT-Assay)	37
3.10	„Quenching“ der Eigenfluoreszenz von Albumin	38
3.11	Western Blot	38
3.12	ELISA	39
3.13	Jmol	41
3.14	Statistische Auswertung	41
4	Ergebnisse	43
4.1	Thioflavin T-Assay	43
4.2	„Quenching“ der Eigenfluoreszenz von Albumin	46
4.2.1	„Quenching“ der Eigenfluoreszenz von Albumin in Anwesenheit von Fettsäuren	49
4.3	Western Blot	50
4.4	Interaktion von Albumin und A β	52

4.4.1	Interaktion von Albumin und A β in Anwesenheit von Fettsäuren	65
5	Diskussion	68
	Literaturverzeichnis	78
	Anhang	82
Protokoll:	Quantifizierung von Albumin	82
Protokoll:	Quantifizierung von freien Fettsäuren (NEFA)	83
Protokoll:	Bestimmung des Lipopolysaccharidgehalts des Albumins anhand des Limulus-Amöbozyten-Lysat-Tests	84
Protokoll:	Photometrischer Farbttest zur Bestimmung des Gesamtbilirubingehalts	87

Abkürzungen und deren Erklärung

HSA	Humanes Serum Albumin
HMA	Humanes Mercaptalbumin
HNA1	Humanes Non-Mercaptalbumin 1
HNA2	Humanes Non-Mercaptalbumin 2
APP	Amyloid-Precursor-Protein
RAGE	„Receptor for advanced glycation end products“
RA	„Scavenger“-Rezeptor der Gruppe A
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
A β 40	Amyloid- β 40
A β 42	Amyloid- β 42
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Cys-34	Cystein 34
MMSE-K	Koreanischen Version der Mini Mental Status Examination
ThT	Thioflavin T
ELISA	„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“
HRP	„Horseradish Peroxidase“
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
AK	Antikörper
NEFA	„Non-esterified fatty acids“
RT	Raumtemperatur
LPS	Lipopolysaccharide
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
DCA	2,4-Dichloranilin
NIT	Nitrit-Reagenz
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography“
LM	Laufmittel
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
RCSB PDB	„Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank“
AUC	„Area under the curve“
ABC	„Area between the curves“
KA	Kommerzielles Albumin

N.c.	Nicht gecoatet
DL	Detektionslimit
FS	Fettsäuren
bzw.	beziehungsweise
vs.	versus
ca.	circa
rpm	„revolutions per minute“
signif.	signifikant

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Kristallstruktur von Humanem Serum Albumin komplexiert mit sieben Palmitinsäuremolekülen (PDB ID: 1E7H), welche in blau dargestellt sind (20) _____ 23
- Abb. 2: Kristallstruktur von Humanem Serum Albumin komplexiert mit sieben Palmitinsäuremolekülen (PDB ID: 1E7H) (20). Die potenziellen Bindungsstellen des Amyloid- β entsprechend der Publikation von Guo et al. (2018) sind rot markiert und raumfüllend hervorgehoben (8). Die vier Palmitinsäuremoleküle in unmittelbarer Umgebung der markierten Amyloid- β Bindungsstellen sind in blau dargestellt, die übrigen drei in schwarz __ 25
- Abb. 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus während der Übertragung der zu untersuchenden Proteinproben („Blotting“) auf die Nitrozellulose Membran _____ 27
- Abb. 4: Schematische Darstellung der beschriebenen ELISA-Varianten, „Sandwich“-ELISA (A), Kompetitiver ELISA (B), indirekter (C) und direkter (D) Antikörper-ELISA _____ 30
- Abb. 5: Schematische Darstellung des ELISA zum Nachweis der Bindung zwischen Amyloid- β und Albumin _____ 30
- Abb. 6: HPLC-Chromatogramm einer/eines gesunden, jungen Erwachsenen __ 35
- Abb. 7: Fluoreszenzsignal von ThT bei unterschiedlichen Amyloid- β Konzentrationen _____ 43
- Abb. 8: Einfluss der Albuminfraktionen auf die ThT-Fluoreszenz abhängig von der Amyloid- β -Fibrillenbildung _____ 46
- Abb. 9: A) „Quenching“ der Eigenfluoreszenz der verschiedenen Albuminfraktionen (HSA, HMA, HNA1, HNA2); B) Quantifizierung des „Quenching“-Effekts von A β 40 bzw. A β 42 auf die Eigenfluoreszenz der Albuminfraktionen _____ 47
- Abb. 10: A) „Quenching“ der Eigenfluoreszenz der verschiedenen Albuminfraktionen mit geringem Endotoxingehalt (HSA, HMA, HNA1, HNA2); B) Quantifizierung des „Quenching“-Effekts von A β 40 bzw. A β 42 auf die Eigenfluoreszenz endotoxinarmer Albuminfraktionen _____ 48
- Abb. 11: A-C) „Quenching“ der Eigenfluoreszenz von KA durch Amyloid- β 40 und 42 in Abwesenheit (A) und Anwesenheit gebundener Fettsäuren (2,7 mol/mol (B) und 4,7 mol/mol (C)); D) Quantifizierung des „Quenching“-

Effekts von A β 40 bzw. A β 42 auf die Eigenfluoreszenz von Albumin ohne (KA) und beladen mit Fettsäuren _____	50
Abb. 12: Bindung von A β 42 an die Albuminfraktionen HMA, HNA1, HNA2 untersucht mittels Western Blot _____	51
Abb. 13: Anpassung verschiedener Teilschritte im Rahmen der ELISA-Methodenetablierung. 2 h gegenüber 4 h Blocken mit 1% I-Block (A), Einsatz einer 1:500 gegenüber einer 1:1000 Verdünnung des HRP-Streptavidins (B), Vergleich Einsatz von 50 μ L gegenüber 100 μ L des Detektor Antikörpers (C) _____	53
Abb. 14: ELISA im Rahmen der Methodenetablierung. Eingesetzt wurden die Albuminfraktionen HSA, HMA, HNA1 und HNA2 zweier gesunder Spenderinnen und Spender in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M _____	53
Abb. 15: Variierte Beschichtungsdauer der Platten im Rahmen der ELISA-Methodenetablierung _____	54
Abb. 16: Einsatz verschiedener Verdünnungen des polyklonalen Detektor-Antikörpers im Rahmen der Methodenetablierung des ELISA _____	55
Abb. 17: Einsatz verschiedener Konzentrationen des Detektor-Antikörpers und Vergleich zwischen Beschallen und Mischen der Proben im Rahmen der ELISA-Methodenentwicklung _____	55
Abb. 18: ELISA durchgeführt mit HSA in verschiedenen Verdünnungen im Rahmen der Methodenetablierung. Einsatz von Albuminkonzentrationen zwischen 0,5 μ M und 40 μ M auf mit A β 42 beschichteten Platten _____	56
Abb. 19: ELISA-Versuch mit Standardalbumin (HSA) einer gesunden Spenderin auf mit A β 40 (A) bzw. mit A β 42 (B) beschichteten Platten _____	57
Abb. 20: A β 42-ELISA mit den Albuminfraktionen HSA, HMA, HNA1 und HNA2 einer gesunden Spenderin (Standardalbumin) _____	58
Abb. 21: Etablierte ELISA-Methode mit A β 40 (A) bzw. A β 42 (B) beschichteten Platten. Untersucht wurden hier die annähernd endotoxinfreien Albuminfraktionen HSA, HMA, HNA1, HNA2 vier gesunder Spenderinnen und Spender _____	59
Abb. 22: Standardisierte Extinktionswerte der Interaktionsanalyse zwischen A β 40 bzw. A β 42 mit 0,5 μ M endotoxinarmen Albuminfraktionen _____	59

Abb. 23: Signifikante Unterschiede im A β -Bindungsverhalten der Albuminfraktionen _____	60
Abb. 24: A β -Bindung von HSA. Der prozentuale HNA1-Anteil korreliert nicht mit den standardisierten Extinktionswerten des HSA (0,5 μ M) _____	61
Abb. 25: Fettsäuregehalt der Albuminfraktionen _____	62
Abb. 26: A β -Bindung abhängig vom FS-Gehalt _____	63
Abb. 27: Endotoxingehalt der Albuminfraktionen _____	63
Abb. 28: A β -Bindung abhängig vom Endotoxingehalt _____	64
Abb. 29: Bilirubingehalt der Albuminfraktionen sieben gesunder Spenderinnen und Spender _____	65
Abb. 30: A β -Bindung unabhängig vom Bilirubingehalt _____	65
Abb. 31: Interaktion von Albumin mit A β in An- und Abwesenheit von FS _____	66
Abb. 32: Etablierte ELISA Methode mit KA in An- und Abwesenheit von FS _____	66
Abb. 33: Schematische Darstellung der ELISA-Ergebnisse im pathophysiologischen Kontext A β -Fibrillen-assoziiertes, neurodegenerativer Erkrankungen. Die Struktur des A β 42-Peptids entstammt der Proteindatenbank (PDB ID: 1IYT) (41) _____	76

Zusammenfassung

Hintergrund:

Humanes Serum Albumin kann in Abhängigkeit vom Redox-Zustand der Thiol Gruppe (-SH) seiner Aminosäure Cystein-34 als Humanes Mercaptalbumin (HMA), als Humanes Non-Mercaptalbumin 1 (HNA1) oder höher oxidiert als Humanes Non-Mercaptalbumin 2 (HNA2) vorliegen. Diese Albuminfraktionen können, abhängig von physiologischen und pathophysiologischen Umständen, reversibel bzw. auch irreversibel ineinander übergehen. Hierfür kann zum Beispiel eine erhöhte oxidative Belastung verantwortlich sein, wie sie im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen, darunter die Demenz vom Alzheimer-Typ, auftritt. Der Fibrillenbildung und -ablagerung des Peptids Amyloid- β (A β) im zentralen Nervensystem wird eine entscheidende Rolle in der Entstehung der Alzheimer-Demenz zugeschrieben. Bekannt ist, dass Albumin Amyloid- β bindet und so die Formation der Fibrillen verhindern kann. Auch die Anwesenheit von erhöhten Spiegeln freier Fettsäuren sowie Endotoxinen im Blut nimmt möglicherweise pathophysiologischen Einfluss auf die Krankheitsentstehung. Die Bindungseigenschaften des Albumins für verschiedene Liganden variieren abhängig von dessen Redoxstatus sowie der Anwesenheit weiterer Liganden, darunter Fettsäuren und Endotoxine.

Fragestellung:

Unterscheiden sich Albuminfraktionen mit unterschiedlichem Redox-Zustand in ihrem Bindungsverhalten gegenüber Amyloid- β und wird dieses Verhalten durch Endotoxin und Fettsäuren beeinflusst.

Methoden:

Die Albuminfraktionen HMA, HNA1 und HNA2 wurden in vitro präpariert. Das Ausmaß der Interaktion zwischen den verschiedenen Albuminfraktionen und A β wurde mittels indirekter Nachweisverfahren, darunter der Thioflavin T-Assay und das „Quenching“ der Eigenfluoreszenz der Albuminfraktionen durch A β , und mittels direkter Nachweisverfahren, hierunter ein Western Blot sowie ein im Rahmen dieser Diplomarbeit neu etablierter A β -ELISA, untersucht.

Ergebnisse:

Anhand des in unserem Labor neu etablierten ELISA stellten wir signifikante Unterschiede im Interaktionsverhalten zwischen den Albuminfraktionen HMA und HNA1 bzw. HNA2 mit A β fest. Die höher oxidierten Albuminfraktionen HNA1 und HNA2 interagierten in signifikant geringerem Ausmaß mit A β als die reduzierte Albuminfraktion HMA. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an Fettsäuren sowie Endotoxinen der verwendeten Albuminproben mit deren Interaktionsausmaß mit A β korrelierte. Die weiteren von uns angewandten Verfahren zeigten hingegen keine eindeutig interpretierbaren Ergebnisse.

Fazit:

Der neu etablierte A β -ELISA erwies sich als verlässliche Nachweismethode der A β -Albumin-Interaktion. Diese wird gemäß unseren Ergebnissen durch den Redoxstatus der Albuminfraktionen aber auch durch die Anwesenheit von Liganden wie Fettsäuren und Endotoxinen beeinflusst. Sowohl einer vermehrten oxidativen Belastung als auch erhöhten Fettsäure- und Endotoxinspiegeln wird eine Rolle bei der Entstehung der Alzheimer-Demenz zugeschrieben. Das Zusammenspiel dieser Faktoren könnte den Krankheitsfortschritt entscheidend beeinflussen und Albumin eine maßgebliche Schutzfunktion zukommen. Unsere Ergebnisse dürften somit von Relevanz für das genauere Verständnis der pathophysiologischen Hintergründe neurodegenerativer Erkrankungen und für die potenzielle Entwicklung neuer Therapien sein und sollten daher in Zukunft anhand Liquor- und Serumproben von an einer Alzheimer-Demenz erkrankten Patientinnen und Patienten überprüft werden.

Abstract

Background:

Human Serum Albumin (HSA) is present in the human body as human mercaptalbumin (HMA), human nonmercaptalbumin 1 (HNA1) or human nonmercaptalbumin 2 (HNA2) depending on the redox state of the thiol group (-SH) of its amino acid Cysteine-34. Different physiological and pathophysiological circumstances can lead the albumin fractions to shift reversibly or irreversibly from one to each other. Such a shift can be caused by oxidative stress for example in the course of neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease (AD). In AD elevated levels of amyloid- β -peptide ($A\beta$) lead to fibril formation and deposition of extracellular amyloid plaques in the brain which may cause neuronal degeneration. HSA is able to inhibit this fibril formation by binding $A\beta$. Elevated levels of fatty acids and endotoxins also play a potential role in the development of AD. Depending on its redox state and the presence of various ligands, including fatty acids and endotoxins, the binding capacities of HSA vary. In this thesis we therefore investigated whether the redox state of the albumin fractions or the presence of albumin-bound ligands affect the interaction between albumin and $A\beta$.

Research question:

Do albumin fractions with different redox states differ in their binding characteristics towards amyloid- β and are these characteristics influenced by endotoxin and fatty acids.

Methods:

The albumin fractions HMA, HNA1 and HNA2 were prepared in vitro. To quantify the extent of interaction between the different fractions and $A\beta$ we used indirect detection methods such as the ThT-Assay and the tryptophan fluorescence quenching by $A\beta$ as well as a Western Blot and a newly established $A\beta$ -ELISA as direct detection methods.

Results:

By means of the newly established ELISA-method we were able to prove significant differences between the interaction potential of HMA with $A\beta$ and HNA1 or HNA2

with A β . The higher oxidized albumin fractions HNA1 and HNA2 interacted in a significantly lower magnitude with A β compared to the reduced fraction HMA. Furthermore, we showed that the content of fatty acids and endotoxins in the samples correlated positively with the standardized extinction and therefore with the interaction between the albumin fractions and A β . The other methods we applied did not lead to any clearly interpretable results.

Conclusion:

The newly established ELISA emerged to be the most reliable verification method for the interaction between the albumin fractions HMA, HNA1 and HNA2 and A β . According to our results this interaction is affected by both the redox state of the albumin fractions and the presence of albumin-bound ligands such as fatty acids and endotoxins. Oxidative stress as well as higher levels of fatty acids and endotoxins are supposed to play a more or less important role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. For this reason, the combination of these circumstances could relevantly influence the genesis and progression of Alzheimer's and Albumin could act as a protective factor. Our results are therefore likely to be of importance for the further understanding of neurodegenerative diseases and the development of potential treatments. Thus, our results should be further verified with the samples of patients suffering from Alzheimer's disease.

1 Einleitung

Aufgrund des zunehmenden Alters der Weltbevölkerung nimmt auch die Häufigkeit von Erkrankungen, die mit einem hohen Lebensalter assoziiert sind, stetig zu. Zu solchen Erkrankungen zählt die Demenz. 2001 waren etwa 24 Millionen Menschen weltweit an einer Demenz erkrankt. Schätzungen zufolge verdoppelt sich die Zahl der Demenzkranken weltweit in etwa alle 20 Jahre. Insofern keine wirkungsvollen Präventionsstrategien oder kurative Therapieansätze zur Behandlung von Demenzerkrankungen gefunden werden, könnte die Zahl der Demenzerkrankten dementsprechend bis 2040 auf ungefähr 81 Millionen ansteigen (1).

Dementielle Erkrankungen zählen zu den typischen Erkrankungen des höheren Lebensalters. Dies ist dadurch bedingt, dass das hohe Alter einen wichtigen Risikofaktor für die Entwicklung einer Demenz darstellt. Die Prävalenz der Demenz beträgt unter den über 65-jährigen Personen durchschnittlich nahezu 7%, während sie bei den über 85-jährigen Personen bereits bei etwa 23% liegt (2).

1.1 Symptomatik und Klassifikation der Demenzerkrankungen

Eine Demenz zeichnet sich durch das Auftreten eines Symptomenkomplexes aus, weshalb sie auch als klinisches Syndrom bezeichnet wird. Zu den Symptomen der Demenz zählen unter anderem der fortschreitende Verlust der Gedächtnisleistung, die zunehmende Beeinträchtigung der Alltagsbewältigung sowie eine Abnahme der allgemeinen Leistungsfähigkeit. Kennzeichnend für eine Demenzerkrankung sind zudem eine fortschreitende Störung kognitiver Funktionen. Zu diesen zählen zum Beispiel die Orientierung, das Urteilsvermögen, die Lernfähigkeit, die Sprache sowie die Auffassungsgabe und die Fähigkeit zum Lösen von Problemen. Das Bewusstsein der Betroffenen ist durch die Demenzerkrankung nicht beeinträchtigt. Von einer Demenz kann man ausgehen, wenn die beschriebenen Symptome über einen Zeitraum von sechs Monaten anhalten oder sich in ihrer Ausprägung verstärken. Zudem sollten andere Erkrankungen, die möglicherweise ähnliche Symptome verursachen, wie zum Beispiel eine Depression oder ein Delir, ausgeschlossen werden (2).

Demenzen lassen sich auf unterschiedliche Art und Weise klassifizieren. Man unterscheidet zunächst zwischen primären und sekundären Demenzen. Dabei

werden primäre Demenzen durch eine direkte Erkrankung des Gehirns verursacht, während sekundäre Demenzen durch Erkrankungen bedingt werden, welche zwar die typischen Symptome einer Demenz hervorrufen, allerdings vorrangig nicht das Gehirn betreffen. Zu den primären Demenzen zählen zum Beispiel die Alzheimer-Demenz, die vaskuläre Demenz sowie unter anderem die Lewy-Body-Demenz. Den sekundären Demenzen können Infektionserkrankungen zugrunde liegen, aber auch Schädel-Hirn-Traumata oder metabolische Störungen wie eine Schilddrüsenunterfunktion können auslösend sein (2).

Des Weiteren unterscheidet man dementielle Syndrome nach der vorrangig beeinträchtigten Hirnregion. Man spricht von einer kortikalen Demenz, einer subkortikalen Demenz oder einer frontalen Demenz. Bei der Alzheimer-Demenz, die die häufigste Form der Demenz bei den über 65-Jährigen darstellt, kommt es vor allem zu Störungen der kortikalen Funktionen (2).

1.1.1 Demenz vom Alzheimer-Typ

Die Demenz vom Alzheimer-Typ betrifft in etwa 60% der Demenzerkrankten, die älter als 65 Jahre alt sind. Die Erkrankung führt in der Regel nach etwa zehn Jahren zum Tod. Bereits nach ungefähr der Hälfte dieser Zeit entwickeln die Betroffenen eine ausgesprochene Pflegebedürftigkeit. Die Alzheimer-Demenz äußert sich zunächst durch für die Krankheit typische Frühsymptome, darunter die Beeinträchtigung des Gedächtnisses sowie des räumlichen Denkens. Da die Persönlichkeit sowie Antrieb und die Geschwindigkeit bei der Ausführung von Handlungen meist noch lange erhalten bleiben, können die Symptome der Betroffenen über einen gewissen Zeitraum hinweg unentdeckt bleiben. Die Zeit vom erstmaligen Auftreten der einzelnen Symptome bis zur Diagnose beträgt daher oftmals etwa zwei Jahre. Später treten psychische Symptome wie depressive Verstimmung und Unruhe hinzu. Auch neurologische Defizite sind in fortgeschrittenen Stadien feststellbar. Es kommt unter anderem zu einem vermehrten Auftreten epileptischer Anfälle, zu Gangstörungen und unwillkürlichen Muskelzuckungen (2).

1.1.1.1 Nicht-genetische und genetische Risikofaktoren

In etwa 5% der Alzheimer-Erkrankungen gehen auf familiär vererbte Genmutationen zurück. Man spricht in diesen Fällen von der familiären Alzheimer-Krankheit. Hier werden Genmutationen, welche meist autosomal-dominant vererbt werden, vorrangig auf drei Genen beschrieben. Von den Alzheimer-verursachenden Mutationen betroffen kann das Präsenilin-1-Gen auf Chromosom 14, das Präsenilin-2-Gen auf Chromosom 1 und das Amyloid-Precursor-Protein (APP)-Gen auf Chromosom 21 sein. Die Krankheit tritt bei einer familiären Form üblicherweise früher auf als bei der sporadischen Form. Ein weiterer erwähnenswerter genetischer Risikofaktor ist der Apolipoprotein-E-Genotyp. Homozygote Träger des $\epsilon 4$ -Allels sind einem zehnfach erhöhten Lebenszeitrisiko ausgesetzt an Alzheimer zu erkranken. Eine Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und ein niedriges Bildungsniveau stellen weitere, nicht genetisch bedingte Risikofaktoren für das Auftreten der Erkrankung dar. Frauen erkranken zudem etwas häufiger an der Alzheimer-Demenz als Männer. In 95% der Fälle handelt es sich um die sogenannte sporadische Form der Erkrankung, deren genaue Ursache bisher unklar ist. Hier werden vor allem eine gegenseitige Beeinflussung von genetischen und umweltbedingten Faktoren als Entstehungsursache postuliert (2, 3).

1.1.1.2 Pathogenese der Alzheimer-Krankheit

Bis heute gelten die genauen Entstehungsmechanismen, die für das Auftreten der Krankheit verantwortlich sind, als ungeklärt. Sowohl dem bei der Alzheimer-Krankheit intrazellulär vorkommenden hyperphosphorylierten Protein Tau als auch den extrazellulären Ablagerungen von Amyloid-Plaques werden allerdings zentrale Bedeutungen in der Pathogenese zugeschrieben. Im Rahmen der Amyloid-Hypothese wird vermutet, dass verschiedenste Faktoren, wie zum Beispiel Umwelteinflüsse, Toxine und ein Defekt des Amyloid-Precursor-Proteins, die Ablagerung von senilen Plaques verursachen. Diese senilen Plaques bestehen unter anderem aus dem schlecht abbaubaren Amyloidpeptid Amyloid- β 42, aus ApoE4 sowie aus Proteoglykanen. Die Plaques lagern sich extrazellulär um Dendriten und Axone von Neuronen. Intrazellulär wird die Bildung pathologischer Neurofibrillen durch die Phosphorylierung des Zytoskelettproteins Tau begünstigt (2, 4).

Infolge der Interaktion zwischen Amyloid- β Peptiden und Rezeptoren an der Zelloberfläche der Neuronen, wie unter anderem dem „Receptor for advanced glycation end products“ (RAGE) und einem „Scavenger“-Rezeptor der Gruppe A (RA), werden Sauerstoffradikale gebildet, welche zum Zelltod der Neurone beitragen. Werden RAGE und „Scavenger“-Rezeptor von Mikrogliazellen angeregt, werden Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel Zytokine, Prostaglandine und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) freigesetzt. Die so mediierte Entzündungsreaktion führt ebenfalls zum neuronalen Zelluntergang. Von diesem sind hauptsächlich Neurone des Hippocampus betroffen, allerdings betrifft der Zelltod unter anderem auch Hirnregionen wie Frontallappen, Temporallappen und Hypothalamus. Der Zelluntergang wiederum bedingt eine verminderte Bildung von Neurotransmittern und somit eine geringere Neurotransmitterkonzentration im Gehirn. Zu den in diesem Zusammenhang stark betroffenen Neurotransmittern zählt vor allem Acetylcholin. Andere Neurotransmitter wie Serotonin oder Noradrenalin sind ebenfalls betroffen. Durch den fortschreitenden neuronalen Untergang kommt es zu einer zunehmenden Störung der Gehirnfunktionen und somit zu einem Auftreten der vorher bereits beschriebenen Symptome (4).

1.1.1.2.1 Das Peptid Amyloid- β (A β)

Zwei der für die Pathogenese der Alzheimer-Demenz relevanten Amyloid- β -Peptide entstehen durch Proteolyse eines im menschlichen Körper allgegenwärtigen Transmembranproteins, dem Amyloid-Precursor-Protein (APP) (5). Die Funktion des APP, ist bislang noch weitestgehend unbekannt. Während die Proteinstruktur des APP eine Rezeptor- oder Größenwachstumsfaktorfunktion annehmen lässt, gibt es auch Forschungsergebnisse, die eine apoptotische bzw. anti-apoptotische Funktion vermuten lassen (6). Durch Proteolyse des APP kommt es im Wesentlichen wie bereits erwähnt zur Bildung zweier Formen des Amyloid- β -Peptids. Eine der beiden Formen hat eine Länge von 40 Aminosäuren und wird daher als Amyloid- β 40 (A β 40) bezeichnet, während die zweite, am Carboxy-Terminus verlängert, aus 42 Aminosäuren (Amyloid- β 42, A β 42) besteht. A β 40 und A β 42 sind sowohl im Liquor als auch im Blut zu finden. Obwohl sehr wahrscheinlich alle kernhaltigen Zellen A β -Peptid produzieren, kommt es nur innerhalb des Zentralen Nervensystems zur Ausbildung der bereits erwähnten, an der Pathogenese der Alzheimer-Demenz beteiligten Amyloid-Ablagerungen. Diese

Amyloid-Ablagerungen bestehen zum größten Teil aus Zusammenlagerungen einzelner Amyloid-Peptide zu Polymeren. Sie beinhalten sowohl A β 40 als auch A β 42, wobei A β 42 von beiden Formen die höhere Tendenz zur Fibrillenbildung zugeschrieben wird. Damit geht eine entsprechend größere Bedeutung in der Pathogenese der Alzheimer-Demenz einher (5).

Die Konzentration des im Blutplasma vorhandenen Amyloid- β (0,1-0,5 nM) ist mit der des Amyloid- β im Liquor vergleichbar (7, 8). Trotzdem kommt es lediglich im Zentralen Nervensystem, nicht jedoch in der Peripherie zur Ablagerung der A β -Fibrillen (5). Dieser Tatsache liegen verschiedene Erklärungsversuche zugrunde:

Zunächst ist möglicherweise davon auszugehen, dass Nervenzellen generell größere Mengen von A β sezernieren als andere Zellen. Zudem beinhaltet Liquor, verglichen mit Plasma, einen größeren Anteil an freiem, ungebundenem A β . Nur diese freie Form gilt als biologisch aktiv und ist dementsprechend in der Lage die pathologischen Fibrillen zu bilden. Im Blutplasma und auch im Liquor sind Proteine vorhanden, die in der Lage sind A β zu binden. Zu diesen zählen unter anderem Alpha1-Antitrypsin, IgG sowie IgA, vorrangig jedoch das Protein Albumin. Obwohl die Konzentration der genannten Proteine im Liquor sehr gering ist, wird ihnen hier eine antiamyloidogene Wirkung zugesprochen. Durch die Bindung von A β steht dieses im ZNS nicht mehr in freier Form zur pathologischen Fibrillenbildung zur Verfügung (5). Außerdem geht man davon aus, dass die A β -bindenden Proteine im Blutplasma als „peripheral sink“ fungieren. Hierbei spielt vor allem Albumin, welches das häufigste der Plasmaproteine darstellt, eine große Rolle. Während A β als Peptid die Blut-Hirn-Schranke passieren kann, können Albumin sowie die anderen bereits erwähnten A β -bindenden Proteine dies aufgrund ihrer Größe nicht wirkungsvoll. Da sie allerdings im Plasma in viel höherer Konzentration vorliegen als im Liquor und somit im Plasma eine höhere Bindungskapazität für A β besteht als im Liquor, wird A β über die Blut-Hirn-Schranke entlang des Konzentrationsgradienten des freien A β in die Peripherie geschifft. Das so ins Plasma gelangte A β wird an die genannten Proteine gebunden und die Konzentration im Liquor wird vermindert (9).

Amyloid- β spielt auch in der Diagnostik der Alzheimer-Erkrankung eine Rolle. Ein niedriger A β 42 Spiegel im Liquor cerebrospinalis, welcher anhand einer

Liquorpunktion gewonnen wird, wird als sogenannter Biomarker bezeichnet und lässt eine Aussage über bereits geformte A β -Peptidablagerungen im ZNS zu (10).

1.2 Therapeutische Interventionsstrategien zur Behandlung der Alzheimer-Demenz

Während bisher nur symptomatische Therapien für die Alzheimer-Demenz zur Verfügung stehen, sind Krankheitsverlauf-beeinflussende Therapiestrategien noch im Erprobungsstadium. Die symptomatische Therapie wird zur Kontrolle und Verbesserung der kognitiven Einschränkungen sowie der demenzbegleitenden Symptome, darunter depressive Zustände und Angst, eingesetzt. Zudem soll sie den Krankheitsfortschritt verlangsamen. Zum Einsatz kommen hier vorrangig sogenannte Acetylcholinesterase-Inhibitoren, welche das Acetylcholin-Neurotransmitterdefizit durch die Inhibition des Enzyms Acetylcholinesterase positiv beeinflussen. Weiters werden N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptorantagonisten verabreicht. Diese wirken auf den zerebralen Glutamat-Stoffwechsel ein und tragen zu einer verbesserten Gedächtnisleistung bei (10).

Neue therapeutische, möglicherweise den Krankheitsverlauf mitbestimmende Strategien konzentrieren sich auf die Entwicklung eines potenten Inhibitors der Amyloid-Ablagerung. Hier werden zum Beispiel Sekretase-Hemmer, Immuntherapien, antiinflammatorische und antioxidativ wirkende Substanzen entwickelt sowie das therapeutische Potential Amyloid-bindender Stoffe untersucht (10).

Über 90% des im Blut vorhandenen A β 40 und A β 42 sind unter physiologischen Bedingungen an Humanes Serum Albumin (HSA) gebunden. Dieses gilt als einer der wirksamsten intrinsischen Inhibitoren der Bildung von A β -Fibrillen (9). Bereits in einigen Studien wurde entsprechend dieser Tatsache die Wirksamkeit des Einsatzes von therapeutischem Albumin untersucht (11, 12).

1.3 Humanes Serum Albumin (HSA)

Bei Humanem Serum Albumin handelt es sich um ein Protein, das in der Leber synthetisiert wird. Es ist, wie bereits erwähnt, das häufigste Protein im Blutplasma und hat ein Molekulargewicht von 66,5 kDa (13). Aufgrund der Tatsache, dass Albumin die Blut-Hirn-Schranke nicht frei passieren kann, liegt es im Liquor cerebrospinalis in einer viel geringeren Konzentration vor (ca. 1-5 μ M) als im

Blutplasma (ca. 400-600 μM). Trotz dieser geringen Konzentration stellt HSA mit einem prozentuellen Anteil von 66% das häufigste Protein im Liquor dar (14). HSA trägt im Blut hauptsächlich zur Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks bei. Außerdem besitzt es die Fähigkeit körpereigene und körperfremde Stoffe zu transportieren, darunter zum Beispiel Fettsäuren, Bilirubin oder Medikamente (13, 15). Weiters ist HSA dazu in der Lage freie Sauerstoffradikale abzufangen und hat somit eine antioxidative Wirkung (15). Grundsätzlich unterscheidet man abhängig vom Redoxstatus drei Formen des HSA: Die reduzierte Form Humanes Mercaptalbumin (HMA), die reversibel oxidierte Form Humanes Non-Mercaptalbumin 1 (HNA1) und die irreversibel oxidierte Form Humanes Non-Mercaptalbumin 2 (HNA2). Verantwortlich für die Redoxsensitivität des Albumins ist die Thiol Gruppe (-SH) am Cystein 34 (Cys-34). Während die Thiol Gruppe des HMA frei bleibt, bildet die des HNA1 Disulfide mit anderen Thiolen wie zum Beispiel Cystein, Homocystein oder Glutathion. Die höher oxidierte Form HNA2 zeichnet sich durch Oxidation des Cystein zu Sulfin (-SO₂H)- oder Sulfonsäure (-SO₃H) aus (16, 17).

Ist der menschliche Körper einem höheren Maß an oxidativem Stress ausgesetzt, wie dies zum Beispiel in höherem Alter, bei kognitiver Beeinträchtigung („mild cognitive impairment“, MCI) oder bei der Demenz vom Alzheimer Typ der Fall ist, liegt Albumin im Blutplasma sowie im Liquor in höher oxidierten Formen vor. Die antioxidative Wirkung ist also in diesen Fällen im Vergleich zum Albumin eines Gesunden herabgesetzt (18). Weiters besteht bei Alzheimer Patientinnen und Patienten gegenüber Gesunden ein reduzierter Plasmaspiegel des Albumins (19). Tae-Suk et al. (2006) zeigten, dass an einer Alzheimer-Demenz erkrankte Patientinnen und Patienten eine signifikant geringere Plasmakonzentration des Albumins ($3,8 \pm 0,4$ g/dl) aufwiesen als gesunde Personen einer Kontrollgruppe ($4,2 \pm 0,2$ g/dl). Die Albuminplasmakonzentration innerhalb der Alzheimer-Gruppe korrelierte hier mit den Ergebniswerten der koreanischen Version der Mini Mental Status Examination (MMSE-K), einem diagnostischen Test, anhand dessen die kognitive Funktion der untersuchten Patientinnen und Patienten eingeschätzt wurde (19).

Albumin wird in drei Domänen eingeteilt, welche mit I, II und III bezeichnet werden. Innerhalb jeder Domäne werden wiederum zwei Subdomänen (A, B) unterschieden (13).



Abb. 1: Kristallstruktur von Humanem Serum Albumin komplexiert mit sieben Palmitinsäuremolekülen (PDB ID: 1E7H), welche in blau dargestellt sind (20).

1.3.1 Bindung von Amyloid- β an Albumin und Unterdrückung der Fibrillenbildung

Über die Bindung zwischen Amyloid- β und Albumin sowie die molekularen Mechanismen, durch welche Albumin die Fibrillenbildung des Amyloid- β unterbindet, existieren in der Literatur verschiedene Hypothesen.

Eine sehr häufig vertretene Annahme bezüglich des Interaktionsmechanismus zwischen Albumin und A β besagt, dass Albumin die Fibrillenbildung unterbindet, indem es die Anlagerung weiterer A β -Monomere an bereits vorgeformte Oligomere verhindert (7, 9, 21, 22). Demnach konkurriert Albumin mit den ungebundenen A β -Monomeren, da es selektiv A β -Oligomere bindet. Die A β -Monomere können sich weiterhin nicht mehr an die A β -Oligomere anlagern und die Fibrillen-Formation wird verhindert (9, 21).

Abgesehen vom Interaktionsmechanismus zwischen Albumin und Amyloid- β wurden außerdem die Bereiche des Albuminmoleküls genauer untersucht, bei denen es sich um potenzielle Bindungsstellen des A β -Peptids am Albuminmolekül handelt. Während im Zuge einiger Studien die Interaktion von A β mit einzelnen Segmenten, wie zum Beispiel dem C-Terminus, oder Domänen, darunter Domäne 3, des Albuminmoleküls festgestellt wurden, belegt eine andere Studie anhand

molekulardynamischer Simulationen, dass die drei Bereiche zwischen den Aminosäuren Leu155-Glu188, Pro384-Val415 und Thr540-Ala582 des Albuminmoleküls mit hoher Wahrscheinlichkeit Bindungsstellen für A β darstellen (8, 22, 23). Wiederum andere Studienergebnisse zeigen, dass ein A β -Monomer in der Furchenregion des herzförmigen Albuminmoleküls binden kann und so die Aggregation der Monomere untereinander durch Albumin unterdrückt wird (14).

1.3.1.1 Anwesenheit hydrophober Moleküle

Humanes Serum Albumin ist -wie bereits erwähnt- in der Lage Fettsäuren, hierfür stehen am Albuminmolekül sieben Hauptbindungsstellen zur Verfügung, und andere hydrophobe Stoffe im Blut zu transportieren (s. Abb. 1) (5, 7, 20, 24).

Entsprechend der diesbezüglich vorhandenen Literatur gibt es Grund zu der Annahme, dass die Interaktion zwischen Amyloid- β und Albumin in Anwesenheit nicht wasserlöslicher Moleküle, darunter Fettsäuren, Cholesterol und auch Medikamente wie Warfarin oder Tolbutamid, gestört wird (5, 7, 8). Hinsichtlich der Ursache dieser Beeinträchtigung der Amyloid- β -Albumin-Bindung existieren ebenfalls verschiedene Hypothesen. Der erste Erklärungsversuch beruht dabei auf einer Konkurrenz der hydrophoben Moleküle mit A β um dieselben Bindungsstellen am Albuminmolekül (5, 7). Eine zweite Erklärungsmöglichkeit besteht in der Flexibilitätsänderung des Albuminmoleküls in Anwesenheit der Fettsäuren, welche eine Beeinträchtigung der potenziellen A β -Bindungsstellen zur Folge hat (8).

Unabhängig vom zugrundeliegenden Mechanismus führt die Anwesenheit von Fettsäuren und anderen hydrophoben Molekülen zu einer Verminderung des inhibitorischen Effekts, den Albumin auf die A β -Fibrillenbildung ausübt (7, 8, 22). Dies könnte einer der Gründe dafür sein, dass die Aufnahme großer Mengen von gesättigten und trans-ungesättigten Fettsäuren mit der Nahrung mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Alzheimer-Demenz einhergeht (25).

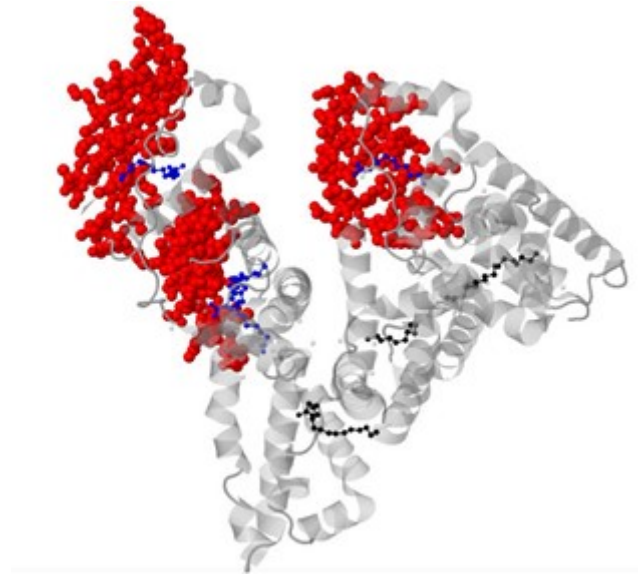


Abb. 2: Kristallstruktur von Humanem Serum Albumin komplexiert mit sieben Palmitinsäuremolekülen (PDB ID: 1E7H) (20). Die potenziellen Bindungsstellen des Amyloid- β entsprechend der Publikation von Guo et al. (2018) sind rot markiert und raumfüllend hervorgehoben (8). Die vier Palmitinsäuremoleküle in unmittelbarer Umgebung der markierten Amyloid- β Bindungsstellen sind in blau dargestellt, die übrigen drei in schwarz.

1.4 Methoden zum Nachweis der Bindung zwischen Albumin und A β

In der Literatur werden verschiedene Methoden beschrieben, mit welchen sich die Bindung zwischen dem Peptid Amyloid- β und Albumin nachweisen lässt. Dies kann zum Beispiel indirekt durch den sogenannten Thioflavin T (ThT)-Assay erfolgen, anhand des Nachweises der Verminderung der Eigenfluoreszenz des Albumins durch die Bindung von Amyloid- β („Quenching“) oder durch den Nachweis mittels immunologischer Methoden wie Western Blot und Enzymvermitteltem Immunabsorptionstest („enzyme-linked immunosorbent assay“, ELISA) (5, 9, 26-28). Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden alle genannten Methoden eingesetzt. Unser Hauptaugenmerk legten wir allerdings auf den Nachweis der Bindung mittels ELISA, weil es sich hierbei um ein direktes Nachweisverfahren der Amyloid- β -Albumin-Interaktion handelt (5).

1.4.1 Thioflavin T-Assay

Eine in der Literatur bereits häufig beschriebene Methode zur Quantifizierung von Amyloid-Fibrillen ist der Thioflavin T-Assay. Grundlage dieser Methode stellt das mit der Bindung von ThT, einem fluoreszierenden Farbstoff, an Amyloid-Fibrillen einhergehende Fluoreszenzsignal dar. ThT bindet an bereits geformte Amyloidfibrillen und nur in geringer Form an oligomer vorliegendes Amyloid- β (27). Proportional zur zunehmenden Anzahl der Amyloidfibrillen steigt die Intensität des ThT-Fluoreszenzsignals. Daher sind die Fibrillen mit dieser Methode detektier- und quantifizierbar (26).

Bekannt ist auch, dass Albumin die Amyloidfibrillenbildung unterbindet (5). Somit ist davon auszugehen, dass das von ThT ausgehende Fluoreszenzsignal in Anwesenheit von Albumin geringer ausfällt. Auch kann mit dieser Methode beurteilt werden, ob die verschiedenen Fraktionen des Albumins (HSA, HMA, HNA1, HNA2) die Fibrillenbildung unterschiedlich stark beeinträchtigen.

1.4.2 „Quenching“ der Eigenfluoreszenz von Albumin

Wird eine Substanz mit monochromatischem Licht bestrahlt und es kommt zur Absorption und anschließenden, spontanen Emission von Licht höherer Wellenlänge, spricht man von Fluoreszenz. Auch Albumin weist eine solche, in diesem Fall als Eigenfluoreszenz bezeichnete Eigenschaft auf. Diese geht hauptsächlich auf die im Protein Albumin enthaltene Aminosäure Tryptophan zurück, zu einem geringen Anteil sind auch die im Albuminmolekül wesentlich zahlreicher vorhandenen Tyrosin-Aminosäuren beteiligt (13).

Durch die Bindung von Liganden an Albumin kommt es zu einer Fluoreszenzsausschöpfung, auch als „Quenching“ der Eigenfluoreszenz des Albumins bezeichnet. Dies ist auch bei der Bindung von Amyloid- β an Albumin der Fall. Man kann also anhand der gemessenen Fluoreszenz Rückschlüsse auf die Anzahl der an Albumin gebundenen Amyloid- β Peptide ziehen. Sind kaum Amyloid- β Peptide an Albumin gebunden, bleibt die gemessene Fluoreszenz vergleichbar mit der Eigenfluoreszenz von Albumin allein. Je mehr Amyloid- β Peptide allerdings an die Albuminmoleküle binden, desto geringer fällt die detektierbare Fluoreszenz des Albumins aus (9). Somit kann anhand der jeweiligen Fluoreszenzsausschöpfung

untersucht werden, ob Unterschiede im Bindungsverhalten der verschiedenen Albuminfraktionen bezüglich Amyloid- β bestehen.

1.4.3 Western Blot

Anhand des Western Blots, einer häufig angewandten immunologischen Methode zur Analyse von Proteinen, werden die zu untersuchenden Proteine zunächst entsprechend ihrer Größe mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgt durch Anlegen einer elektrischen Spannung die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulose Membran, auch als „Blotting“ bezeichnet. Die Proteine werden so auf der Membran immobilisiert und können anschließend mittels indirekter Verfahren, wie zum Beispiel anhand von Antikörpern, sichtbar gemacht und quantifiziert werden (29).

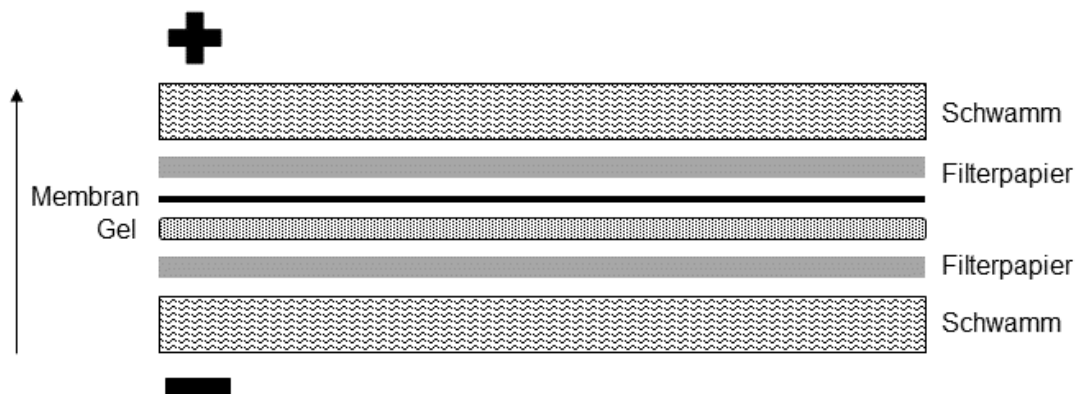


Abb. 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus während der Übertragung der zu untersuchenden Proteinproben („Blotting“) auf die Nitrozellulose Membran. Entsprechend ihrer negativen Ladung durch Einstellen eines bestimmten pH-Wertes wandern die Proteine nach Anlegen einer Spannung zur Anode (entlang der Pfeilrichtung).

1.4.4 Enzym-vermittelter Immunsorptionsstest (Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay, ELISA)

ELISA ist eine Methode aus den Enzymatischen Immunabsorptionsverfahren (EIA). Mittels dieser, in der medizinischen Forschung häufig angewandten Methode, lassen sich verschiedenste Antigene, die in einer Probe enthalten sind, nachweisen.

Bei diesen Antigenen kann es sich sowohl um Viren, Hormone, Zytokine sowie Antikörper oder andere Proteine handeln.

Das Grundprinzip des ELISA basiert auf der Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper. Der Name „enzyme-linked immunosorbent assay“ kommt daher zustande, dass diese Antigen-Antikörper-Bindung durch die Konjugation des Antikörpers mit einem Enzym und die Zugabe eines Enzym-Substrats nach Ablauf einer Reaktion mit Farbumschlag sichtbar gemacht werden kann.

Man unterscheidet verschiedene Formen des ELISA, darunter unter anderem den Antikörper-ELISA, den „Sandwich“-ELISA und den kompetitiven ELISA.

1.4.4.1 Antikörper-ELISA

1.4.4.1.1 Direkter ELISA

Die direkte Form des ELISA gilt als einfachste Form, da hier nur ein Antikörper verwendet werden muss. Hierfür wird das zu untersuchende Antigen auf eine Platte aus Polystyren, Polyvinyl oder Polypropylen immobilisiert (adsorbiert). Diesen Vorgang bezeichnet man als beschichten oder ins Englische übersetzt als „coat“. Im Anschluss wird ein Enzym-konjugierter, für das Antigen spezifischer Antikörper hinzugefügt. Schließlich wird ein Substrat für das Enzym hinzugegeben und damit eine Reaktion in Gang gesetzt, welche zum Beispiel mit einer Farbentwicklung einhergeht. Abhängig von dem Ausmaß der Farbentwicklung lassen sich Rückschlüsse auf die Menge des auf der Platte haftenden Antigens ziehen (30).

1.4.4.1.2 Indirekter ELISA

Die Vorgehensweise zur Durchführung des indirekten ELISA stimmt in den meisten Schritten mit dem bereits beschriebenen direkten ELISA überein. Der Unterschied zum direkten ELISA besteht darin, dass hier im Anschluss an die Inkubation mit dem ersten, diesmal unkonjugierten, Antikörper ein zweiter mit einem Enzym gekoppelter Antikörper, welcher an den primären Antikörper bindet, auf die Platte gegeben wird. Dieser wird auch als sekundärer Antikörper bezeichnet. Wiederum wird eine Substratlösung zugegeben und der mit der Enzym-katalysierten Reaktion einhergehende Farbumschlag kann nach Inkubation festgestellt werden. Der Farbumschlag fällt entsprechend der vorhandenen Menge des Antigen-spezifischen Antikörpers aus (30).

1.4.4.2 „Sandwich“-ELISA

Beim häufig verwendeten Sandwich-ELISA wird ein spezifischer Antikörper, der auch als „Capture“-Antikörper bezeichnet wird, auf einer Microtiter Platte adsorbiert. Anschließend wird eine Lösung zugegeben, welche das zu detektierende Antigen enthält. Danach wird ein anderer, für das Antigen spezifischer Antikörper hinzugefügt. An diesen zweiten Antikörper ist ein Enzym gekoppelt, welches wiederum ein Substrat in ein gefärbtes Produkt umsetzt (30).

1.4.4.3 Kompetitiver ELISA

Bei dieser Form des ELISA wird die Platte zunächst mit einem Antikörper-spezifischen Antigen gecoatet und daraufhin sowohl die Probe, die das zu untersuchende Antigen enthält, als auch der mit einem Enzym-konjugierte Antikörper hinzugegeben. Das Beschichtungs-Antigen und das zu quantifizierende Antigen konkurrieren um die freien Bindungsstellen des Antikörpers. Nach Zugabe des Substrats kann wiederum der Grad des Farbumschlags quantifiziert werden. Ein stark ausfallender Farbumschlag spricht dafür, dass das zu untersuchende Antigen in der Probe nur in geringer Menge vorliegt, wodurch die Antikörper an die Kompetitor-Antigene auf dem Boden der Platte binden konnten (30).

Die verschiedenen ELISA Formen sind in Abb. 4 schematisch dargestellt (s. Abb. 4).

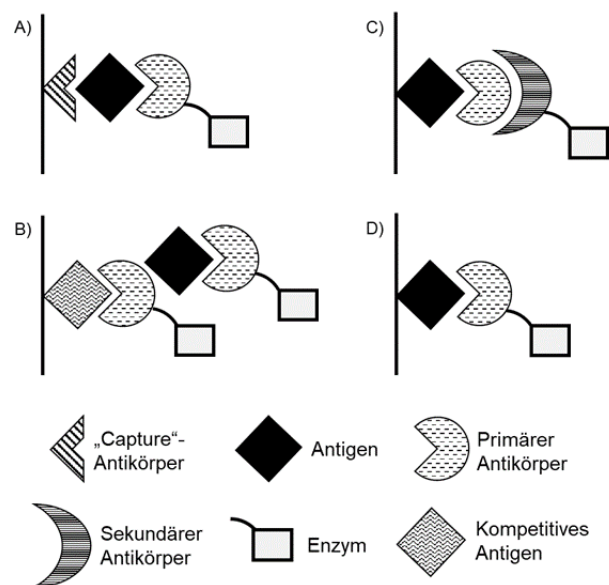


Abb. 4: Schematische Darstellung der beschriebenen ELISA-Varianten, „Sandwich“-ELISA (A), Kompetitiver ELISA (B), indirekter (C) und direkter (D) Antikörper-ELISA.

1.4.4.4 Amyloid- β ELISA

Abseits der klassischen Verfahren kann ein ELISA auch zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen angewandt werden. Mittels der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten speziellen ELISA-Methode kann die Bindung zwischen Amyloid- β 40/ 42 und Albumin quantifiziert werden. Dazu wird eine Microtiter Platte mit Amyloid- β 40/ 42 beschichtet. Anschließend wird Albumin auf die beschichtete Platte aufgetragen und an Amyloid- β gebundenes Albumin mittels Albumin-Detektor-Antikörper, einem biotinylierten Antikörper, markiert. Im nächsten Schritt wird Streptavidin, das an das Biotin bindet und mit dem Enzym Merrettich-Peroxidase, im Englischen als HRP („Horseradish Peroxidase“) bezeichnet, konjugiert ist, hinzugegeben. Als Substrat wird in diesem Fall TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) verwendet. Bei der folgend ablaufenden Reaktion wird TMB in ein blaues Reaktionsprodukt umgewandelt. Das Ausmaß der Färbung kann mittels Plattenphotometer quantifiziert werden. Konnten viele Albuminmoleküle an Amyloid- β binden, fallen auch die gemessenen Extinktionswerte dementsprechend hoch aus.

Der Vorgang sowie die beteiligten Komponenten sind in Abb. 5 schematisch dargestellt (s. Abb. 5).

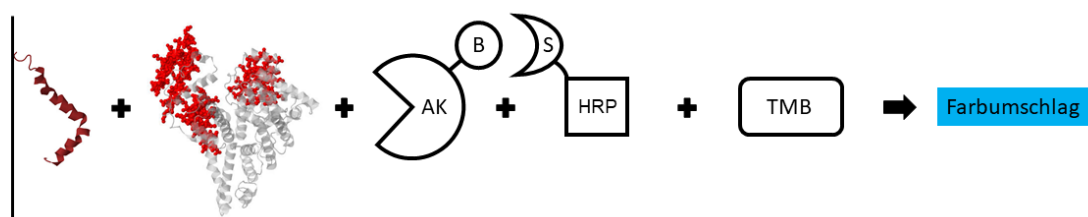


Abb. 5: Schematische Darstellung des ELISA zum Nachweis der Bindung zwischen Amyloid- β und Albumin. Die Bezeichnungen stehen für biotinyliertes (B) Detektor-Antikörper (AK), Merrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert mit Streptavidin (S) sowie 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine-Substrat (TMB).

2 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es vorrangig, die oben beschriebene Amyloid- β ELISA-Methode in unserem Labor zu etablieren und anhand dieser und der anderen erwähnten Methoden die Fragestellung zu beantworten, inwiefern sich das Bindungsverhalten von Amyloid- β an Albumin abhängig von dessen Redoxstatus verändert und inwieweit dieses Bindungsverhalten durch die Anwesenheit von Liganden wie Fettsäuren und Endotoxine beeinflusst wird. Bisher wurde -unseres Wissens nach- noch nie genauer untersucht, ob oxidiertes Albumin (HNA) Amyloid- β womöglich schlechter bindet als HMA. Dies ist von großem Interesse, da neurodegenerative Erkrankungen, wie zum Beispiel die Alzheimer-Demenz, mit erhöhtem oxidativem Stress und damit mit einer Verschiebung des Redoxstatus der Albuminfraktionen zugunsten des HNA einhergehen (18, 31). Auch Albumin-Liganden wie Fettsäuren und Endotoxine sind wahrscheinlich von Bedeutung für die Entstehung der Demenz vom Alzheimer-Typ (7, 25, 32). Sollte ein Unterschied im Bindungsverhalten der verschiedenen Albuminfraktionen mit A β gegeben sein bzw. Liganden dieses beeinträchtigen, könnten sich entsprechend dieses Ansatzes neue Therapiemöglichkeiten für die Alzheimer-Demenz ergeben.

3 Methoden

3.1 Quantifizierung von Albumin

Anhand dieser im Labor routinemäßig durchgeführten Methode lässt sich die Proteinkonzentration in Serum oder Plasma einer Probandin oder eines Probanden bestimmen. Zunächst wurden jeweils 5 µL des PBS-Puffers (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4; Leerwert) der Probandinnen- oder Probandenprobe sowie des Standards (Autocal) und der Kontrolle (Serodos) mit jeweils 500 µL Albumin-Reagenz (HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Wiesbaden, Deutschland) bei Raumtemperatur (RT) versetzt. Die Inkubationszeit betrug, nachdem die Proben gemischt wurden, 10 Minuten bei RT. Anschließend wurden jeweils 200 µL als Doppelansatz in die Kavitäten einer 96-Well-Platte überführt. Hiernach erfolgte die Messung der Extinktionen mittels Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 546 nm (s. Anhang).

Anhand der gemessenen Werte schlossen wir mit Hilfe der folgenden Formel auf die Proteinkonzentrationen der untersuchten Proben rück:

$$\text{Standard} \left(\frac{\text{g}}{\text{dl}} \right) \times \left(\frac{\text{Extinktion der Probe}}{\text{Extinktion des Standards}} \right) = \text{Proteinkonzentration der Probe} \left(\frac{\text{g}}{\text{dl}} \right)$$

3.2 Quantifizierung von freien Fettsäuren („non-esterified fatty acids“, NEFA)

Bei der NEFA-Bestimmung können mit Hilfe eines enzymatischen Farbtests albumingebundene freie Fettsäuren in Seren bzw. Plasmen sowie Albuminräparationen von Probandinnen und Probanden quantifiziert werden. Bei dieser Methode handelt es sich um eine im Labor routinemäßig durchgeführte Methode.

Zur Durchführung der NEFA-Bestimmung mittels NEFA-HR(2) Assay (FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH, Neuss, Deutschland) stellten wir zunächst eine Standardreihe der Konzentrationen 1 mmol/L, 0,5 mmol/L, 0,25 mmol/L, 0,125 mmol/L und 0,0625 mmol/L her. Anschließend wurden 10 µL PBS-Puffer (Leerwert), jeweils 10 µL der Standardreihe sowie 10 µL der zu untersuchenden Probe mit 150 µL des Farbreagenz A versetzt. Es folgte eine Inkubationszeit von zehn Minuten bei RT. Weiters wurden 75 µL von Farbreagenz B hinzugefügt und erneut bei RT für

zehn Minuten inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte daraufhin am Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 546 nm. Anhand der Extinktionen der Standardreihe erstellten wir eine Geradengleichung, mittels welcher wir die NEFA-Konzentration der untersuchten Proben bestimmten (s. Anhang).

3.3 Bestimmung des Lipopolysaccharidgehalts des Albumins anhand des Limulus-Amöbozyten-Lysat-Tests

Durch die Reaktion der in einer Probe enthaltenen Lipopolysaccharide (LPS, Endotoxine) mit einem Lysat aus den Blutzellen des Pfeilschwanzkrebses kommt es konzentrationsabhängig zur Umwandlung des im Lysat enthaltenen Proenzym zum Enzym. Ein synthetisches, an den Farbstoff p-Nitroanilin gebundenes Peptid wird zugegeben, wodurch es zu einer durch das Enzym katalysierten, gelben Farbreaktion kommt, die photometrisch quantifiziert werden kann. Je größer die Menge des in der Probe enthaltenen Endotoxins, desto intensiver fällt diese Farbreaktion aus.

Unter Verwendung des Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) gaben wir in die Kavitäten einer auf 37°C aufgeheizten 96-Well-Platte hierzu jeweils in Doppelbestimmung 50 µL Endotoxin Standard Lösung, 50 µL Puffer (Blank) oder 50 µL der zu untersuchenden Proben. Die Temperatur der Platte wurde während des gesamten Vorgangs auf 37°C gehalten. Anschließend wurden jeweils 50 µL des Amöbozyten-Lysat-Reagenzes hinzugefügt und die Platte schwach geschüttelt. Die Inkubationszeit betrug abhängig von der Höhe des Standards entweder 12 oder 30 Minuten. Nach Ende der Inkubationszeit wurden 100 µL des vorgewärmten Substrats in die Wells gegeben. Die Platte wurde erneut schwach geschüttelt und nach Ablauf der Inkubationszeit von sechs Minuten fügten wir jeweils 50 µL 25%-iger Essigsäure (Stop-Lösung) hinzu. Wiederum wurde die Platte leicht geschüttelt. Die Messung der Extinktionen erfolgte anschließend am Plattenphotometer bei 405 nm Wellenlänge. Mittels einer Standardreihe bestimmten wir den Lipopolysaccharid-Gehalt der untersuchten Proben (s. Anhang).

3.4 Photometrischer Farbttest zur Bestimmung des Gesamtbilirubingehalts

Im Rahmen dieses Farbttests wird Albumin-gebundenes Bilirubin zunächst mittels eines Detergens freigesetzt. Nach Zugabe von diazotiertem 2,4-Dichloranilin (DCA) reagiert das Gesamtbilirubin mit diesem zu einem roten Azofarbstoff (Indikator).

100 μL einer Serumprobe wurden hierzu mit 1000 μL Gebrauchslösung (DCA + Nitrit-Reagenz (NIT) im Verhältnis 1:1, HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Wiesbaden, Deutschland) versetzt. Zur Bestimmung des Leerwerts gaben wir zu 100 μL der zu untersuchenden Probe 1000 μL des Probenleerwert-Reagenzes (HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH) hinzu. Anschließend folgte eine lichtgeschützte Inkubation von 10 Minuten bei 20-25 °C. Die Extinktionsmessung nahmen wir bei einer Wellenlänge von 546 nm am Plattenphotometer vor. Um die Bilirubinkonzentration (in mg/dl) der untersuchten Probe festzustellen, multiplizierten wir die gemessene Extinktion mit dem Faktor 12,5 (s. Anhang).

3.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie („high performance liquid chromatography“, HPLC)

Bei der in dieser Arbeit angewandten HPLC-Methode handelt es sich um ein Verfahren zur chromatographischen Trennung der verschiedenen Albuminfraktionen. Die Plasma-Probe einer Probandin oder eines Probanden wird zusammen mit zwei Laufmitteln (LM 1 und LM 2), welche die mobile Phase darstellen, über eine Säule geleitet, welche die stationäre Phase darstellt. Die Anteile der beiden Laufmittel an der mobilen Phase werden über den Zeitraum der Auftrennung hinweg prozentual verändert (Gradient). Je nach Grad der Interaktion der unterschiedlichen Albuminfraktionen mit der stationären Phase erscheinen diese zu verschiedenen Zeitpunkten am Ende der Säule, wo sie detektiert werden. Bei den Albuminfraktionen erscheint das Humane Mercaptalbumin oder HMA (reduzierte Form) zuerst am Säulenende. Dieses interagiert also nur in geringem Ausmaß mit der Trennsäule. Daraufhin folgt das Humane Non-Mercaptalbumin 1 oder HNA1 (reversibel oxidierte Form) und anschließend das Humane Non-Mercaptalbumin 2 oder HNA2 (nicht reversibel oxidierte Form), welches demnach den höchsten Interaktionsgrad mit der stationären Phase aufweist.

Im Rahmen des Verfahrens gaben wir zu 10 µL einer Plasmaprobe 990 µL Albuminprobenpuffer (0,1 M Natriumphosphat, 0,3 M Natriumchlorid, pH 6,87), sodass eine 1:100 Verdünnung entstand. Anschließend wurde die Probe (1 mL) durch einen Whatman 0,45 µm Nylon-Filter (Bartelt Labor- & Datentechnik, Graz, Österreich) in ein Röhrchen filtriert, das Röhrchen in den Probenbehälter gestellt und dieser wiederum in den Autosampler eingebracht. Nach dem Starten der Analyse durch die EZ Chrome Elite chromatography Software (VWR, Wien, Österreich), wurden 20 µL der Probe über eine Anionenaustauschsäule (Shodex Asahipak ES-502N 7C, 7,5 x 100 mm, Bartelt Labor- & Datentechnik, Graz, Österreich) geleitet. Die mobile Phase setzte sich hierbei aus LM1, welches 50 mmol/L Natriumacetat und 400 mmol/L Natriumsulfat eingestellt auf pH 4,85 enthielt, und LM 2 (LM 1 + 10 % Ethanol (v/v)) zusammen. Die Zusammensetzung der mobilen Phase wurde über den Messzeitraum wie folgt verändert: Vom Startzeitpunkt der Analyse bis zu 5 Minuten wurde lediglich LM 1 eingesetzt. Nach 5 Minuten wurde der Anteil des LM 2 für 20 Minuten linear gesteigert (0-60%) und anschließend wurde der 60%-Anteil des LM 2 für 5 Minuten beibehalten. Die Temperatur der Anionenaustauschsäule betrug während der Chromatographie 35°C. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte bei 280 nm Exzitationswellenlänge und 340 nm Emissionswellenlänge. Die Anteile der Albuminfraktionen wurden durch die EZ Chrome Elite chromatography Software als Peakflächen graphisch dargestellt und prozentuell ermittelt (HMA + HNA1 + HNA2 = 100%).

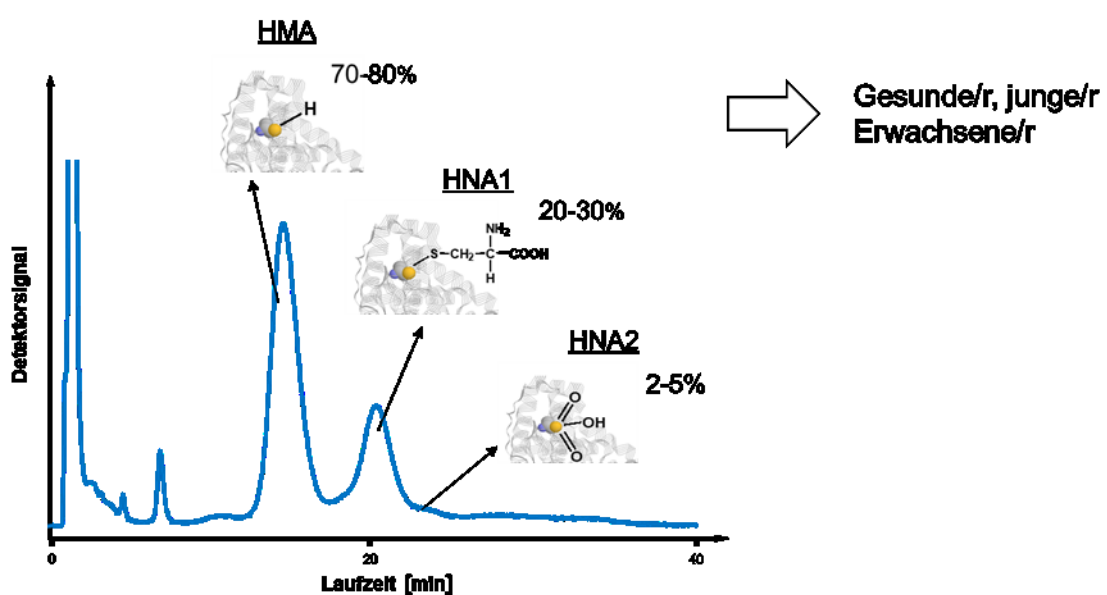


Abb. 6: HPLC-Chromatogramm einer oder eines gesunden, jungen Erwachsenen.

3.6 Präparation der HSA Fraktionen HMA, HNA1 und HNA2

Um eine Reduktion von HNA1, welches im Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat (EDTA) Blut von Probandinnen und Probanden enthalten ist, zu HMA herbeizuführen, wurde die Blutprobe für eine Stunde mit 1 mg/ml N-Acetylcystein (Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) inkubiert. Die Probe, die daraufhin hauptsächlich HMA und nur noch zu geringen Anteilen HNA1 enthielt, leiteten wir im Rahmen einer Affinitätschromatographie über eine HiTrap™ Blue HP-Säule (GE Healthcare, Solingen, Germany). Zuvor wurde die Säule mit 50 mmol/L KH_2PO_4 (pH 7; Puffer A) äquilibriert sowie die Probe im Verhältnis 1:4 mit Puffer A verdünnt. Das Albumin in der Probe band in dieser Zeit an den in der Säule enthaltenen Farbstoff Cibacron Blau, während sonstige Plasmaproteine ausgeschwemmt wurden. Anschließend leiteten wir Puffer B (Puffer A + 1,5 M KCl; pH 7) über die Säule, wodurch das Albumin von der Säule heruntergewaschen und anschließend aufgefangen wurde.

Folgend sammelten wir die Fraktionen und dialysierten sie bei 4°C gegen dH_2O .

Das HMA wurde über eine PD-10 Entsalzungssäule (GE Healthcare) mit dH_2O eluiert.

Um HMA zu HNA1 zu oxidieren wurden die dialysierten Fraktionen bei 37°C für 24 h mit 17 mmol/L Cystin inkubiert. Das restliche Cystin wurde über Nacht („Overnight“, ON) mittels einer PD-10 Entsalzungssäule entfernt.

Die Oxidation zu HNA2 erreichten wir, indem wir die dialysierten Fraktionen bei RT für eine Stunde mit 45 mmol/L H_2O_2 inkubierten. Auch das überschüssige H_2O_2 wurde daraufhin durch den Einsatz einer PD-10 Entsalzungssäule entfernt.

Den Redoxstatus der Fraktionen überprüften wir anschließend durch das HPLC-Verfahren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die präparierten Fraktionen bei -80°C aufbewahrt.

3.7 In-vitro-Komplexierung von HSA mit Palmitinsäure

Zunächst lösten wir fettsäurefreies HSA (A1887, Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) in PBS (20 g/dL). Anschließend filtrierten wir dieses steril und erwärmten es auf 37°C. Natriumpalmitat lösten wir bei 100°C in ddH_2O , sodass die Konzentration der Lösung 2,3 mg/mL oder 4,6 mg/mL betrug. Daraufhin wurde 3 M NaOH zu der

Lösung hinzugefügt. Die Palmitatlösung tropften wir anschließend zur HSA-Lösung hinzu. Die Konzentration des mit Palmitat komplexierten HSA wurde mittels NEFA-Reagenzes (FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH, Neuss, Deutschland) bestimmt und die Lösung nach Sterilfiltrieren und Aliquotieren bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.8 Lösen von Amyloid- β 40/ 42

Zunächst versetzten wir 1 mg Amyloid- β 40/ 42 (rPeptide, Georgia, USA) mit 1 mL 1% NH_4OH . Anschließend wurde die Probe für eine Minute mittels Vibromixer gemischt und für eine weitere Minute im Ultraschallbad beschallt, bis die Lösung frei von Aggregaten und klar war. Die Lösung wurde daraufhin aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.9 Thioflavin T-Fluoreszenz Assay zur Detektion amyloider Fibrillen (ThT-Assay)

Bei Thioflavin T handelt es sich um einen Farbstoff, von dem, gebunden an Amyloid- β -Fibrillen, ein Fluoreszenzsignal ausgeht. Die Intensität des Signals kann detektiert werden und ist von der Menge der vorhandenen Amyloid-Fibrillen abhängig (26). Oligomer vorliegendes Amyloid- β wird nur in sehr geringem Ausmaß durch ThT markiert. Daher können mittels dieser Methode Amyloid-Fibrillen nachgewiesen und quantifiziert werden (27). Durch die Anwesenheit von Albumin wird der Prozess der Fibrillenbildung unterbunden (5). Anhand dieser Methode kann festgestellt werden, ob die verschiedenen Fraktionen (HSA, HMA, HNA1, HNA2) die Fibrillenbildung von A β 40 bzw. A β 42 in unterschiedlichem Maße beeinflussen. Indirekt kann dadurch beurteilt werden, inwiefern ein Unterschied in der Bindung von Amyloid- β 40 und 42 an die verschiedenen Albuminfraktionen besteht.

Wir lösten jeweils 1 mg/ml A β 40 bzw. A β 42 (rPeptide) in 1% NH_4OH entsprechend der oben beschriebenen Methode. Anschließend überführten wir jeweils 25 μL 10 μM A β 40 bzw. 10 μM A β 42 sowie 50 μM HSA, HMA, HNA1, HNA2 und 10 μM Thioflavin T (Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) in 20 mM HEPES-Puffer (150 mM NaCl, pH 7,4) in die Kavitäten einer 384-Well Platte (Grainer, Kremsmünster, Österreich). Weiters transferierten wir jeweils 25 μL 10 μM A β 40 bzw. A β 42 mit 10 μM Thioflavin T ebenfalls mit HEPES-Puffer in die Kavitäten derselben Platte.

Hierzu fügten wir die Albuminfraktionen HSA, HMA, HNA1, HNA2 (50 μM) jeweils nach 24 h hinzu. Die Fluoreszenzmessung erfolgte alle 2 Stunden in einem Gesamtmesszeitraum von 70 Stunden mittels des CLARIOstar Plus Plate Reader bei 490 nm und RT.

3.10 „Quenching“ der Eigenfluoreszenz von Albumin

Die Eigenfluoreszenz des Albumins wird durch die Bindung von Liganden, wie zum Beispiel durch Amyloid- β , vermindert, also „gequencht“. Anhand der Stärke des „Quenching“-Effekts, welcher durch den jeweiligen Liganden verursacht wird, lässt sich die Bindung des Liganden an Albumin quantifizieren (9).

Wir inkubierten die Albuminfraktionen HSA, HMA, HNA1 und HNA2 (30 μM) zusammen mit A β 40 bzw. A β 42 (30 μM), die Albuminfraktionen jeweils ohne A β und auch A β (30 μM) ohne Albumin bei 37°C und 1000 rpm über 24 h innerhalb eines thermostatisierbaren Schüttlers. Als Puffer verwendeten wir 20 mM HEPES-Puffer. Anschließend überführten wir jeweils 25 μL in die Kavitäten einer 384-Well Platte. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mittels CLARIOstar Plus Plate Reader bei einer Exzitationswellenlänge von 280 nm. Das erfasste Emissionsspektrum reichte von 335 nm bis 407 nm.

3.11 Western Blot

Die Albuminfraktionen HSA, HMA, HNA1 und HNA2 (30 μM) wurden ON bei 37°C mit 30 μM A β 40 bzw. A β 42 während schwachen Schüttelns inkubiert. Anschließend wurden die Proben unter nativen Bedingungen anhand eines 5-15%igen Acrylamidgels (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) aufgetrennt und während einer Zeitspanne von einer Stunde und 45 Minuten auf eine Nitrozellulose Membran (Amersham-Bioscience, Freiburg, Deutschland) übertragen. Die Membran blockten wir daraufhin für zwei Stunden mit 5% I-Block. Nach Zugabe des primären anti- β -Amyloid Antikörpers (BioLegend, San Diego, CA, USA), welcher zuvor im Verhältnis 1:1000 in 5% I-Block in TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) gelöst worden war, wurde die Membran ON bei 4°C inkubiert. Anschließend wuschen wir die Membran dreimalig für je 10 Minuten mit TBS-T (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 + 0,05% Tween 20) und gaben den sekundären Antikörper („Goat anti-Mouse“, Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) zu, welcher ebenfalls

zuvor in 5% I-Block in TBS verdünnt worden war (1:5000). Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei RT wurde die Membran erneut dreifach mit TBS-T gewaschen und das Clarity Western ECL Substrat (Bio-Rad, Wien, Österreich) hinzugefügt. Anhand des Molecular Imager ChemiDoc™ XRS Systems (Bio-Rad) visualisierten wir anschließend A β 40 bzw. A β 42. Als Molekulargewichtsstandard diente uns die PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA).

3.12 ELISA

Basierend auf der Publikation „Endogenous Proteins Controlling Amyloid β -Peptide Polymerization“ von Bernd Bohrmann et al. (1999) entschieden wir uns dazu die Bindung zwischen den Albuminfraktionen und Amyloid- β 40 und 42 mit Hilfe eines ELISA zu quantifizieren (5).

Wir verwendeten 96-Well-Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark), die wir mit jeweils 100 μ L 2,5 μ M A β 40/ 42 (rPeptide, Georgia, USA) in TBS (+NaN₃; 0,01% (w/v)) coateten. Die Platten inkubierten wir anschließend für 48 h bei 37°C und 400 rpm innerhalb eines thermostatisierbaren Schüttlers. Wir lagerten die einzelnen Streifen bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C. Die Platte wurde weiterhin mit 1% I-Block, gelöst in PBS-T (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4 + 0,05% Tween 20), geblockt und dann bei Raumtemperatur (RT) für 2 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte einmal mit 200 μ L PBS-T gewaschen. Daraufhin wurden jeweils 100 μ L der Albuminfraktionen HSA, HMA, HNA1, HNA2 in Konzentrationen zwischen 5 und 20 μ M aufgetragen und über Nacht bei 37°C und 400 rpm ebenfalls innerhalb eines thermostatisierbaren Schüttlers inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit PBS-T gewaschen und jeweils 50 μ L des monoklonalen Detektor-Antikörpers (Abcam, Cambridge, UK), der zuvor im Verhältnis 1:500 in 1% I-Block verdünnt wurde, auf die Platte gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei RT wurde die Platte erneut dreimal gewaschen und daraufhin jeweils 50 μ L einer 0,05 μ g/mL Verdünnung einer HRP-Streptavidin-Lösung (Abcam, Cambridge, UK) in PBS-T hinzugefügt. Es folgte eine Inkubationszeit von einer Stunde bei RT und 400 rpm. Anschließend wurde die Platte erneut dreimal mit PBS-T gewaschen und jeweils 100 μ L TMB-Substrat (Abcam, Cambridge, UK) aufgetragen. Nach 30 Minuten bei RT wurden 100 μ L

einer Stop-Lösung (Abcam, Cambridge, UK) hinzugefügt. Die Messung der Extinktion erfolgte mittels Plattenphotometer bei 650 nm.

Im weiteren Verlauf wurden die oben genannten ELISA-Bedingungen Schritt für Schritt optimiert.

Im ersten Optimierungsversuch coateten wir einige Streifen mit A β 42 gemäß der beschriebenen Vorgehensweise, die wir bis zur weiteren Verwendung bei -20°C einfroren. Hiernach wurden die Streifen mit 1% I-Block, gelöst in PBS-T, jeweils für 2 Stunden gegenüber für 4 Stunden bei RT geblockt. Anfänglich trugen wir allerdings ausschließlich HSA-Proben von gesunden Spenderinnen und Spendern in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M und 40 μ M, jeweils in Doppelbestimmung, auf. Als nächstes setzten wir das HRP-Streptavidin in verschiedenen Verdünnungen (1:2000 vs. 1:1000 in PBS-T) ein. Die Streifen wurden entsprechend dem Ergebnis des ersten Teilversuchs jeweils 4 Stunden mit 1% I-Block geblockt. Im nächsten Schritt erhöhten wir das Volumen des Detektor-Antikörpers. Es wurden jeweils 50 μ L gegenüber 100 μ L desselben auf verschiedene Streifen aufgetragen. Bei den Folgeversuchen setzten wir 50 μ L des Detektor-Antikörpers ein. Weiters erhöhten wir die HSA-Proben-Konzentration von gesunden Spenderinnen und Spendern auf bis zu 80 μ M. Zudem veränderten wir erneut die eingesetzten Konzentrationen des HRP-Streptavidins (1:500 vs. 1:1000 verdünnt in PBS-T). Wir behielten schließlich die 1:500-Verdünnung bei.

Schließlich ersetzten wir den monoklonalen Antikörper durch einen polyklonalen Detektor-Antikörper (Abcam, Cambridge, UK), um eine Amplifikation des Signals zu erreichen. Wir konnten die Verdünnung desselben von 1:1000 auf 1:2000 in 1% I-Block anpassen. Auch die Verdünnung des HRP-Streptavidins wurde auf 1:2000 in PBS-T erhöht.

Weiters erniedrigten wir die eingesetzten Albuminkonzentrationen auf 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 4 μ M, 8 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M.

Zusammengefasst erreichten wir die optimalen Bedingungen für den ELISA-Versuch in unserem Labor mittels folgender Durchführung.

Wir coateten die 96-Well-Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) mit jeweils 100 μ L 2,5 μ M A β 40/ 42 (rPeptide, Georgia, USA) in TBS (+NaN₃; 0,01% (v/w)). Anschließend

inkubierten wir die Platten bei 37°C und 400 rpm über 24 h auf einer beheizbaren Schüttelplatte. Des Weiteren blockten wir die Platte mit 1% I-Block gelöst in PBS-T und inkubierten diese bei RT für 4 Stunden. Nach einmaligem Waschen der Platte mit PBS-T trugen wir jeweils 100 µL der Albuminfraktionen HSA, HMA, HNA1, HNA2 in den Konzentrationen 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 4 µM auf und inkubierten diese über Nacht bei 37°C und 400 rpm ebenfalls mittels beheizbaren Schüttlers. Im nächsten Schritt wuschen wir die Platte dreimal mit PBS-T und trugen jeweils 50 µL des polyklonalen Detektor-Antikörpers (Abcam, Cambridge, UK), im Verhältnis 1:2000 in 1% I-Block verdünnt, auf die Platte auf. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei RT wurde die Platte erneut dreimal gewaschen und daraufhin jeweils 50 µL HRP-Streptavidin (Abcam) 1:2000 verdünnt in PBS-T hinzugefügt. Die folgende Inkubationszeit betrug eine Stunde bei RT und 400 rpm. Nach erneutem, dreimaligem Waschen gaben wir das TMB-Substrat (Abcam) auf die Platte und inkubierten diese wiederum im Dunkeln bei RT und 400 rpm. Abhängig von der festgestellten Farbentwicklung stoppten wir die Reaktion mittels Stop-Lösung (Abcam), spätestens jedoch nach 30 Minuten und maßen anschließend die Extinktion mittels Plattenphotometer bei 650 nm.

Um verschiedene, nicht zeitgleich durchgeführte ELISA-Versuche vergleichbar machen zu können, verwendeten wir die Extinktionswerte des mit Humanem Serum Albumin (Standardalbumin, 0,5 µM) einer gesunden Spenderin durchgeführten ELISA und standardisierten anhand dessen die von uns gemessenen Extinktionen verschiedener Spenderinnen und Spender.

3.13 Jmol

Die Abbildungen der Proteine wurden anhand der aus der Proteindatenbank („Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank“, RCSB PDB) entnommenen Muster unter Verwendung des Programms „Jmol“ erstellt.

3.14 Statistische Auswertung

Alle Variablen wurden anhand des Mittelwerts und der Standardabweichung oder des Medians und der Interquartilsabstände bzw. der Ränge deskriptiv analysiert. Um mehr als zwei, nicht unabhängige Gruppen zu vergleichen, wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Messwiederholung („one-way repeated measures

ANOVA“) gefolgt von einem Dunnett’s-Test durchgeführt. Handelte es sich um nicht normalverteilte Daten, wurde ein Friedmann-Test mit anschließendem Dunn’s-Test performt. Mittels Korrelationsanalyse und linearer Regression überprüften wir den Zusammenhang zwischen verschiedenen Variablen. Die Ergebnisse der „Quenching“-Versuche werteten wir anhand der Mittelwerte der Flächen unter den Kurven („Area under the curve“, AUC) und der anschließenden Berechnung der Fläche zwischen den Kurven („Area between the curves“, ABC) aus. Als statistisch signifikant bezeichneten wir die Analyseergebnisse ab einem p-Wert $<0,05$. Zur Speicherung und statistischen Auswertung der Daten sowie zum Erstellen der Graphen wurden die Programme Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) und GraphPad Prism Version 5 und Version 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Thioflavin T-Assay

Im Rahmen der Methodenetablierung gaben wir zunächst lediglich das ThT in verschiedenen Konzentrationen (5 μM , 10 μM , 20 μM) zu Amyloid- β 40/ 42 (10 μM , 20 μM , 30 μM), um ohne die Anwesenheit von Albumin beurteilen zu können bei welchen Konzentrationen sich die günstigsten Bedingungen für den Versuch einstellen. Die Inkubationszeit betrug 24 h bei 37°C. Die Ergebnisse der Messung mittels ClarioStar Plus Plate Reader sind in Abbildung 7 dargestellt (s. Abb. 7).

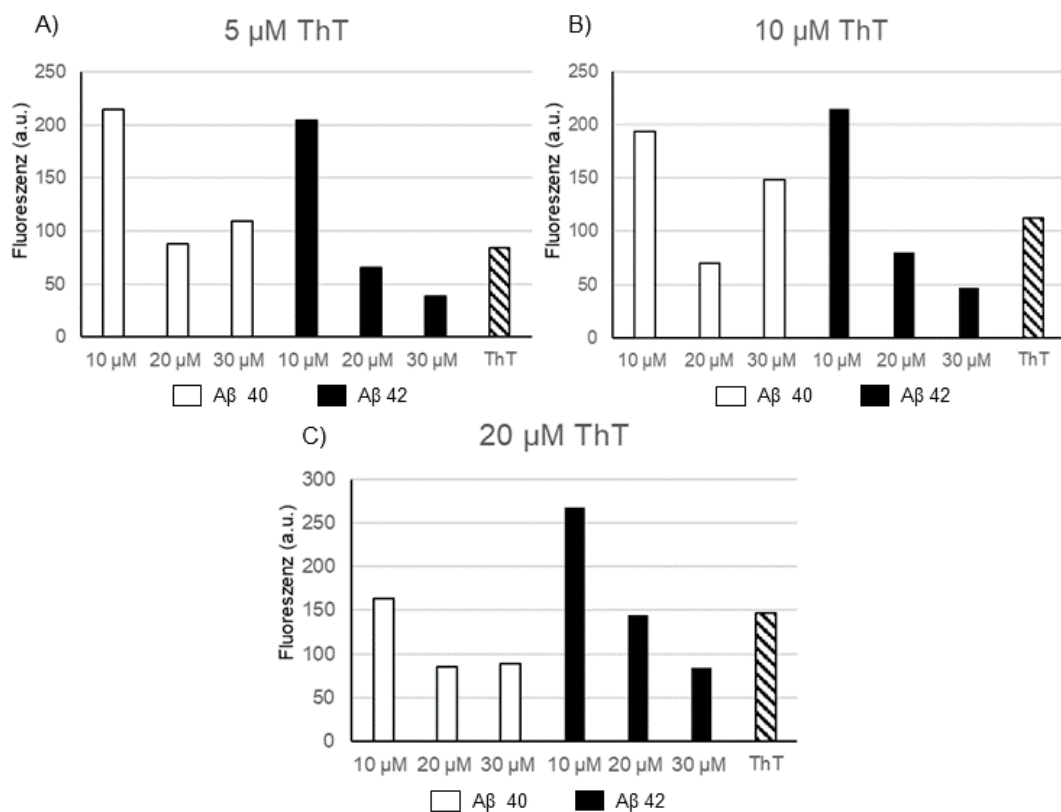


Abb. 7: Fluoreszenzsignal von ThT bei unterschiedlichen Amyloid- β Konzentrationen. ThT-Assay mit Amyloid- β 40 und Amyloid- β 42 in den Konzentrationen 10 μM , 20 μM und 30 μM , versetzt mit jeweils 5 μM (A), 10 μM (B) oder 20 μM (C) ThT. Die einzelnen ThT-Konzentrationen wurden auch ohne Zugabe von Amyloid- β untersucht. 384-Well Platte, Doppelbestimmung.

Bei Einsatz von 10 μM Amyloid- β ließ sich die stärkste Fluoreszenzintensität detektieren (26). Diese war im Vergleich zur Eigenfluoreszenz des ThT deutlich erhöht. Wir stellten dies unabhängig davon fest, ob es sich um A β 40 oder A β 42 handelte. Die Konzentration des eingesetzten ThT hatte keinen Einfluss auf die Stärke der Fluoreszenz, weshalb wir in Folgeversuchen die in der Publikation „Thioflavin as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation“ von Xue et al. (2017) empfohlene ThT-Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$ einsetzten (26).

Bei höheren A β -Konzentrationen lagen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten nicht über der Eigenfluoreszenz von ThT.

Um zu untersuchen ob und inwieweit die Anwesenheit der verschiedenen Albuminfraktionen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Fibrillenbildung hat, führten wir den ThT-Assay in Anwesenheit von HSA, HMA, HNA1, HNA2 durch. Im ersten Versuchsaufbau war Albumin von Beginn an dabei, beim zweiten wurde das Albumin erst nach 24 h hinzugefügt, um hier zunächst eine potenzielle Bildung von A β -Oligomeren zu ermöglichen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte alle 2 Stunden in einem Gesamtzeitraum von 92 h bei 490 nm.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 8 dargestellt (s. Abb. 8).

Von den Albuminfraktionen HSA, HMA, HNA1 und HNA2 ging in Abwesenheit von Amyloid- β über den gesamten Messzeitraum ein annähernd gleichbleibendes Fluoreszenzsignal aus (Abb. 8 A-D, schwarze, durchgezogene Linie).

Wurden die verschiedenen Albuminfraktionen zusammen mit A β 40 oder A β 42 von Beginn an inkubiert, zeigte sich jeweils am Anfang der Messung ein hohes Fluoreszenzsignal, welches über den Messzeitraum abnahm (Abb. 8, A-D, schwarze, gestrichelte bzw. gepunktete Linie). Das Fluoreszenzsignal des HNA1 allein und zusammen mit A β 40/ 42 fiel hierbei etwas höher aus als das der übrigen Albuminfraktionen.

Wurden die Albuminfraktionen erst nach 24 h hinzugegeben, stieg das Fluoreszenzsignal an diesem Zeitpunkt stark an (Abb. 8, E-H). Nach einem anfänglichen Maximum fiel das Signal nach einigen Stunden ab und blieb für die restliche Zeit auf annähernd gleichem Niveau. Nach circa 70 h kam es zu einem

Anstieg der Eigenfluoreszenz des Albumins. Auch hier fiel die Intensität des Fluoreszenzsignals des HNA1 ohne und mit A β 40/ 42 etwas höher aus als die der anderen Albuminfraktionen.

Wir konnten über den Messzeitraum von 92 h für A β 40 und A β 42 keine Intensivierung des Fluoreszenzsignals feststellen, das heißt es ist davon auszugehen, dass über den gesamten Zeitraum keine Fibrillenbildung stattfand.

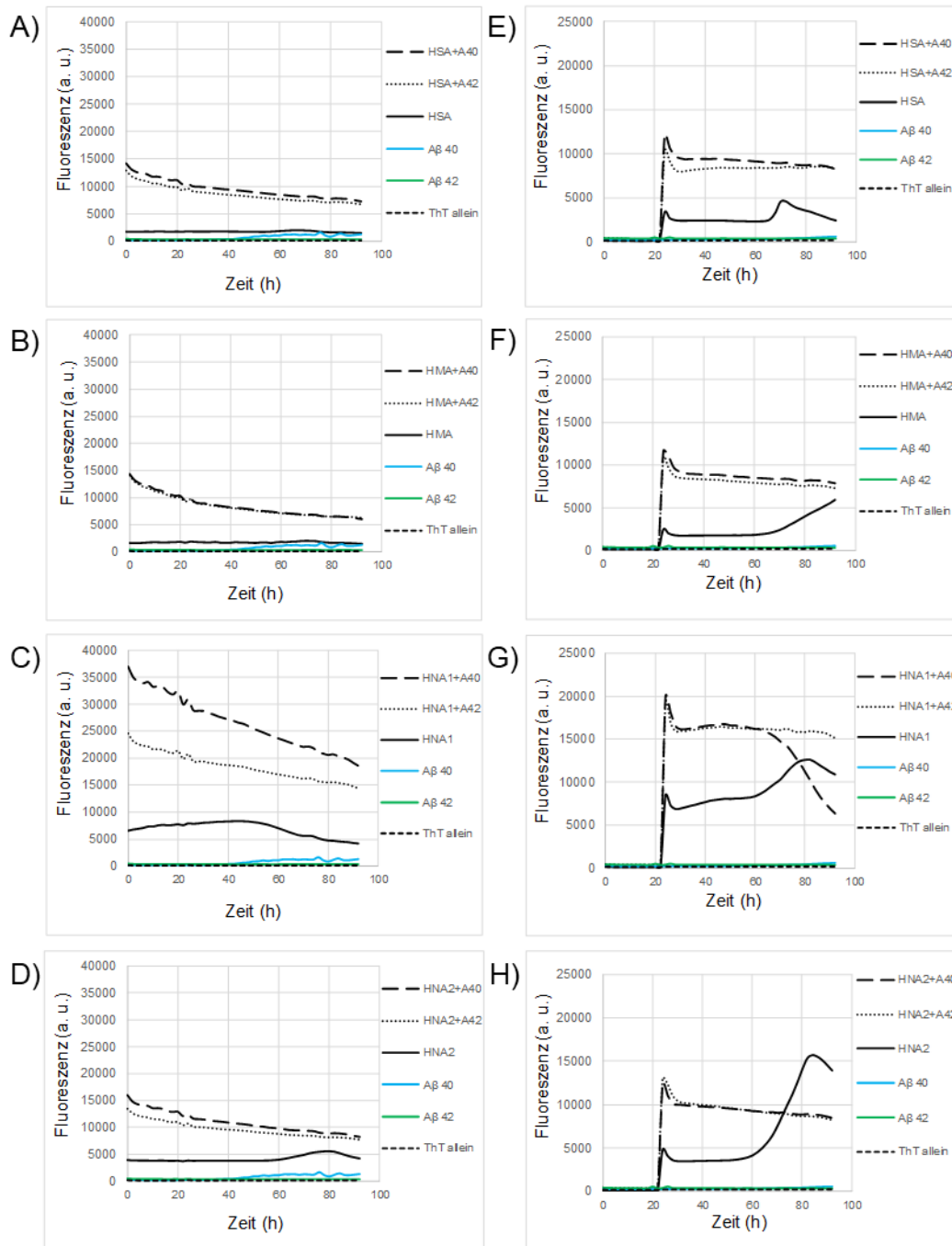


Abb. 8: Einfluss der Albuminfraktionen auf die ThT-Fluoreszenz abhängig von der Amyloid- β -Fibrillenbildung. Die Albuminfraktionen wurden von Beginn an (HSA (A), HMA (B), HNA1 (C), HNA2 (D)) bzw. nach 24 Stunden (HSA (E), HMA (F), HNA1 (G), HNA2 (H)) hinzugefügt, 96 Well Platte.

4.2 „Quenching“ der Eigenfluoreszenz von Albumin

Um den fluoreszenzauslöschenden Effekt der Amyloid- β Peptide A β 40 bzw. A β 42 auf die Eigenfluoreszenz der Albuminfraktionen zu untersuchen, inkubierten wir HSA, HMA, HNA1 und HNA2 zusammen mit A β 40 bzw. A β 42. Außerdem inkubierten wir die Albuminfraktionen jeweils ohne A β sowie A β ohne Albumin bei 37°C und 1000 rpm über 24 h. Wir überführten die Proben auf eine 384-Well Platte und maßen das Fluoreszenzspektrum von 335-370 nm.

Zunächst führten wir den Versuch an sechs aufeinanderfolgenden Tagen mit dem Albumin unterschiedlicher gesunder Spenderinnen und Spender durch. Anschließend wiederholten wir den Versuch, allerdings diesmal an einem Tag, sodass insgesamt 12 Albuminproben gesunder Spenderinnen und Spender untersucht wurden. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abb. 9 dargestellt (s. Abb. 9, A).

Anschließend berechneten wir zunächst die Fläche unter der Kurve („Area under the curve“, AUC) der Eigenfluoreszenzen der Albuminfraktionen in Abwesenheit von A β und verglichen diese untereinander mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung und folgendem Dunnett's-Test. Hierbei stellten wir keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Eigenfluoreszenzen der Albuminfraktionen fest.

Daraufhin berechneten wir die Differenzen der AUCs der Albuminfraktionen ohne bzw. mit A β 40/ A β 42 und quantifizierten anhand der Fläche zwischen den Kurven („Area between the curves“, ABC) den Quenching-Effekt von A β 40 bzw. 42 auf die einzelnen Albuminfraktionen (s. Abb. 9, B).

Wir stellten hierbei fest, dass sowohl A β 40 als auch A β 42 einen fluoreszenzauslöschenden Effekt auf alle vier Albuminfraktionen ausübten. Wir werteten die Ergebnisse anhand einfaktorieller Varianzanalyse mit

Messwiederholung und anschließend Dunnett's-Test aus und fanden einen signifikanten Unterschied zwischen den Fraktionen HMA und HNA2 im Versuch mit A β 42 (s. Abb. 9, B). Die Eigenfluoreszenz der Albuminfraktion HNA2 wurde durch A β 42 signifikant stärker „gequench“ als die der Albuminfraktion HMA (**, $p < 0,01$).

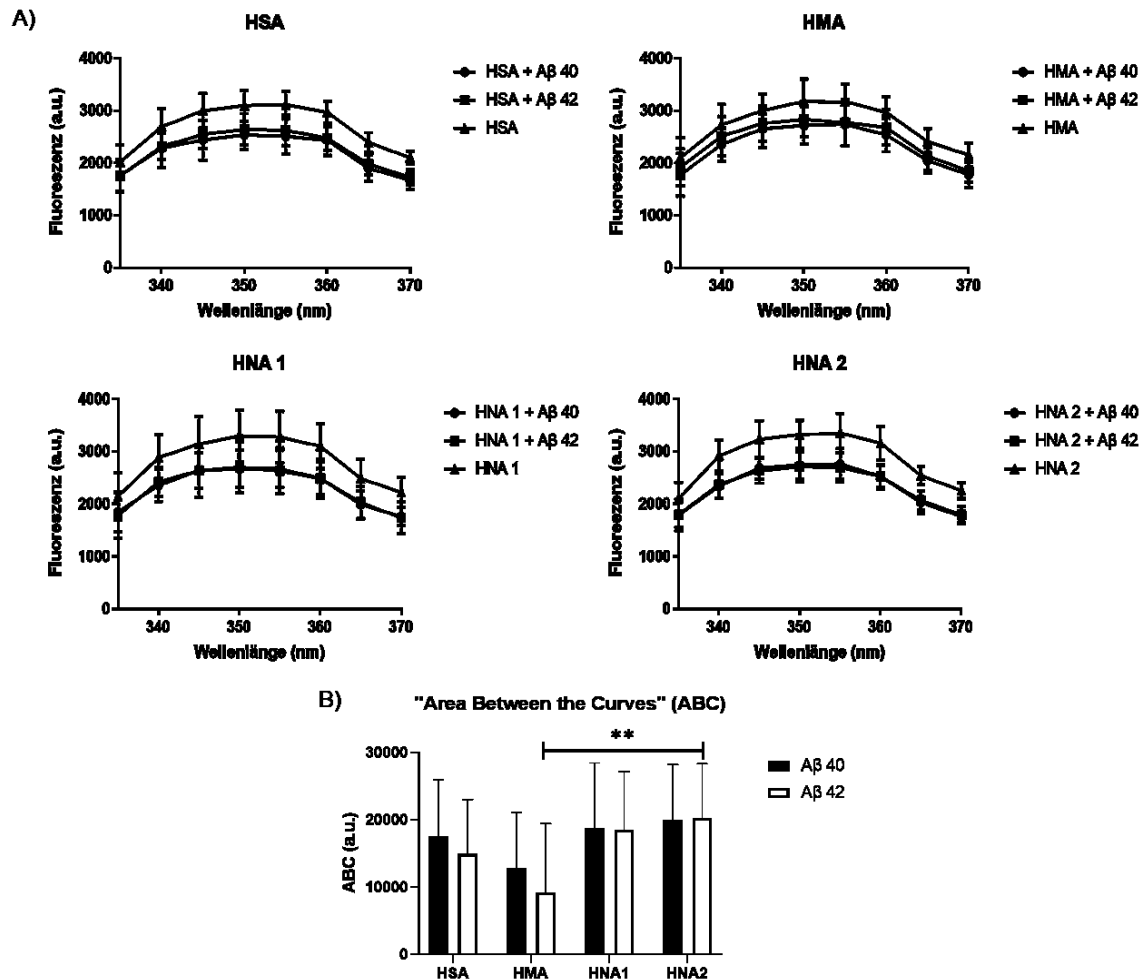


Abb. 9: A) „Quenching“ der Eigenfluoreszenz der verschiedenen Albuminfraktionen (HSA, HMA, HNA1, HNA2). Der Versuch wurde anhand der Albuminfraktionen zwölf gesunder Spenderinnen und Spender ($n=12$) mittels CLARIOstar Plus Plate Reader durchgeführt. Exzitationswellenlänge 290 nm, Emissionsspektrum 335-370 nm. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung. B) Quantifizierung des „Quenching“-Effekts von A β 40 bzw. A β 42 auf die Eigenfluoreszenz der Albuminfraktionen ($n=12$). Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung der Flächen zwischen den Kurven (ABCs). Berechnet wurden diese anhand der Differenz der Flächen unter den Kurven aus Abb. 9, A. **, $p < 0,01$.

Um die Ergebnisse zu bestätigen, führten wir den beschriebenen Versuch erneut durch. Wir verwendeten die Albuminfraktionen vier weiterer, gesunder Spenderinnen und Spender. Diese wurden während der Präparation mehrfach sterilfiltriert, um potenzielle Endotoxinverunreinigungen zu vermeiden. In Abb. 10 sind die Ergebnisse dieses Versuchs graphisch dargestellt (s. Abb. 10, A).

Bei Einsatz der endotoxinarmen Albuminfraktionen, ließ sich anhand der Berechnung der ABCs kein signifikanter Unterschied des „Quenching“-Effekts von A β 40 bzw. A β 42 auf die vier Albuminfraktionen feststellen, allerdings umfasste dieser Versuch eine geringere Stichprobengröße (s. Abb. 10, B). Auch die zuvor festgestellten Unterschiede der Eigenfluoreszenz der Albuminfraktionen HSA und HNA2 in Abwesenheit von A β ließen sich nicht durch den Versuch mit den endotoxinarmen Albuminfraktionen bestätigen.

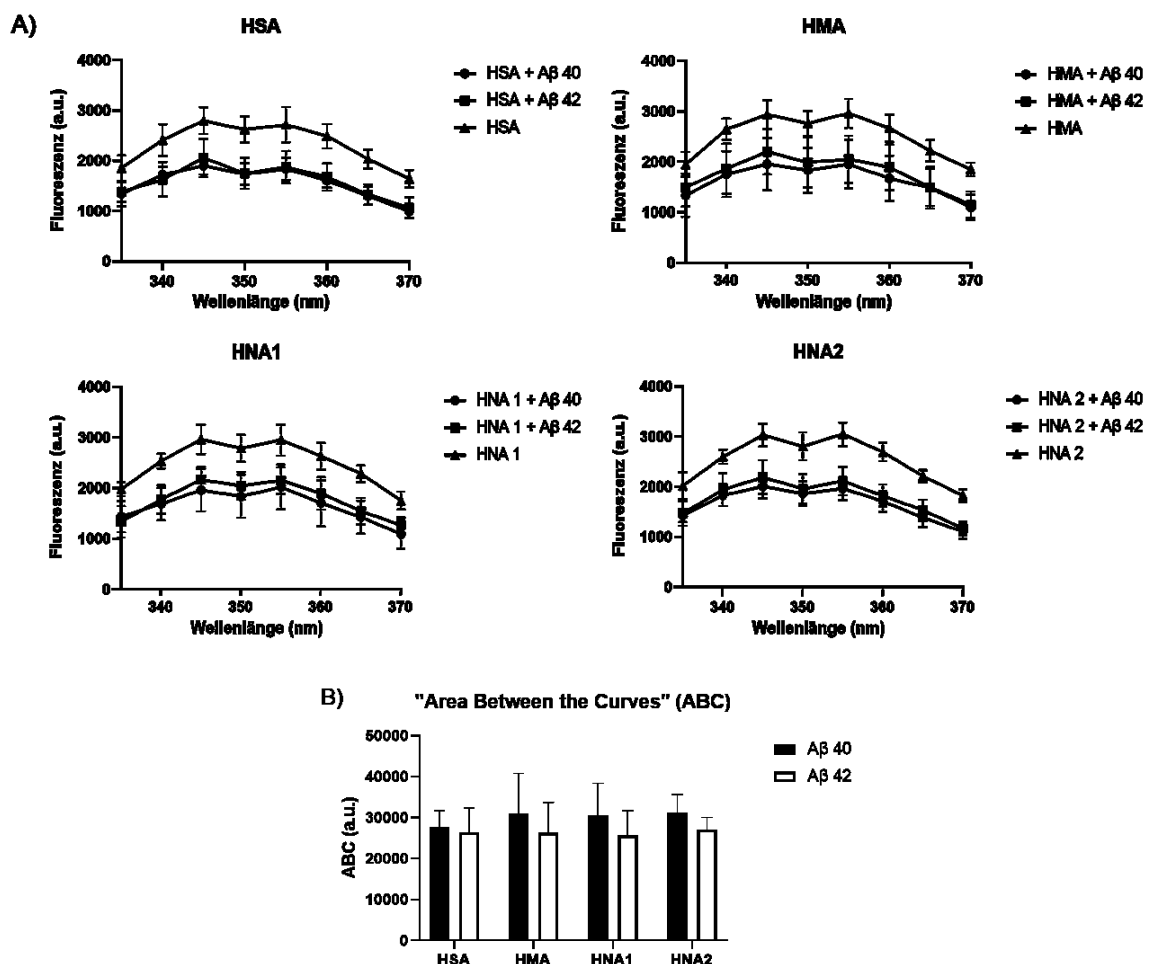


Abb. 10: A) „Quenching“ der Eigenfluoreszenz der verschiedenen Albuminfraktionen mit geringem Endotoxingehalt (HSA, HMA, HNA1, HNA2). Der

Versuch wurde anhand der Albuminfraktionen vier gesunder Spenderinnen und Spender (n=4) mittels CLARIOstar Plus Plate Reader durchgeführt. Exzitationswellenlänge 290 nm, Emissionsspektrum 335-370 nm. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung. B) Quantifizierung des „Quenching“-Effekts von A β 40 bzw. A β 42 auf die Eigenfluoreszenz endotoxinarmer Albuminfraktionen (n=4). Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung der Flächen zwischen den Kurven (ABCs). Berechnet wurden diese anhand der Differenz der Flächen unter den Kurven aus Abb. 10, A.

4.2.1 „Quenching“ der Eigenfluoreszenz von Albumin in Anwesenheit von Fettsäuren

Wie aus verschiedenen Publikationen hervorgeht, verlieren Albuminmoleküle, an welche Fettsäuren gebunden sind, ihren A β -bindenden und damit wahrscheinlich neuroprotektiven Effekt (8, 22). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass abhängig von der Menge der am Albumin gebundenen Fettsäuren auch der fluoreszenzsauschende Effekt des A β ausbleibt, da dieses in geringerem Ausmaß an Albumin binden kann.

Um dies genauer zu untersuchen, führten wir den „Quenching“-Versuch anschließend mit kommerziellem Albumin (KA), an welches keine Fettsäuren gebunden waren, mit mit Fettsäuren beladenem KA (2,7 mol Fettsäuren/ mol Albumin) und mit stark mit Fettsäuren beladenem KA (4,7 mol/mol), jeweils inkubiert mit A β 40 oder A β 42, durch (s. Abb. 11, A, B, C).

Auch im Zuge dieses Versuchs ermittelten wir die ABC, um den „Quenching“-Effekt des A β auf das Albumin zu quantifizieren (s. Abb. 11, D). Hier zeigte sich der Trend, dass der fluoreszenzsauschende Effekt des A β 40 und A β 42 auf das KA in Abwesenheit der Fettsäuren intensiver ausfiel als in deren Anwesenheit. Durch A β 40 wurde die Eigenfluoreszenz des Albumins in Abwesenheit der Fettsäuren am stärksten gequenchet, der Effekt nahm allerdings mit zunehmender Menge an Fettsäuren ab. Der fluoreszenzsauschende Effekt von A β 42 fiel verglichen mit A β 40 insgesamt geringer aus. Hier stellten wir zudem einen geringeren „Quenching“-Effekt des A β 42 auf Albumin ohne Fettsäuren als auf Albumin beladen mit

Fettsäuren (2,7 mol/mol) fest. Der fluoreszenzauslöschende Effekt des A β 40 auf das stark mit Fettsäuren beladene Albumin (4,7 mol/mol) blieb nahezu vollständig aus, während die von uns ermittelte AUC des stark fettsäurebeladenen Albumins mit A β 42 sogar größer ausfiel als die des stark fettsäurebeladenen Albumins ohne A β 42, sodass wir für die ABC einen negativen Wert erhielten.

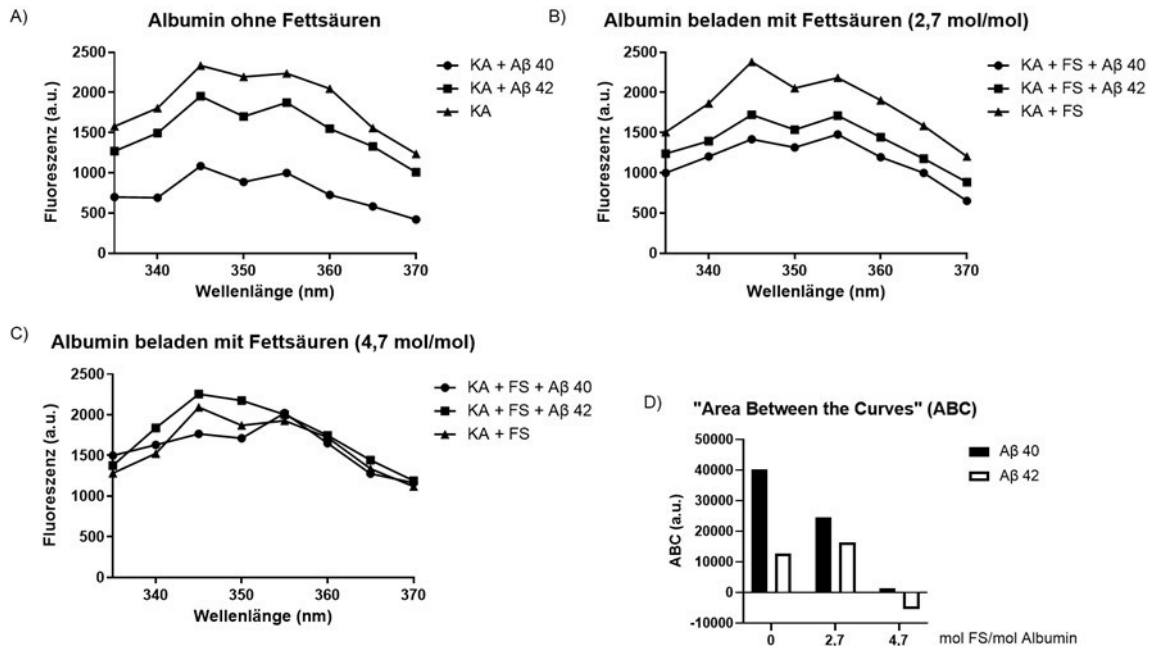


Abb. 11: A-C) „Quenching“ der Eigenfluoreszenz von KA durch Amyloid- β 40 und 42 in Abwesenheit (A) und Anwesenheit gebundener Fettsäuren (2,7 mol/mol (B) und 4,7 mol/mol (C)). Gemessen mittels CLARIOstar Plus Plate Reader. Exzitationswellenlänge 280 nm, Emissionsspektrum 335-370 nm. D) Quantifizierung des „Quenching“-Effekts von A β 40 bzw. A β 42 auf die Eigenfluoreszenz von Albumin ohne (KA) und beladen mit Fettsäuren. Dargestellt sind die ABCs berechnet anhand der Differenzen der AUCs aus Abb. 11, A-C.

4.3 Western Blot

Mittels Western Blot untersuchten wir die Bindung von A β 42 an die Albuminfraktionen HMA, HNA1 und HNA2 dreier gesunder Spenderinnen und Spender (n=3). Die Ergebnisse des Western Blots sind in Abb. 12 dargestellt (s. Abb. 12). In der Abbildung sind hauptsächlich zwei Proteinbanden (35 kDa und ca. 60 kDa) erkennbar. Die untere Bande (35 kDa) zeigt oligomer vorliegendes A β 42,

welches nicht an die Albuminfraktionen band. Die obere Proteinbande (ca. 60 kDa) repräsentiert A β 42, welches in unterschiedlichem Ausmaß mit den Albuminfraktionen interagiert. Betrachtet man die Albuminfraktionen der Spenderin oder des Spenders A, so band A β 42 in ausgeprägter Form an HMA sowie HNA2, erkennbar an den hier sehr deutlich sichtbaren Proteinbanden. Die Interaktion zwischen A β 42 und HNA1 fiel demgegenüber viel geringer aus. Diese Ergebnisse ließen sich allerdings anhand der Albuminfraktionen von Spenderin oder Spender B und C nicht bestätigen. Hier interagiert A β 42 jeweils sehr ausgeprägt mit den Albuminfraktionen HMA und HNA1, während die Interaktion mit der Albuminfraktion HNA2 in geringerem Ausmaß stattfand.

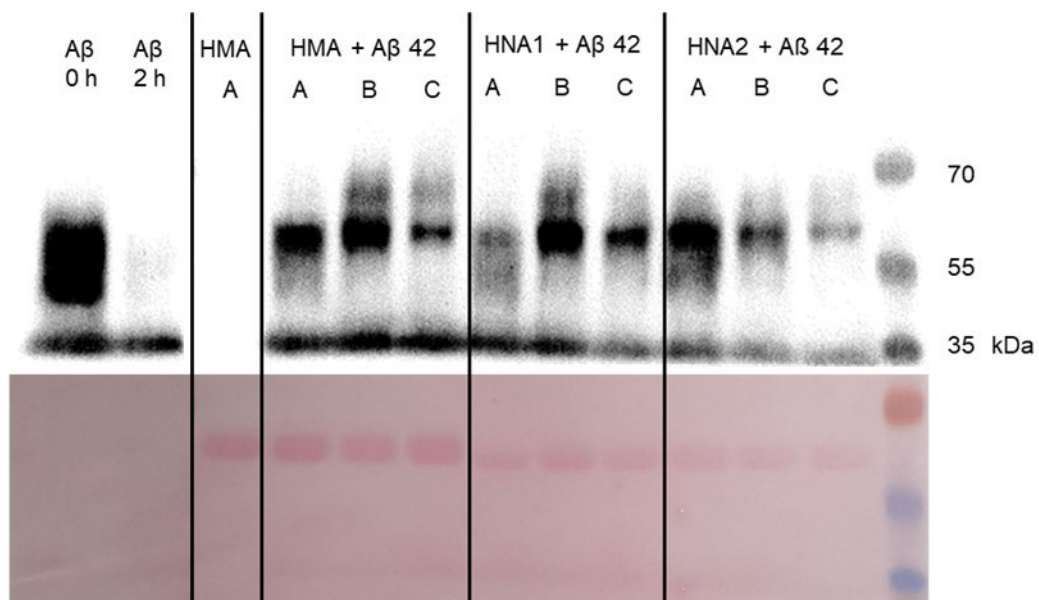


Abb. 12: Bindung von A β 42 an die Albuminfraktionen HMA, HNA1, HNA2 untersucht mittels Western Blot. Der obere Abschnitt zeigt die Interaktion zwischen A β 42 und den Albuminfraktionen HMA, HNA1, HNA2 dreier gesunder Spenderinnen und Spender gekennzeichnet mit A, B und C. Im unteren Abschnitt des Bildes wurde die Proteinübertragung auf die Nitrozellulose Membran anhand einer Ponceaufärbung überprüft. Als Kontrollen wurden A β 42 allein, jeweils ohne und nach 2 h Inkubation sowie das HMA der Spenderin oder des Spenders A eingesetzt. Die Visualisierung erfolgte anhand des Molecular Imager ChemiDoc™ XRS Systems. Die Belichtungszeit betrug 180 Sekunden.

4.4 Interaktion von Albumin und A β

Basierend auf der ELISA-Methode, die wir einer Publikation von Bohrmann et al. (1999) entnahmen, etablierten wir den Enzym-vermittelten Immunadsorptionstest in unserem Labor (5). Wie bereits oben beschrieben, können anhand dieses Tests Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen und -speziell in unserem Fall- die Bindung von A β 40/ A β 42 an Albumin quantifiziert werden.

Da wir anhand der Vorgehensweise in der publizierten Methode keine plausiblen ELISA-Ergebnisse erhielten, modifizierten wir verschiedene Teilschritte innerhalb des Versuchs. Um Material zu sparen, beschichteten wir hierfür einzelne Streifen einer 96-Well-Platte vorerst nur mit Amyloid- β 42. Zunächst blockten wir die beschichteten Streifen für jeweils zwei im Vergleich zu vier Stunden mit 1% I-Block bei RT. Hierbei zeigte sich deutlich, dass die Extinktion nach einer „Blocking“-Zeit von vier Stunden höher ausfiel als nach einer „Blocking“-Zeit von nur zwei Stunden (s. Abb. 13, A). Der Einsatz einer 1:500 Verdünnung des HRP-Streptavidins zeigte sich hinsichtlich der gemessenen Extinktionen gegenüber einer 1:1000 Verdünnung überlegen (s. Abb. 13, B). Eine Erhöhung des Volumens an monoklonalem Detektor-Antikörper auf 100 μ L hatte keinen Einfluss auf die Höhe des Extinktionssignals (s. Abb. 13, C). Die Ergebnisse der veränderten Teilschritte sind in Abb. 13 graphisch dargestellt (s. Abb. 13).

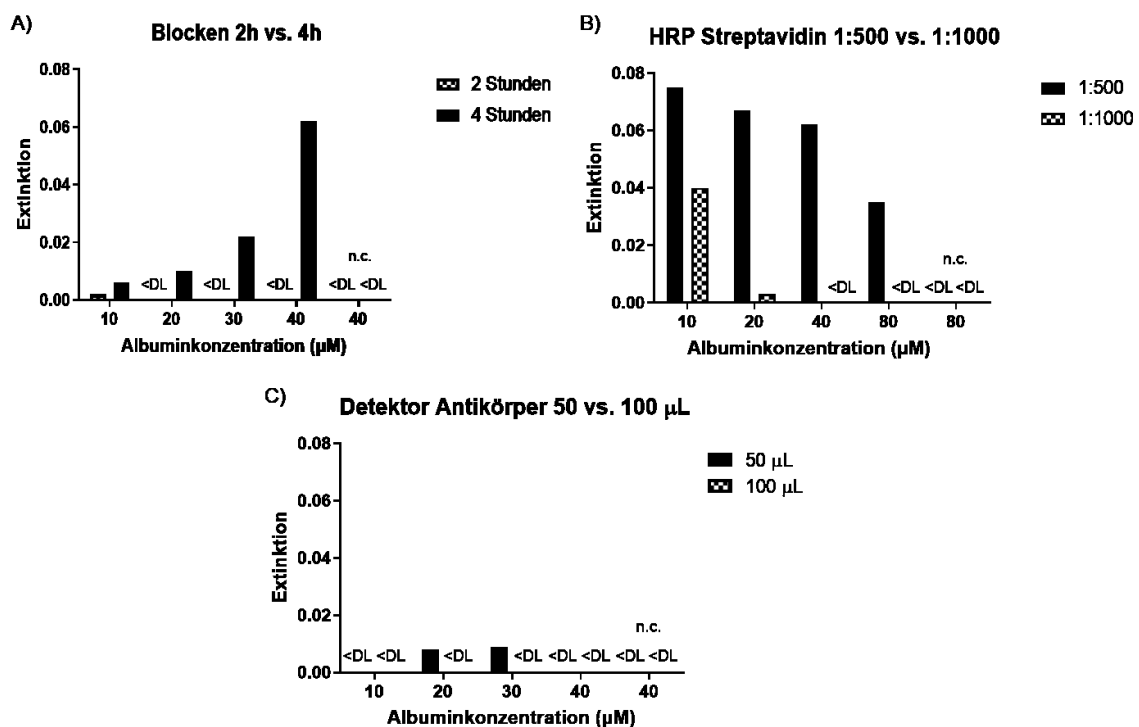


Abb. 13: Anpassung verschiedener Teilschritte im Rahmen der ELISA-Methodenentwicklung. 2 h gegenüber 4 h Blocken mit 1% I-Block (A), Einsatz einer 1:500 gegenüber einer 1:1000 Verdünnung des HRP-Streptavidins (B), Vergleich Einsatz von 50 μ L gegenüber 100 μ L des Detektor Antikörpers (C). Es sind die am Plattenphotometer bei 650 nm gemessenen Extinktionen (y-Achse) jeweils gegen die eingesetzten Albuminkonzentrationen (μ M; x-Achse) aufgetragen. Die Bezeichnung n.c. weist auf zur Negativ-Kontrolle nicht mit Amyloid- β 42 gecoatete Kavitäten hin. Extinktionswerte, die unterhalb des Detektionslimits liegen, sind mit <DL gekennzeichnet.

Unter den so veränderten Bedingungen (4 Stunden Blocken, HRP-Streptavidin Verdünnung 1:500, 50 μ L monoklonaler Detektor-Antikörper) führten wir den ELISA-Versuch mit den endotoxinarmen Proben zweier gesunder Spenderinnen und Spender (s. Abb. 14) durch. Das Albumin setzten wir hierbei in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M ein.

Methodenentwicklung: Endotoxinfreies Albumin + A β 42

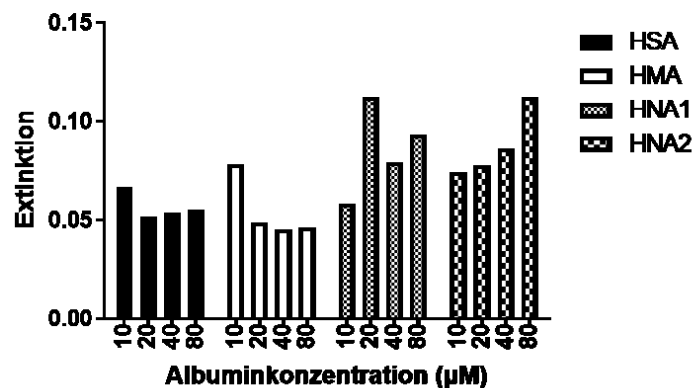


Abb. 14: ELISA im Rahmen der Methodenentwicklung. Eingesetzt wurden die Albuminfraktionen HSA, HMA, HNA1 und HNA2 zweier gesunder Spenderinnen und Spender in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M. Gemessen am Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 650 nm. Gezeigt ist der Mittelwert.

Entgegen unseren Erwartungen konnten wir anhand dieses Versuchs nicht für alle Albuminfraktionen nachweisen, dass die Extinktion abhängig von der eingesetzten Albuminkonzentration stieg. Bei den Albuminfraktionen HSA, HMA und HNA1 ließ

sich die Konzentrationsabhängigkeit nicht nachweisen, während die gemessene Extinktion abhängig von der eingesetzten HNA2- Konzentration leicht anstieg.

Anschließend führten wir einen weiteren ELISA-Versuch durch, in welchem wir die Beschichtungsdauer der Kavitäten (24 h gegenüber 48 h) modifizierten. Hierbei zeigte sich die Beschichtung der Platten für 24 h deutlich überlegen der verlängerten Beschichtungszeit von 48 h (s. Abb. 15). Aus diesem Grund beließen wir in den Folgeversuchen die Beschichtungsdauer bei 24 h.

Methodenentwicklung: Plattenbeschichtung 24 h vs. 48 h

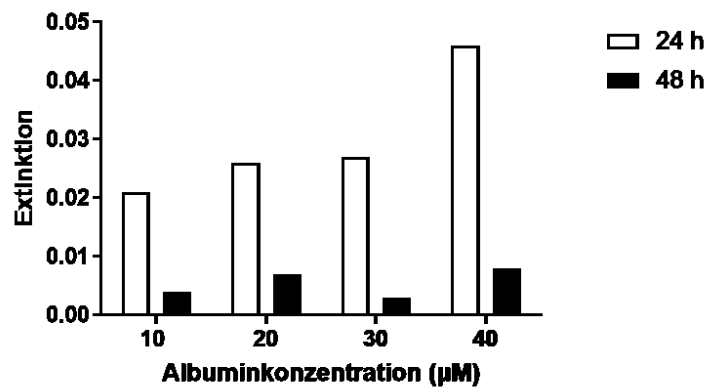


Abb. 15: Variierte Beschichtungsdauer der Platten im Rahmen der ELISA-Methodenetablierung.

In den folgenden Versuchen setzten wir einen polyklonalen Detektor-Antikörper ein. So erhofften wir uns, ein höheres Extinktionssignal messen zu können. Um herauszufinden welche Verdünnung des polyklonalen Antikörpers für ein ausreichendes Extinktionssignal benötigt wird, führten wir den ELISA mit unterschiedlichen Verdünnungen des Antikörpers durch. Hierbei erwies sich eine Verdünnung des Detektor-Antikörpers von 1:1000 bzw. 1:2000 für unsere Versuche als ausreichend (s. Abb. 16).

Methodenentwicklung: Polyklonaler Detektor-Antikörper

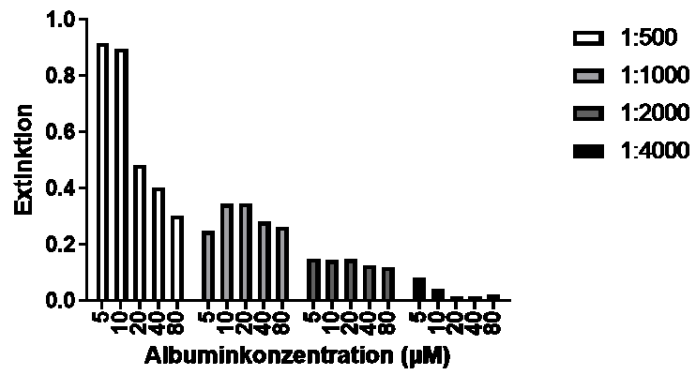


Abb. 16: Einsatz verschiedener Verdünnungen des polyklonalen Detektor-Antikörpers im Rahmen der Methodenentwicklung des ELISA.

In einem weiteren Versuch verglichen wir erneut die Verdünnungen 1:1000 und 1:2000 des Detektor-Antikörpers. Gleichzeitig untersuchten wir, ob sich das Beschallen gegenüber dem Mischen beim Lösen des Amyloid- β 42 günstig auf die Bindung des Albumins an das Amyloid- β und somit auf das Extinktionssignal auswirkte (s. Abb. 17).

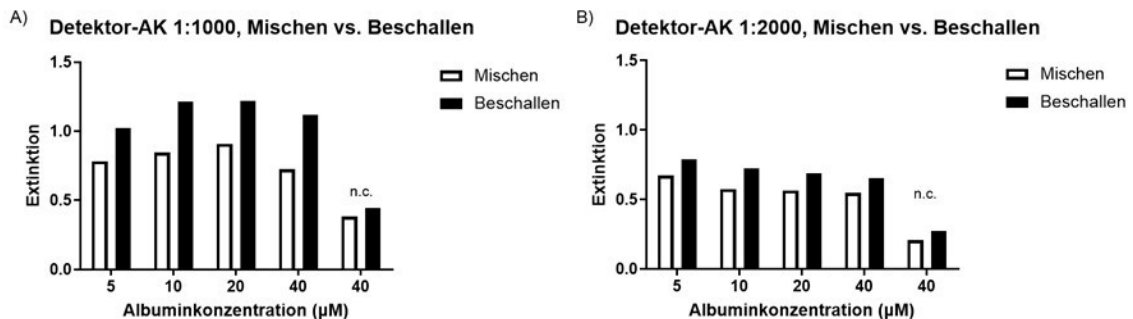


Abb. 17: Einsatz verschiedener Konzentrationen des Detektor-Antikörpers und Vergleich zwischen Beschallen und Mischen der Proben im Rahmen der ELISA-Methodenentwicklung. Die Extinktionen der beschallten Proben sind in Schwarz, die der gemischten Proben in Weiß dargestellt. Die 1:1000-Verdünnung des Detektor-Antikörpers ist in Teilabbildung A, die 1:2000-Verdünnung in Teilabbildung B dargestellt. Es erfolgte jeweils die gleiche Inkubationszeit (30 Minuten) mit TMB. Die Bezeichnung n.c. weist auf zur Negativ-Kontrolle nicht mit Amyloid- β 42 gecoatete Kavitäten hin.

Aufgrund der höheren Extinktion, die wir nach dem Beschallen des Amyloid- β detektieren konnten, entschieden wir uns künftig, das Amyloid- β im Rahmen des Lösevorgangs zu beschallen. Außerdem setzten wir den Detektor-Antikörper im Folgenden in einer 1:2000 Verdünnung ein, weil die gemessenen Extinktionen ausreichend hoch waren. Dementsprechend passten wir in weiteren Versuchen die Verdünnung des HRP-Streptavidins ebenfalls auf 1:2000 an.

Da das Extinktionssignal nicht in allen Vorversuchen zuverlässig entsprechend der höheren Albuminkonzentration anstieg, führten wir den ELISA anschließend mit einer Reihe von verschiedenen, einschließlich geringeren Albuminkonzentrationen (0,5 μ M bis 40 μ M) durch (s. Abb. 18).

Methodenentwicklung: Verschiedene Verdünnungen des Albumins

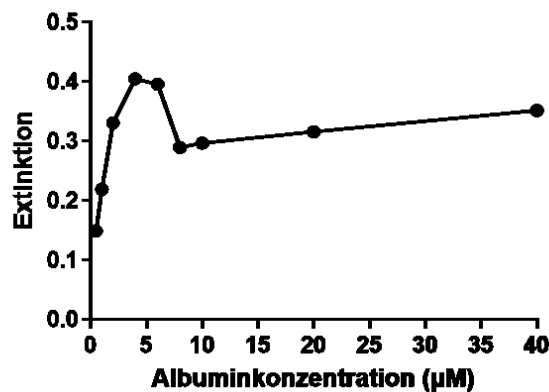


Abb. 18: ELISA durchgeführt mit HSA in verschiedenen Verdünnungen im Rahmen der Methodenetablierung. Einsatz von Albuminkonzentrationen zwischen 0,5 μ M und 40 μ M auf mit A β 42 beschichteten Platten. In der Darstellung ist einer von zwei aufeinanderfolgenden Versuchen gleicher Vorgehensweise und ähnlichen Ergebnissen gezeigt.

Hierbei stellten wir in zwei aufeinanderfolgenden, unabhängigen Versuchen fest, dass die Extinktion abhängig von der eingesetzten Albuminkonzentration im Bereich von 0,5 μ M bis 4 μ M anstieg. In Bereichen über diese Albuminkonzentrationen hinaus stieg das Extinktionssignal nicht weiter an und fiel sogar bis zu einer Konzentration von 8 μ M ab.

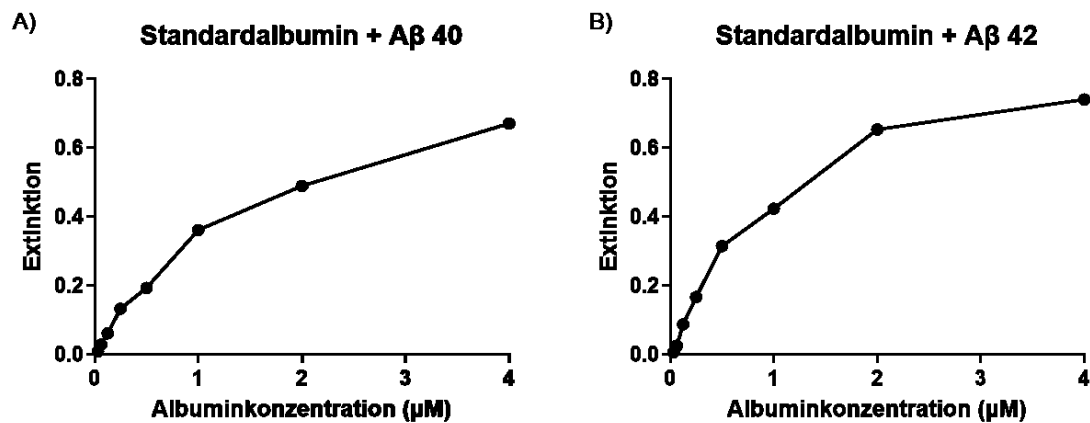


Abb. 19: ELISA-Versuch mit Standardalbumin (HSA) einer gesunden Spenderin auf mit Aβ 40 (A) bzw. mit Aβ 42 (B) beschichteten Platten.

Wir führten den Versuch anschließend sowohl mit Aβ 40 (s. Abb. 19, A) als auch Aβ 42 (s. Abb. 19, B) mit dem HSA einer gesunden Spenderin, welches wir in allen Folgeversuchen als „Standardalbumin“ verwendeten, und unter Einsatz der Konzentrationen 0,031 µM bis 4 µM durch. Hier zeigte sich, dass die Extinktion abhängig von den Albuminkonzentrationen bei Durchführung des ELISA auch unter Einsatz sehr geringer Albuminkonzentrationen anstieg. Auch mit Aβ 40 beschichteten Platten (s. Abb. 19, A) konnten wir eine konzentrationsabhängige Interaktion zwischen Aβ und HSA nachweisen, weshalb wir die Methode hiermit als etabliert ansahen und alle weiteren Versuche unter diesen, im Folgenden nochmals zusammengefassten, Bedingungen durchführten:

Beschichtung für 24 h mit 2,5 µM Aβ 40/ 42 in TBS (beschallt) bei 37°C und 400 rpm, Blocken mit 1% I-Block gelöst in PBS-T bei RT für 4 Stunden, Inkubation mit den Albuminfraktionen HSA, HMA, HNA1, HNA2 in den Konzentrationen 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 4 µM über Nacht bei 37°C und 400 rpm, Inkubation mit 50 µL des polyklonalen Detektor-Antikörpers in einer Verdünnung von 1:2000 in 1% I-Block gefolgt von einer Inkubation mit 50 µL HRP-Streptavidin 1:2000 verdünnt in PBS-T. Inkubation mit TMB-Substrat im Dunkeln bei RT und 400 rpm. Stoppen der Reaktion, abhängig von der festgestellten Farbentwicklung, mittels Stop-Lösung, spätestens jedoch nach 30 Minuten und Messen der Extinktion bei 650 nm.

Mittels der so etablierten Methode untersuchten wir zunächst die Albuminfraktionen einer gesunden Spenderin („Standardalbumin“) (s. Abb. 20). Im Zuge dessen

gelang es uns, die Konzentrationsabhängigkeit der Extinktion für alle Fraktionen nachzuweisen. Die Extinktionen der Fraktionen HSA, HMA und HNA2 fielen hierbei insgesamt für alle eingesetzten Albuminkonzentrationen höher aus als die der Fraktion HNA1.

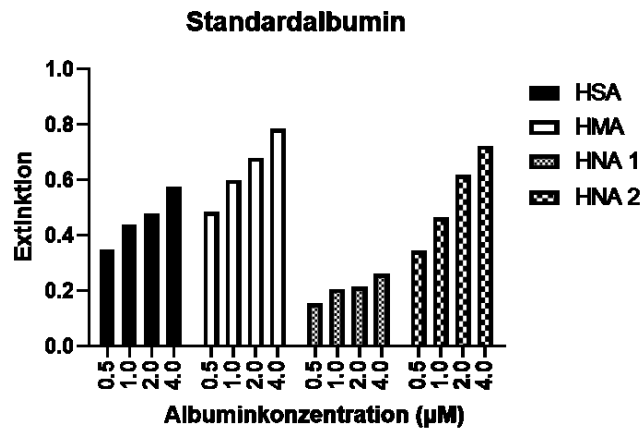


Abb. 20: A β 42-ELISA mit den Albuminfraktionen HSA, HMA, HNA1 und HNA2 einer gesunden Spenderin (Standardalbumin).

Bei Durchführung des ELISA mit annähernd endotoxinfreien Albuminfraktionen vier gesunder Spenderinnen und Spender ließ sich unter Einsatz der Konzentrationen 0,5 µM, 1 µM und 2 µM die Konzentrationsabhängigkeit der Extinktion aller Fraktionen ebenfalls beobachten (s. Abb. 21). Allerdings stellten wir fest, dass bei Einsatz der höchsten Albuminkonzentration (4 µM) vermutlich bereits alle Amyloid- β -Bindungsstellen an den Albuminmolekülen gesättigt waren, weswegen die Konzentrationssteigerung der Fraktionen HSA und HMA auf 4 µM bei den mit A β 42 beschichteten Platten keinen Anstieg der Extinktion bewirkte (s. Abb. 21, B).

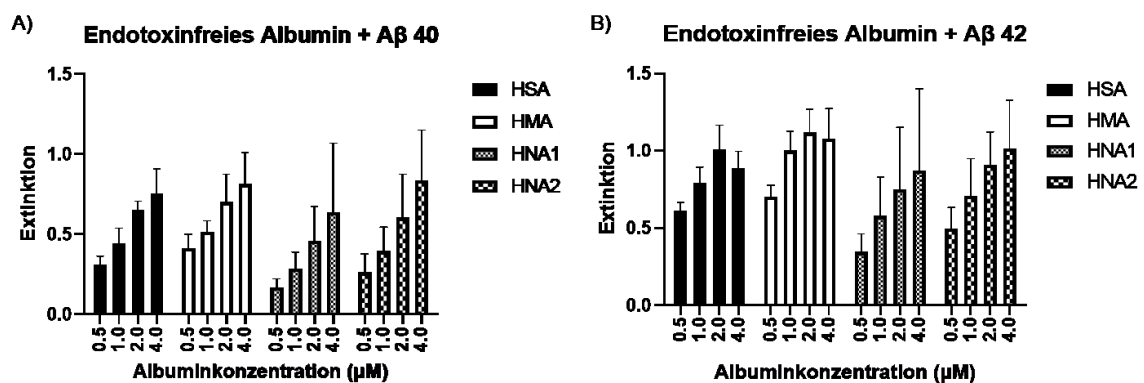


Abb. 21: Etablierte ELISA-Methode mit A β 40 (A) bzw. A β 42 (B) beschichteten Platten. Untersucht wurden hier die annähernd endotoxinfreien Albuminfraktionen HSA, HMA, HNA1, HNA2 vier gesunder Spenderinnen und Spender. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

Wir normierten folgend die im zuletzt beschriebenen Versuch mit dem endotoxinarmen Albumin vier gesunder Spenderinnen und Spender gemessenen Extinktionswerte der 0,5 μ M Albuminkonzentration auf das oben bereits erwähnte „Standardalbumin“ bei derselben Konzentration. Anschließend gelang es uns, signifikante Unterschiede der Interaktion mit Amyloid- β 40 (s. Abb. 22, A) sowie mit Amyloid- β 42 (s. Abb. 22, B) zwischen den Albuminfraktionen HMA und HNA1 nachzuweisen.

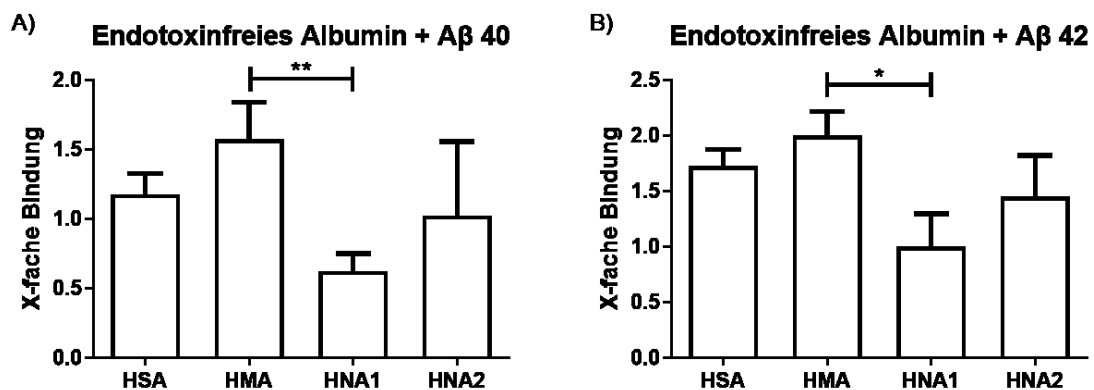


Abb. 22: Standardisierte Extinktionswerte der Interaktionsanalyse zwischen A β 40 bzw. A β 42 mit 0,5 μ M endotoxinarmen Albuminfraktionen (n=4). Die ermittelte Extinktion des „Standardalbumins“ im jeweiligen A β -ELISA wurde als „1“ definiert und die Extinktionen mit den Fraktionen auf diese normiert. Statistische Auswertung anhand einfaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung („one-way repeated measures ANOVA“) und Dunnett’s-Test. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung. *, p<0,05; **, p<0,01.

Anhand der Standardisierung der Extinktionswerte war es möglich, das Albumin mehrerer Probandinnen und Probanden zu untersuchen und die Ergebnisse dieser verschiedenen, nicht innerhalb eines Versuchs durchgeführten ELISA vergleichbar zu machen.

Wir führten den ELISA mit A β 42 beschichteten Platten jeweils noch mit den Albuminfraktionen sieben weiterer gesunder Spender durch, welche im Gegensatz zu den endotoxinarmen Albuminfraktionen seltener sterilfiltriert wurden. Die gemessenen Extinktionswerte standardisierten wir ebenso wie oben bereits beschrieben. Zusammen mit den endotoxinfreien Albuminfraktionen erhielten wir so eine Stichprobengröße von elf Probandinnen und Probanden.

Im Rahmen der statistischen Auswertung dieser umfangreicheren Stichprobe stellten wir signifikante Unterschiede der A β 42-Bindung zwischen den Albuminfraktionen HMA und HNA1 sowie zwischen HMA und HNA2 fest (n=11, s. Abb. 23).

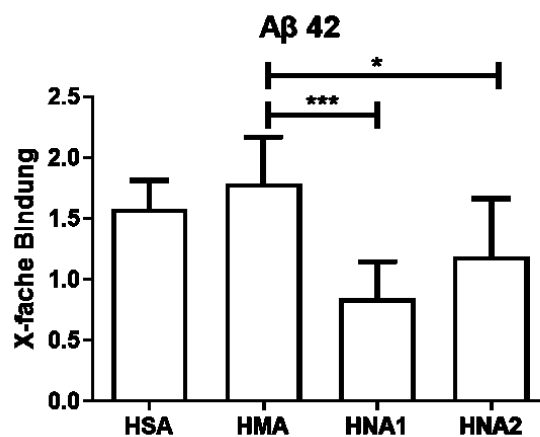


Abb. 23: Signifikante Unterschiede im A β -Bindungsverhalten der Albuminfraktionen. Dargestellt sind die standardisierten Extinktionswerte der 0,5 μ M Albuminfraktionen elf gesunder Spenderinnen und Spender bei Durchführung des ELISA mit A β 42 beschichteten Platten. Statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung („one-way repeated measures ANOVA“) und Dunnett’s-Test. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung. *, p<0,05; ***, p<0,001.

Auf Basis der oben festgestellten signifikant geringeren Extinktionswerte innerhalb der Versuche mit der Albuminfraktion HNA1 gegenüber den Albuminfraktionen HMA und HNA2 stellten wir den prozentualen Anteil des HNA1 an HSA mittels der HPLC-Methode fest und korrelierten diesen HNA1-Gehalt mit den Extinktionswerten elf gesunder Spenderinnen und Spender (n=11). Die Ergebnisse sind in Abb. 24

dargestellt (s. Abb. 24). Es konnte keine Korrelation zwischen A β -Bindung und HNA1-Gehalt der HSA-Proben festgestellt werden.

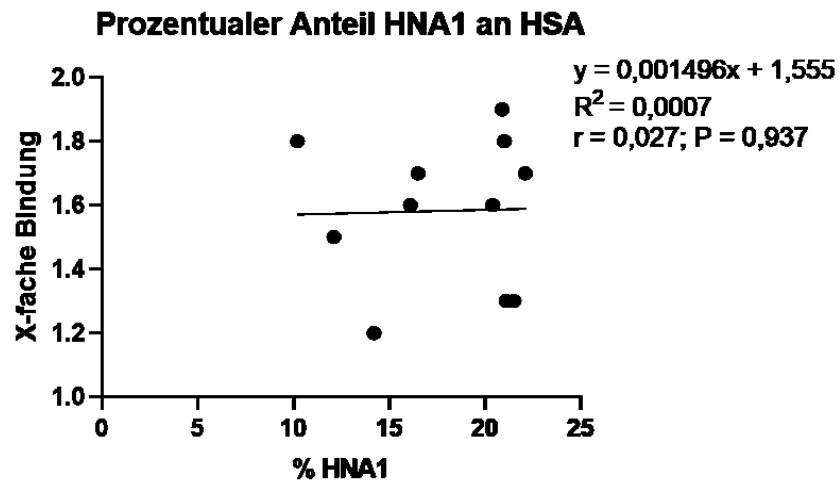


Abb. 24: A β -Bindung von HSA. Der prozentuale HNA1-Anteil korreliert nicht mit den standardisierten Extinktionswerten des HSA (0,5 μ M). Die prozentualen Anteile von HNA1 an HSA wurden anhand der HPLC-Methode bestimmt und gegen die standardisierten Extinktionswerte der ELISA elf gesunder Spenderinnen und Spender aufgetragen.

Um die Ursache der signifikanten Unterschiede des Bindungsverhaltens der Albuminfraktionen noch genauer zu untersuchen, charakterisierten wir unsere Albuminfraktionen bezüglich ihres Fettsäure-, ihres Endotoxin (Lipopolysaccharid)- sowie ihres Bilirubingehalts.

Wir stellten fest, dass die Fraktion HNA1 einen im Vergleich zu der Fraktion HMA signifikant höheren Fettsäuregehalt aufwies (n=11, s. Abb. 25).

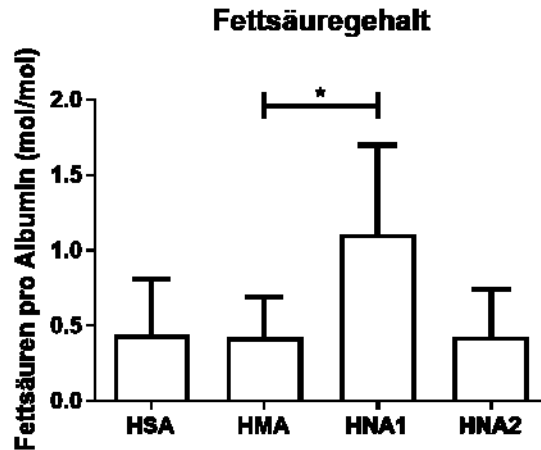


Abb. 25: Fettsäuregehalt der Albuminfraktionen. Es zeigen sich signifikante Unterschiede im Fettsäuregehalt zwischen den Albuminfraktionen HMA und HNA1 elf gesunder Spenderinnen und Spender. Statistische Auswertung anhand einfaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung und Dunnett's-Test. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. *, $p < 0,05$.

Aufgrund der bereits erwähnten Beeinträchtigung der A β -Bindung am Albumin in Anwesenheit von Fettsäuren und anhand der Ergebnisse unserer Vorversuche, gingen wir davon aus, dass der höhere Fettsäuregehalt der Fraktion HNA1 mit den geringeren Extinktionswerten und somit mit der geringeren Bindung von A β an HNA1 in Verbindung steht. Wir korrelierten daher den Fettsäuregehalt der Albuminfraktionen mit den standardisierten Extinktionswerten der ELISA mit A β 40 ($n=16$, s. Abb. 26, A) bzw. A β 42 ($n=36$, s. Abb. 26, B) beschichteten Platten und stellten für A β 42 beschichtete Platten einen signifikanten Zusammenhang (**, $p < 0,01$) zwischen dem Fettsäuregehalt und der Bindung von A β 42 an die Albuminfraktionen fest. Je höher der Fettsäuregehalt des Albumins, desto weniger A β 42-Peptide banden an das Albumin. Die Bindung von A β 40 an die Albuminfraktionen korrelierte dagegen nicht signifikant mit dem Fettsäuregehalt derselben, der Stichprobenumfang war hier allerdings geringer.

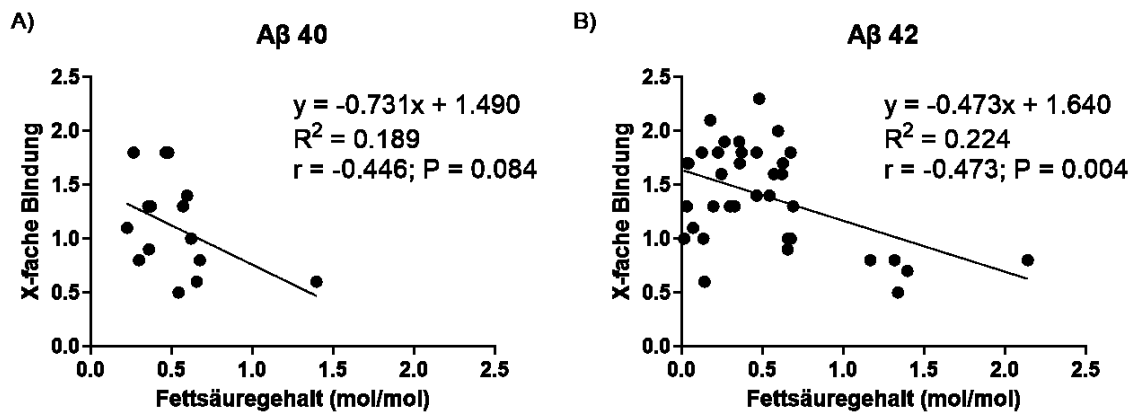


Abb. 26: A β -Bindung abhängig vom FS-Gehalt. Die X-fache Bindung korreliert mit dem Fettsäuregehalt der Albuminfraktionen bei Durchführung des ELISA mit A β 40 (A) bzw. A β 42 (B) beschichteten Platten. Der A β 40 ELISA wurde jeweils mit den endotoxinarmen Albuminfraktionen vier gesunder Spenderinnen und Spender durchgeführt (n=16), der A β 42 ELISA jeweils mit den Albuminfraktionen neun gesunder Spenderinnen und Spender (n=36). **, p<0,01.

Der Endotoxingehalt der Albuminfraktion HNA1 erwies sich ebenfalls als signifikant höher verglichen mit dem der Albuminfraktion HMA (n=7, s. Abb. 27).

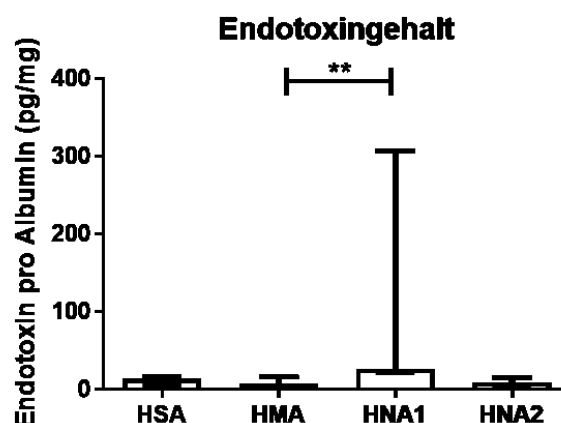


Abb. 27: Endotoxingehalt der Albuminfraktionen. Es zeigen sich signifikante Unterschiede im Endotoxingehalt zwischen den Albuminfraktionen HMA und HNA1 sieben gesunder Spenderinnen und Spender. Statistische Auswertung mittels Friedman-Test und anschließendem Dunn's-Test. Dargestellt sind Median und Interquartilsabstände. **, p<0,01.

Auch den Endotoxingehalt der Albuminfraktionen korrelierten wir mit den standardisierten Extinktionswerten der A β 40- und A β 42-ELISA. Hierbei stellten wir eine signifikante Korrelation (*, $p < 0,05$) der normierten Extinktionen des A β 42-ELISA mit dem Endotoxingehalt der Albuminfraktionen fest ($n=28$, s. Abb. 28, B). Keine Korrelation ergab sich zwischen den Extinktionswerten des A β 40-ELISA und dem Endotoxingehalt der Albuminfraktionen, allerdings verfügten wir auch hier über eine geringere Stichprobenanzahl ($n=16$, s. Abb. 28, A).

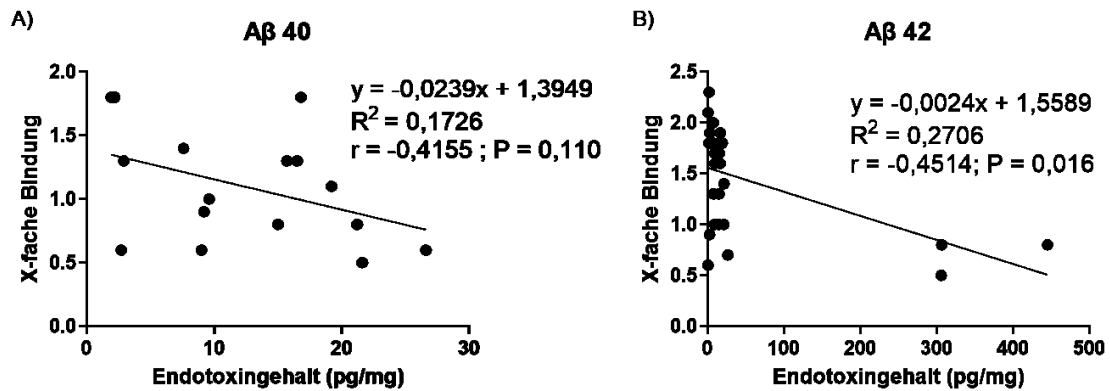


Abb. 28: A β -Bindung abhängig vom Endotoxingehalt. Die X-fache Bindung korreliert mit dem Endotoxingehalt der Albuminfraktionen bei Durchführung des ELISA mit A β 40 (A, $n=16$) bzw. A β 42 (B, $n=28$) beschichteten Platten. *, $p < 0,05$.

Bezüglich des Bilirubingehalts konnten wir keine signifikanten Unterschiede zwischen den Albuminfraktionen feststellen ($n=7$, s. Abb. 29).

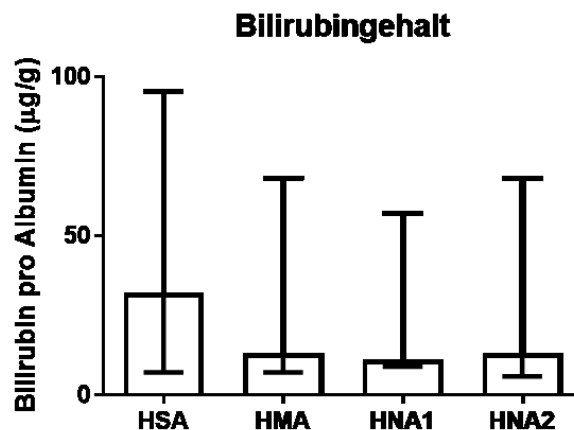


Abb. 29: Bilirubingehalt der Albuminfraktionen sieben gesunder Spenderinnen und Spender. Die statistische Auswertung erfolgte anhand eines Friedman-Tests mit anschließendem Dunn's Test. Abgebildet sind Median und Interquartilsabstände.

Der Bilirubingehalt der Albuminfraktionen korrelierte weder mit den Extinktionswerten des ELISA mit A β 40 noch mit denen des ELISA durchgeführt mit A β 42 (s. Abb. 30, A und B).

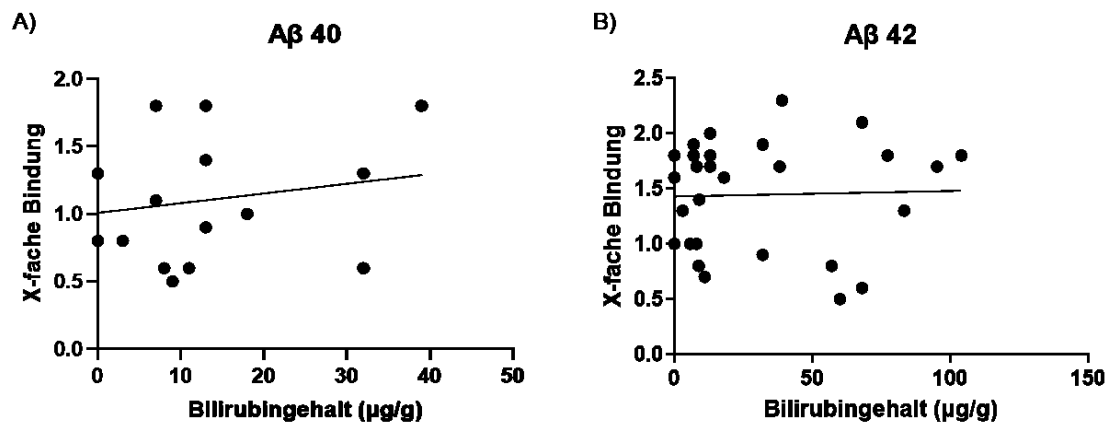


Abb. 30: A β -Bindung unabhängig vom Bilirubingehalt. Die X-fache Bindung korreliert nicht mit dem Bilirubingehalt der Albuminfraktionen bei Durchführung des ELISA mit A β 40 (A) bzw. A β 42 (B) beschichteten Platten. Der A β 40-ELISA wurde mit den Albuminfraktionen vier gesunder Spenderinnen und Spender (n=16), der A β 42-ELISA mit den Albuminfraktionen sieben gesunder Spenderinnen und Spender (n=28) durchgeführt.

4.4.1 Interaktion von Albumin und A β in Anwesenheit von Fettsäuren

Die Etablierung der ELISA-Methode erfolgte ebenso für kommerzielles Albumin (KA) mit und ohne Fettsäuren beladen. Innerhalb des ELISA-Versuchs im Rahmen der Methodenentwicklung fielen die gemessenen Extinktionswerte in den Kavitäten, in welche wir mit Fettsäuren beladenes Albumin gaben, geringer aus als in denen, die fettsäurefreies Albumin enthielten. In diesem Versuch ließ sich zudem auch trotz des Einsatzes der höheren Konzentrationen (10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M) eine Konzentrationsabhängigkeit des Extinktionssignals nachweisen. Mit steigender

Konzentration des eingesetzten Albumins stieg auch das jeweils gemessene Extinktionssignal (s. Abb. 31).

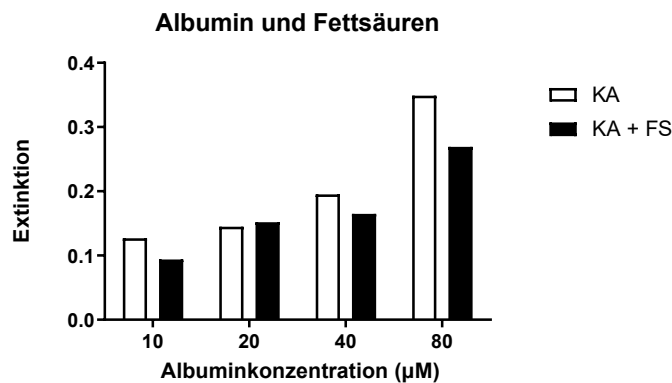


Abb. 31: Interaktion von Albumin mit A β in An- und Abwesenheit von FS. KA ohne oder beladen mit Fettsäuren (2,7 mol FS/mol Albumin) wurde in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M und 80 μ M eingesetzt. Die Messung erfolgte am Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 650 nm.

Wir führten den Versuch anschließend mit geringeren Albuminkonzentrationen (0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M und 4 μ M) durch (s. Abb. 32). Hierbei ließ sich zwar sowohl unter Einsatz des fettsäurefreien KA als auch des mit Fettsäuren beladenen KA die Konzentrationsabhängigkeit der Extinktion nachweisen. Die Extinktionswerte bei Einsatz der jeweiligen Albuminkonzentrationen fielen jedoch entgegen unseren Erwartungen unabhängig von der An- oder Abwesenheit der Fettsäuren annähernd gleich aus.

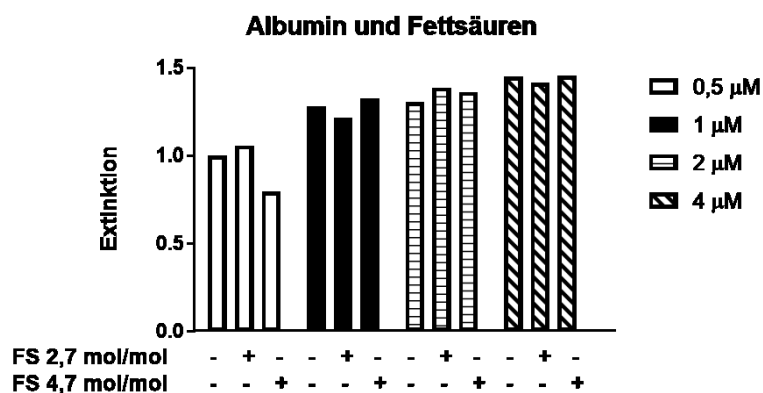


Abb. 32: Etablierte ELISA Methode mit KA in An- und Abwesenheit von Fettsäuren. Das KA wurde in den Konzentrationen 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M und 4 μ M eingesetzt.

Die Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) der Fettsäuren (2,7 mol/mol oder 4,7 mol/mol) ist jeweils unterhalb der x-Achse angezeigt.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es zunächst die in ihren Grundzügen literaturbeschriebene A β -ELISA Methode in unserem Labor zu etablieren. Anhand dieser direkten Nachweismethode der A β -Albumin-Interaktion erhofften wir uns potenzielle Unterschiede bezüglich der Interaktion des Amyloid- β Peptids mit den verschiedenen Albuminfraktionen HSA, HMA, HNA1 und HNA2 festzustellen. Auch mittels anderer Methoden, darunter Western Blot, ThT-Assay und „Quenching“ der Eigenfluoreszenz des Albumins, erwarteten wir solche Unterschiede nachweisen und genauer untersuchen zu können.

Nicht alle der von uns angewandten Methoden zeigten sich als für die Untersuchung der Amyloid- β -Albumin-Bindung geeignet. Während wir mittels der indirekten Nachweisverfahren, also anhand des ThT-Assays und des „Quenching“ der Eigenfluoreszenz keine eindeutig interpretierbaren Ergebnisse erhielten, erwies sich der von uns etablierte A β -ELISA, bei dem es sich um ein direktes Nachweisverfahren handelt, als die verlässlichste Methode zum Nachweis der Amyloid- β -Albumin-Interaktion. Die Ergebnisse des Western Blots, ebenfalls ein direktes Nachweisverfahren der Amyloid- β -Albumin-Bindung, waren wie die der indirekten Nachweisverfahren nicht eindeutig zu interpretieren.

Der ThT-Assay ist eine Methode zum Nachweis der Bildung amyloider Fibrillen. Wir wollten uns diese Methode zu Nutze machen, um einen möglichen inhibitorischen Effekt der reduzierten und oxidierten Albuminfraktionen HMA, HNA1 und HNA2 auf die Bildung von A β -Fibrillen zu untersuchen. In den Vorversuchen konnten wir nachweisen, dass das von uns verwendete Amyloid- β Fibrillen bildete. Im Rahmen des Hauptversuchs, welcher über einen längeren Zeitraum und in Anwesenheit von Albumin durchgeführt wurde, zeigte das eingesetzte Amyloid- β allerdings kein Potenzial zur Fibrillenbildung unabhängig von der An- oder Abwesenheit des Albumins. Es kam über einen Zeitraum von 92 h zu keinem relevanten Anstieg des ThT-Fluoreszenzsignals des A β . Dies deutete darauf hin, dass sowohl zu Beginn des Versuchs keine formierten A β -Fibrillen vorhanden waren als auch darauf, dass sich über den gesamten Messzeitraum keine Fibrillen bildeten. Das zugegebene Albumin kam nicht als Ursache für die ausgebliebene Fibrillenbildung infrage, da diese bereits vor der zeitlich versetzten Zugabe der Albuminfraktionen nach 24 h

ausblieb. Bei Zusammenfügen der Albuminfraktionen mit A β 40 bzw. 42 kam es zunächst zu einem enormen Anstieg der Fluoreszenz. Danach sank die Fluoreszenz im Laufe des Messzeitraums kontinuierlich ab. Aufgrund der Tatsache, dass das A β allein allerdings keine Fibrillen formierte, ist nicht davon auszugehen, dass Albumin zur Auflösung von Fibrillen beitrug. Da sich während des Versuchs keine Amyloid- β -Fibrillen bildeten, konnten wir keine Unterschiede des Einflusses der Albuminfraktionen mit unterschiedlichem Redoxzustand auf die Fibrillenbildung nachweisen und dementsprechend auch keine Aussage über die Amyloid- β -Albumin-Interaktion treffen.

Der ThT-Assay stellt eine in der Literatur sehr häufig beschriebene Methode zum Nachweis von Amyloid- β Fibrillen dar. Trotzdem ist keine einheitliche, erfolgsversprechende Vorgehensweise beschrieben. Es besteht eine breite Variabilität bezüglich der Empfehlungen zur Methodendurchführung. Zudem wird in der themenspezifischen Literatur mehrfach auf eine erhebliche Fehleranfälligkeit des ThT-Assays vor allem bei dessen Durchführung in Anwesenheit von Albumin hingewiesen (9, 33). Hierin wird unter anderem eine mögliche Interaktion zwischen ThT und Albumin beschrieben (9). Außerdem wird erwähnt, dass Albumin in Anwesenheit von ThT eine Fluoreszenz außerhalb seines eigenen Emissionsspektrums aufweist, was den starken Anstieg der Fluoreszenz nach Zugabe von Albumin in unseren Versuchen erklären könnte (33).

Bezüglich der Durchführung des ThT-Assays gibt es, wie bereits erwähnt, verschiedene Empfehlungen, welche auf Fehleranalysen verschiedener Forschungsgruppen basieren. So verwendeten Algamal et al. (2013) im Rahmen des ThT-Assays zum Beispiel lediglich einen Teil des HSA-Moleküls (494-515), um den störenden Effekt, welchen das vollständige HSA-Molekül auf die Fluoreszenz des ThT ausübt, zu umgehen (22). Für falsch negative Ergebnisse, also Fälle in denen zwar Amyloid- β -Fibrillen vorhanden sind, diese jedoch nicht anhand des ThT-Assays detektierbar sind, wird in einer Veröffentlichung von Malmos et al. (2017) ein sogenannter „fixed point assay“ vorgeschlagen. Entgegen unserer Methode wird hierbei eine fibrillenenthaltende Lösung inkubiert und jeweils zu definierten Zeitpunkten zu einer ThT-enthaltenden Lösung gegeben. Anschließend erfolgt die Messung. Somit wird jeweils nur eine Messung unter den gegebenen Bedingungen durchgeführt und eine Veränderung der Proteinstrukturen durch

veränderte Puffer- oder Konzentrationsbedingungen innerhalb des langen Messzeitraums, wie in unserem Fall möglicherweise geschehen, wird vermieden. Lange Messzeiträume beanspruchen zudem nicht nur dauerhaft die benötigten Messinstrumente, sondern können auch zu Problemen wie zum Beispiel dem Abbau von Proteinen oder Verdunstung führen (27).

Auch bezüglich der Inkubationszeit des A β finden verschiedene Vorgehensweisen Anwendung. Im Vergleich zu anderen publizierten ThT-Assay-Methoden wählten wir eine relativ kurze Inkubationszeit von insgesamt 92 Stunden. Während Xue et al. (2017) A β 40 und A β 42 vor der Durchführung des ThT-Assays zunächst über 5 Tage bei 37°C inkubierten, um die Fibrillenbildung zu induzieren, monitorisierten Stanyon et al. (2012) die A β -Fibrillenbildung durch halbstündliche Messungen über einen Zeitraum von insgesamt ca. 400 h (26, 34). Im Rahmen der letztgenannten Studie begann die A β 40-Fibrillenformation in Anwesenheit von HSA erst nach einem Zeitraum von mindestens 200 h. Dies wurde anhand der in den Messergebnissen festgestellten, durch die Anwesenheit von HSA verlängerten Anlaufphase („lag-phase“) der Fibrillenformation erklärt. Der Zeitraum bis zur Induktion der A β 42-Fibrillenbildung erwies sich hingegen als etwas kürzer, diese setzte in Anwesenheit von HSA bereits nach ca. 100 h ein. Auch hier verzögerte Albumin die anfängliche Latenzphase.

Entsprechend der Ergebnisse innerhalb dieser Publikationen sollte bei zukünftigen ThT-Versuchen in unserem Labor womöglich eine längere Inkubationszeit der Fibrillen unter Fibrillen-induzierenden Bedingungen und unter Vermeidung von Verdunstung in Kombination mit einem „fixed point assay“ in Betracht gezogen werden.

Eine weit verbreitete Methode zur Untersuchung von Interaktionen zwischen A β und Albumin stellt das „Quenching“ der Eigenfluoreszenz von Albumin dar. In unseren Versuchen stellten wir fest, dass sowohl A β 40 als auch A β 42 einen „Quenching“-Effekt auf die Eigenfluoreszenz des HSA sowie der Albuminfraktionen HMA, HNA1 und HNA2 ausübten. Zunächst zeigte sich, dass der „Quenching“-Effekt auf die Eigenfluoreszenz der Albuminfraktion HNA2 bei der Durchführung des Versuchs in Anwesenheit von A β 42 signifikant höher ausfiel als der auf die Albuminfraktion HMA. Dies deutete darauf hin, dass an HNA2 eine signifikant größere Anzahl an A β

42 Peptiden band, welche die Auslöschung der Albumineigenfluoreszenz bedingte, als an HMA. In einem weiteren Versuch konnten wir diese Unterschiede des „Quenching“-Effekts des A β 40 oder A β 42 auf die einzelnen Albuminfraktionen allerdings nicht zeigen. Die unterschiedlich starke Interaktion zwischen A β und den Albuminfraktionen HNA2 und HMA ließ sich also nicht erneut bestätigen. Die Anwesenheit von Fettsäuren hingegen bewirkte, wie erwartet, ein reduziertes Interaktionsausmaß zwischen A β und Albumin (7, 8).

In der Literatur beschriebene „Quenching“-Versuche widmeten sich bisher lediglich der Untersuchung der Interaktion von A β mit HSA und ließen die einzelnen Albuminfraktionen außer Acht. Bezüglich des HSA zeigten sich unsere Ergebnisse mit den hierzu bereits veröffentlichten vergleichbar, wir konnten nachweisen, dass die Tryptophan-Fluoreszenz in Anwesenheit von A β „gequencht“ wird (9, 35). „Quenching“-Versuche mit reduzierten und oxidierten Albuminfraktionen wurden so allerdings bisher noch nie durchgeführt.

Möglicherweise handelt es sich bei der „Quenching“-Methode als indirektes Nachweisverfahren nicht um eine geeignete Nachweismethode für Versuche mit den Albuminfraktionen. Die Fehleranfälligkeit der Methode könnte unter anderem durch die Tatsache erklärbar sein, dass nicht nur A β sondern auch eine Vielzahl anderer Substanzen, darunter zum Beispiel Bilirubin, die Eigenfluoreszenz des Albumins beeinträchtigen (36). Das Albumin sollte daher in Zukunft vor Durchführung der „Quenching“-Versuche besonders aufgereinigt werden, um potenziell störende Substanzen zu entfernen. Da wir den ersten „Quenching“-Versuch aufgrund der großen Probenzahl an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen durchführten, könnten die unterschiedlichen Ergebnisse allerdings auch auf differierende Versuchsbedingungen an den verschiedenen Versuchstagen zurückzuführen sein. Zukünftig sollte der Versuch mit der größeren Probenzahl noch einmal an einem Tag durchgeführt werden, um so unter exakt gleichen Versuchsbedingungen eine Überprüfung der Ergebnisse vornehmen zu können.

Mit Hilfe eines Western Blots unter Verwendung eines A β -spezifischen Antikörpers untersuchten wir das von uns verwandte A β -Ausgangsmaterial auf das Vorliegen von Monomeren bzw. Oligomeren. Weiters erhofften wir uns die Bindung von A β an Albumin durch eine Verschiebung der spezifischen Banden zu höherem

Molekulargewicht sichtbar machen zu können. Nach Inkubation der Albuminfraktionen mit A β wurde eine Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen durchgeführt. Mittels Western Blot detektierten wir bei Einsatz des A β 42 als Kontrolle (keine Inkubation) Oligomere mit einem Molekulargewicht von 50 kDa-60 kDa. Diese waren jedoch nach zweistündiger Inkubation des A β 42 nicht mehr nachweisbar. Im Rahmen des Inkubationsvorgangs muss es dementsprechend zu einer Auflösung der A β -Oligomere (50 kDa-60 kDa) gekommen sein. Weiters detektierten wir A β -Oligomere mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa, die im Gegensatz zu den A β -Oligomeren höheren Molekulargewichts auch im Kontrollversuch nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden beständig blieben, sowie in unterschiedlichem Ausmaß an die Albuminfraktionen HMA, HNA1 und HNA2 gebundenes A β 42 (ca. 60 kDa). A β -Monomere hingegen konnten wir nicht nachweisen. Dies erklärten wir uns dadurch, dass wir entweder im Rahmen des Lösungsvorgangs bzw. des Beschallens des A β überhaupt nur eine unverhältnismäßig geringe Anzahl an Monomeren erhielten oder aber damit, dass vorhandene A β -Monomere während der Lagerung rasch oligomerisierten. Eine Bindung von A β -Monomeren an Albumin konnten wir aus diesem Grund nicht ausschließen. Die in der Literatur vertretene Annahme, Albumin binde A β -Oligomere konnten wir allerdings bestätigen (9). Die weniger ausgeprägte Interaktion von Amyloid- β 42 und der Albuminfraktion HNA1, welche wir mittels ELISA nachwiesen, stellten wir anhand des Western Blots lediglich bei dem HNA1 einer Spenderin oder eines Spenders fest. Bei den restlichen von uns eingesetzten Albuminproben anderer Spenderinnen und Spender band A β 42 jeweils stärker an HMA und HNA1 verglichen mit HNA2. Da uns lediglich eine geringe Probenanzahl (n=3) zur Durchführung des Western Blots zur Verfügung stand, ist die Validität der Ergebnisse gegenüber denen des A β -ELISA zurückzustellen. Der Versuch sollte dementsprechend in Zukunft mit einer größeren Anzahl an Albuminfraktionen verschiedener Spenderinnen und Spender durchgeführt werden.

Eine weitere direkte Nachweismethode einer Bindung zwischen A β und Albumin ist ein ELISA, bei dem A β auf einer beschichteten Platte immobilisiert, mit Albuminfraktionen beladen und schließlich das gebundene Albumin detektiert wird. Ein solcher ELISA wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit zur Gänze neu etabliert. Ausgehend von einer von Bohrmann et al. publizierten ELISA-Methode

modifizierten wir die Versuchsvorgehensweise nach und nach und passten so die einzelnen Schritte der Methode an die Gegebenheiten unseres Labors an (5). Bei Durchführung des ELISA unter den ursprünglichen Bedingungen stellten wir lediglich sehr niedrige Extinktionssignale fest. Durch Einsatz eines polyklonalen Antikörpers erreichten wir schließlich eine Amplifikation des Signals. Außerdem gelang es uns die für optimale ELISA-Bedingungen notwendigen Albuminkonzentrationen zu ermitteln.

Nach Etablierung der ELISA-Methode in unserem Labor, stellten wir mittels dieser signifikante Unterschiede zwischen den Albuminfraktionen bezüglich ihrer Interaktion mit A β 40 bzw. mit A β 42 fest. Wurden Versuche mit A β 40 durchgeführt, wies die Albuminfraktion HNA1 ein signifikant geringeres Interaktionsverhalten mit A β 40 auf als die Fraktion HMA. Bei Durchführung des ELISA mit A β 42 beschichteten Platten zeigte sich dieser signifikante Unterschied noch eindrücklicher. Zusätzlich interagierte hier auch die Albuminfraktion HNA2 in signifikant geringerem Ausmaß mit A β 42 als die Fraktion HMA.

Trotz der signifikant geringeren Extinktionswerte der ELISA-Versuche durchgeführt mit HNA1 bzw. HNA2, korrelierte der Anteil an in HSA enthaltenem HNA1 nicht mit den Extinktionswerten des HSA. Einen direkten Zusammenhang zwischen den gemessenen Extinktionswerten und dem Redoxstatus der in vivo-Albuminfraktionen konnten wir dementsprechend nicht nachweisen. Die von uns verwendeten HSA-Proben wiesen hierbei eher geringe HNA1-Anteile auf (zwischen 10% und 22%).

Durch genauere Charakterisierung unserer präparierten Albuminfraktionen bezüglich ihres Fettsäure- sowie Endotoxingehalts stellten wir fest, dass die Albuminfraktion HNA1 verglichen mit HMA und HNA2 einen signifikant höheren Gehalt an Fettsäuren sowie an Endotoxinen aufwies. In beiden Fällen ließ sich eine negative Korrelation des Fettsäuregehalts bzw. des Endotoxingehalts der Albuminfraktionen mit den von uns gemessenen Extinktionswerten nachweisen. Wir zeigten somit, dass sich sowohl die Anwesenheit der Fettsäuren als auch die der Lipopolysaccharide beeinträchtigend auf die Interaktion zwischen A β und den Albuminfraktionen auswirkte.

Die von uns festgestellten Unterschiede des Interaktionsausmaßes zwischen A β und den oxidierten Albuminfraktionen HNA1 sowie HNA2 und der reduzierten

Albuminfraktion HMA sind vor allem insofern relevant, als dass neurodegenerative Erkrankungen, darunter auch die Demenz vom Alzheimer-Typ mit einem gesteigerten Maß an oxidativem Stress und in der Folge mit einer vermehrten Oxidation der Albuminfraktionen einhergehen (18). Unsere Ergebnisse zeigen, dass die oxidierten Formen des Humanen Serum Albumins in geringerem Ausmaß mit A β interagieren. A β -Peptide stehen also im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen vermutlich vermehrt in freier Form für die Bildung pathologischer Fibrillen zur Verfügung. Eine Tatsache, die für die Pathophysiologie dieser Erkrankungen eine zentrale Rolle spielen könnte.

Unsere Ergebnisse bestätigen Studien anderer Arbeitsgruppen, dass nämlich Fettsäuren die Bindung des Amyloid- β an das Albuminmolekül beeinträchtigen (7, 8). Dass die oxidierte Albuminfraktion HNA1 allerdings gegenüber den anderen Albuminfraktionen einen höheren Fettsäuregehalt aufweist, war uns bisher noch unbekannt. Wir erklärten uns dies durch die Fettsäureabspaltung von an Albumin haftenden Lipoproteinen während der ON-Inkubation im Rahmen der Präparation der Albuminfraktionen. Die Fettsäuren würden dementsprechend, nachdem sie von den Lipoproteinen abgespalten wurden, sogleich an Albumin binden. Außerdem stellten wir erstmals fest, dass HNA1 verglichen mit HMA und HNA2 auch einen höheren Gehalt an Endotoxinen besitzt. Hierfür machten wir bakterielle Verunreinigungen in Kombination mit der ON-Inkubation bei 37°C im Zuge der HNA1-Präparation verantwortlich. Auch die Tatsache, dass die Korrelation der ELISA-Extinktion mit dem Endotoxingehalt der Albuminfraktionen maßgeblich durch den sehr hohen Endotoxingehalt dreier HNA1-Proben (300-450 pg Endotoxin/mg Albumin) beeinflusst wurde, lässt eine Verunreinigung während der Präparation als Ursache für den gesteigerten Endotoxingehalt annehmen (s. Abb. 28). Bei Endotoxinen handelt es sich um Bestandteile der äußeren Membran gram-negativer Bakterien. Sie zählen zu den Lipopolysacchariden (LPS) und weisen unter anderem im Zuge von Infektionen, kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen erhöhte Serumspiegel im menschlichen Körper auf (37). Dementsprechend zeigen auch Patientinnen und Patienten, die an Morbus Alzheimer leiden, erhöhte Endotoxinwerte im Serum (32). Außerdem gehen Erkrankungen, die gesteigerte Endotoxinspiegel mit sich bringen, darunter zum Beispiel die Parodontitis, mit einem erhöhten Risiko einher an einer Alzheimer-Demenz zu erkranken (38).

Anhand von Mausmodellen konnte zudem bereits ein Zusammenhang zwischen der intraperitonealen Injektion von LPS und einer Beeinträchtigung des Gedächtnisses nachgewiesen werden (39). Durch eine einmalige LPS-Injektion kam es bereits zur Neuroinflammation und weiters zu gesteigerten A β 42-Spiegeln in Hirnrinde und Hippocampus der Mäuse (39). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine periphere LPS-Injektion zu einer Aktivierung der Mikrogliazellen, hirneigener Immunzellen, und infolge des verursachten Entzündungsvorgangs zu einem Untergang von Neuronen im Gehirn der Mäuse führte (40). Endotoxinen wird entsprechend dieser Modelle eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Demenz vom Alzheimer-Typ zugeschrieben. Wie genau Endotoxine den Ausbruch bzw. das Fortschreiten der Erkrankung begünstigen, ist noch unbekannt. In der Literatur existieren bereits Hypothesen infolge derer Endotoxine zwar nicht allein, allerdings in Kombination mit aggregierenden Peptiden wie Amyloid- β für die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen verantwortlich sind (37). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die von uns nachgewiesene, reduzierte Interaktion zwischen A β und den Albuminfraktionen bei Anwesenheit höherer Endotoxinkonzentrationen sein.

Unsere ELISA-Ergebnisse sind hinsichtlich ihrer potenziellen Relevanz für die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimer-Demenz in der folgenden Grafik schematisch dargestellt (s. Abb. 33).

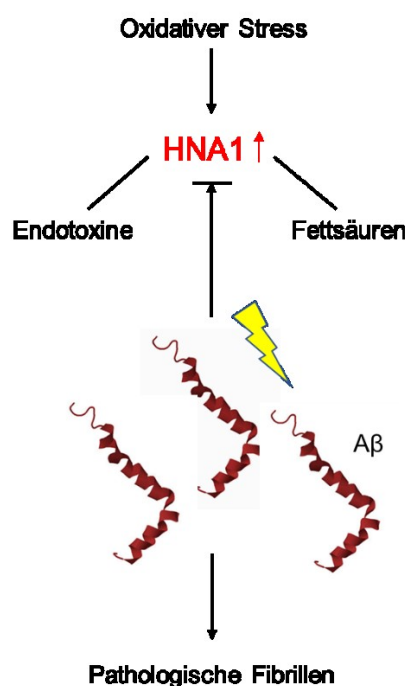


Abb. 33: Schematische Darstellung der ELISA-Ergebnisse im pathophysiologischen Kontext A β -Fibrillen-assoziiierter, neurodegenerativer Erkrankungen. Die Struktur des A β 42-Peptids entstammt der Proteindatenbank (PDB ID: 1IYT) (41).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Unterschiede des Interaktionsausmaßes der Albuminfraktionen mit A β sowohl durch den Redoxzustand der Albuminfraktionen als auch durch die Anwesenheit von Liganden, welche die Interaktion stören, bedingt sein könnten. Entsprechend unserer Ergebnisse führt nämlich nicht nur das vermehrte Vorliegen der oxidierten Albuminfraktionen HNA1 und HNA2 sondern auch gesteigerte Endotoxin- sowie Fettsäurekonzentrationen zu einer verminderten Interaktion des Amyloid- β -Peptids mit Albumin. Wie bereits erwähnt würden diese Umstände in vivo zu vermehrt in freier Form vorliegendem A β und somit zur verstärkten Bildung pathologischer Fibrillen führen. Die Pathogenese der Demenz vom Alzheimer-Typ steht mit all diesen Komponenten, also der Anwesenheit von Fettsäuren, gesteigerten Endotoxinspiegeln sowie erhöhten HNA1- und HNA2-Anteilen im Plasma in Verbindung (7, 18, 25, 32). Allerdings ist das genaue Zusammenspiel dieser einzelnen Faktoren bisher unklar. Daher sollten unsere Ergebnisse in Zukunft durch Versuche mit dem A β bzw. den Liquorproben an Morbus Alzheimer erkrankter Patientinnen und Patienten belegt werden. Die Bestätigung unserer Resultate anhand der Proben betroffener Patientinnen und Patienten könnte zum genaueren Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge der Alzheimer-Erkrankung beitragen und neue Angriffspunkte für potenzielle Therapiemöglichkeiten schaffen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die einzelnen von uns angewandten Nachweisverfahren der A β -Albumin-Interaktion zum Teil unterschiedliche Ergebnisse hervorbrachten. Überraschenderweise führten die bereits etablierten Nachweisverfahren der Amyloid- β -Albumin-Interaktion nicht zu verlässlichen Ergebnissen. Zu diesen zählen das „Quenching“ der Albumineigenfluoreszenz, der ThT-Assay sowie der Western-Blot. Entsprechend der obigen Ausführungen bedürfen diese Methoden zukünftig weiterer Adaptierungen, welche allerdings über den Rahmen dieser Diplomarbeit hinausgehen würden. Im Gegensatz dazu lieferte

die vollständig neu von uns etablierte A β -ELISA-Methode die aussagekräftigsten Ergebnisse. Mittels A β -ELISA-Methode, die uns nach der Etablierung als direktes Nachweisverfahren der A β -Albumin-Bindung zur Verfügung stand, gelang es uns entsprechend unserer Zielsetzung signifikante Unterschiede bezüglich der Interaktion zwischen Amyloid- β und den reduzierten und oxidierten Albuminfraktionen HMA, HNA1 und HNA2 festzustellen.

Literaturverzeichnis

1. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005;366(9503):2112-7.
2. Bender A, Rémi J, Feddersen B, Fesl GM. *Kurzlehrbuch Neurologie*: Elsevier Health Sciences; 2018. p. 275-286.
3. Mayeux R. EPIDEMIOLOGY OF NEURODEGENERATION. *Annual Review of Neuroscience*. 2003;26(1):81-104.
4. Silbernagl S. *Taschenatlas Pathophysiologie*. 5., unveränderte Auflage ed. Lang F, Gay R, Rothenburger A, editors. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2018. p. 372-375.
5. Bohrmann B, Tjernberg L, Kuner P, Poli S, Levet-Trafit B, Näslund J, et al. Endogenous proteins controlling amyloid beta-peptide polymerization. Possible implications for beta-amyloid formation in the central nervous system and in peripheral tissues. *J Biol Chem*. 1999;274(23):15990-5.
6. De Strooper B, Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 11):1857-70.
7. Bode DC, Stanyon HF, Hirani T, Baker MD, Nield J, Viles JH. Serum Albumin's Protective Inhibition of Amyloid- β Fiber Formation Is Suppressed by Cholesterol, Fatty Acids and Warfarin. *J Mol Biol*. 2018;430(7):919-34.
8. Guo C, Zhou HX. Fatty Acids Compete with A β in Binding to Serum Albumin by Quenching Its Conformational Flexibility. *Biophys J*. 2019;116(2):248-57.
9. Milojevic J, Raditsis A, Melacini G. Human serum albumin inhibits A β fibrillization through a "monomer-competitor" mechanism. *Biophys J*. 2009;97(9):2585-94.
10. Chu LW. Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. *Hong Kong Med J*. 2012;18(3):228-37.
11. Boada M, Ramos-Fernandez E, Guivernau B, Munoz FJ, Costa M, Ortiz AM, et al. Treatment of Alzheimer disease using combination therapy with plasma exchange and haemapheresis with albumin and intravenous immunoglobulin: Rationale and treatment approach of the AMBAR (Alzheimer Management By Albumin Replacement) study. *Neurologia*. 2016;31(7):473-81.

12. Costa M, Ortiz AM, Jorquera JI. Therapeutic albumin binding to remove amyloid- β . *J Alzheimers Dis*. 2012;29(1):159-70.
13. Peters T. All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications: Elsevier Science; 1995.
14. Choi TS, Lee HJ, Han JY, Lim MH, Kim HI. Molecular Insights into Human Serum Albumin as a Receptor of Amyloid- β in the Extracellular Region. *J Am Chem Soc*. 2017;139(43):15437-45.
15. Oettl K, Birner-Gruenberger R, Spindelboeck W, Stueger HP, Dorn L, Stadlbauer V, et al. Oxidative albumin damage in chronic liver failure: relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival. *J Hepatol*. 2013;59(5):978-83.
16. Oettl K, Marsche G. Redox state of human serum albumin in terms of cysteine-34 in health and disease. *Methods Enzymol*. 2010;474:181-95.
17. Oettl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol*. 2007;151(5):580-90.
18. Costa M, Horrillo R, Ortiz AM, Pérez A, Mestre A, Ruiz A, et al. Increased Albumin Oxidation in Cerebrospinal Fluid and Plasma from Alzheimer's Disease Patients. *J Alzheimers Dis*. 2018;63(4):1395-404.
19. Kim TS, Pae CU, Yoon SJ, Jang WY, Lee NJ, Kim JJ, et al. Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2006;21(4):344-8.
20. Bhattacharya AA, Grüne T, Curry S. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin¹¹Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology*. 2000;303(5):721-32.
21. Milojevic J, Melacini G. Stoichiometry and affinity of the human serum albumin-Alzheimer's A β peptide interactions. *Biophys J*. 2011;100(1):183-92.
22. Algamal M, Milojevic J, Jafari N, Zhang W, Melacini G. Mapping the interactions between the Alzheimer's A β -peptide and human serum albumin beyond domain resolution. *Biophys J*. 2013;105(7):1700-9.
23. Picón-Pagès P, Bonet J, García-García J, Garcia-Buendia J, Gutierrez D, Valle J, et al. Human Albumin Impairs Amyloid β -peptide Fibrillation Through its C-terminus: From docking Modeling to Protection Against Neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019;17:963-71.

24. Simard JR, Zunszain PA, Hamilton JA, Curry S. Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis. *J Mol Biol.* 2006;361(2):336-51.
25. Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Aggarwal N, et al. Dietary Fats and the Risk of Incident Alzheimer Disease. *Archives of Neurology.* 2003;60(2):194-200.
26. Xue C, Lin TY, Chang D, Guo Z. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *R Soc Open Sci.* 2017;4(1):160696.
27. Gade Malmos K, Blancas-Mejia LM, Weber B, Buchner J, Ramirez-Alvarado M, Naiki H, et al. ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation. *Amyloid.* 2017;24(1):1-16.
28. Matsumoto A, Minami M, Matsumoto R. The beta-amyloid epitope masking activity in human brain is identified as albumin. *Neuroreport.* 1997;8(15):3297-301.
29. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350-4.
30. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides.* 2015;72:4-15.
31. Tönnies E, Trushina E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD.* 2017;57(4):1105-21.
32. Zhang R, Miller RG, Gascon R, Champion S, Katz J, Lancero M, et al. Circulating endotoxin and systemic immune activation in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *J Neuroimmunol.* 2009;206(1-2):121-4.
33. Sen P, Fatima S, Ahmad B, Khan RH. Interactions of thioflavin T with serum albumins: Spectroscopic analyses. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 2009;74(1):94-9.
34. Stanyon HF, Viles JH. Human Serum Albumin Can Regulate Amyloid- β Peptide Fiber Growth in the Brain Interstitium: IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER DISEASE*. *Journal of Biological Chemistry.* 2012;287(33):28163-8.
35. Milojevic J, Costa M, Ortiz AM, Jorquera JI, Melacini G. In vitro amyloid- β binding and inhibition of amyloid- β self-association by therapeutic albumin. *J Alzheimers Dis.* 2014;38(4):753-65.

36. Berde CB, Hudson BS, Simoni RD, Sklar LA. Human serum albumin. Spectroscopic studies of binding and proximity relationships for fatty acids and bilirubin. *J Biol Chem.* 1979;254(2):391-400.
37. Brown GC. The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):180.
38. Ide M, Harris M, Stevens A, Sussams R, Hopkins V, Culliford D, et al. Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151081.
39. Lee JW, Lee YK, Yuk DY, Choi DY, Ban SB, Oh KW, et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *J Neuroinflammation.* 2008;5:37.
40. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia.* 2007;55(5):453-62.
41. Crescenzi O, Tomaselli S, Guerrini R, Salvadori S, D'Ursi AM, Temussi PA, et al. Solution structure of the Alzheimer amyloid beta-peptide (1-42) in an apolar microenvironment. Similarity with a virus fusion domain. *Eur J Biochem.* 2002;269(22):5642-8.

Anhang

Protokoll: Quantifizierung von Albumin

ALBUMIN liquicolor

Photometrischer Farbstest für Albumin
BCG-Methode

Handelsform			
[REF]	10560	1 x 1000 ml	Komplette Testpackung
	156004	4 x 100 ml	Komplette Testpackung

[IVD]

Methode ^{1,2}

Bromkresolgrün bildet mit Albumin in Citratpuffer einen Farbkomplex, dessen Extinktion proportional zur Albuminkonzentration in der Probe ist.

Wirksame Bestandteile

[RG]	4 x 100 ml oder 1 x 1000 ml Farbreagenz	
	Citratpuffer (pH 4,2)	30 mmol/l
	Bromkresolgrün	260 µmol/l

[STD]	1 x 3 ml Standard	
	Albumin	4 g/dl bzw. 40 g/l
	Natriumazid	0,095 %

[STD] ist gegen das internationale Referenzmaterial CRM-DA470k/IFCC standardisiert.

Herstellung der Reagenzien

[RG] und [STD] sind gebrauchsfertig.

Haltbarkeit

[RG] und [STD] sind bei 2...25°C bis zum angegebenen Verfalldatum haltbar.

Kontamination nach Anbruch der Reagenzien muss vermieden werden.

Untersuchungsgut

Serum, Heparin- oder EDTA-Plasma.

Haltbarkeit im Serum: bei 2...8°C bis zu 1 Monat
bei 15...25°C bis zu 1 Woche

Bestimmungsansatz

Wellenlänge: Hg 546 nm, 578 nm

Schichtdicke: 1 cm

Temperatur: 20...25°C

Messung: Gegen Reagenzienleerwert. Für jede Messreihe genügt ein Reagenzienleerwert

Pipettierschema

In Küvetten pipettieren	Reagenzienleerwert	Probe oder [STD]
Probe / [STD]	---	10 µl
[RG]	1000 µl	1000 µl

Mischen, 5 min. bei 20...25°C inkubieren. Innerhalb von 30 min. Extinktion der Probe und des Standards gegen den Reagenzienleerwert messen (ΔE).

Berechnung der Albumin-Konzentration

$$C = 4 \times \frac{\Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{[STD]}}} \quad [\text{g/dl}]$$

oder

$$C = 40 \times \frac{\Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{[STD]}}} \quad [\text{g/l}]$$

Umrechnungsfaktor

Um die erhaltenen Werte in Konzentrationen mit Bezug auf die bisher verwendeten Human Werte umzurechnen, bitte folgende Formel verwenden:

$$\text{Konzentration (CRM 470)} \times 1,218 = \text{Konzentration (Human)}$$

Leistungscharakteristik

Linearität

Der Test ist bis zu einer Albumin-Konzentration von 6,5 g/dl bzw. 65 g/l linear. Bei höheren Konzentrationen Probe 1 + 1 mit physiologischer NaCl-Lösung (0,9%) verdünnen. Ergebnis mit 2 multiplizieren.

Typische Leistungsdaten sind im Verification Report zu finden, zugänglich über

www.human.de/data/gb/vr/su-albu.pdf oder

www.human-de.com/data/gb/vr/su-albu.pdf

Normalbereich im Serum und Plasma

3,8 - 5,1 g/dl bzw. 38 - 51 g/l

Qualitätskontrolle

Alle Kontrollseren mit Albumin-Sollwerten, die nach dieser Methode ermittelt wurden, können eingesetzt werden.

Wir empfehlen unsere HumaTrol Kontrollseren, die aus tierischen Seren hergestellt werden, oder unser SERODOS auf Humanserumbasis.

Automation

Vorschläge zur Applikation der Reagenzien auf Automaten stehen auf Anforderung zur Verfügung. Die Validierung der Applikation liegt in der Verantwortung des Labors.

Hinweise

1. Bilirubin bis zu einer Konzentration von 20 mg/dl stört nicht. Jeweils 100 mg/dl Hämoglobin erhöhen den Albuminwert um 0,1 g/dl. Deshalb sollten stärker hämolytische Seren nicht verwendet werden.
2. Bei stärker hämolytischen oder lipämischen Seren muss ein Probenleerwert gemessen werden. Dazu 10 µl Serum zu 1000 µl physiologischer NaCl-Lösung pipettieren und gegen Wasser messen. Die erhaltene Extinktion ist von der Extinktion der Probe abzuziehen.
3. Der Standard enthält als Konservierungsmittel Natriumazid. Verschlucken, Berührung mit der Haut und Schleimhäuten vermeiden.

Literatur

1. Rodkey F. L., Clin. Chem. **10**, 606 (1964)
2. Doumas B. T. *et al.*, Clin. Chim. Acta **31**, 87 (1971)

SU-ALBU INF 156001 D 06-2012-17



Human

Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
Max-Planck-Ring 21 · 65205 Wiesbaden · Germany
Telefon +49 6122-9988-0 · Telefax +49 6122-9988-100 · e-Mail human@human.de

Protokoll: Quantifizierung von freien Fettsäuren (NEFA)



NEFA-HR(2)

ACS-ACOD-Methode

Zur quantitativen Bestimmung der Freien Fettsäuren (NEFA) im Serum

Bitte die Packungsbeilage vor Gebrauch sorgfältig lesen!



1-4-BIT-06
ESTRUS

Zweckbestimmung

Wako NEFA-HR(2) Test ist ein enzymatischer Farbstest zur quantitativen *in-vitro*-Bestimmung von freien Fettsäuren (NEFA) im Serum.

Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Albumin-gebundene freie Fettsäuren (NEFA) im Serum sind ein wichtiger Energielieferant im peripheren Gewebe. Die NEFA-Konzentration im Serum ist abhängig von einem Aufnahmegleichgewicht zwischen Leber und peripheren Gewebe und einer Freisetzung aus dem Fettgewebe. Bei körperlicher Anstrengung fällt der NEFA Gehalt ab und er steigt an bei Nahrungskarenz, Unterkühlung, bei Stresspanik oder beim Rauchen. Anstieg und Abnahme werden auch beobachtet bei Diabetes, Leber- und endokrinen Erkrankungen.

NEFA wurde mit der Extraktionsmethode bestimmt, die durch den Einsatz organischer Lösungsmittel schwierig durchzuführen war. Weltweit hat sich die enzymatische Methode mit Acyl-CoA-Oxidase (ACOD) wegen der exzellenten Spezifität und der präzisen Durchführung, NEFA-HR(2) ist ein Reagenzkit für die Bestimmung Freier Fettsäuren und basiert auf einer enzymatischen Methode mit 3-Methyl-N-Ethyl-N-(β-Hydroxyethyl)-Anilin (MEHA) als violettes Farbagens. Es werden verlässliche Ergebnisse ohne Interferenzen durch Ascorbinsäure und Bilirubin erzielt.

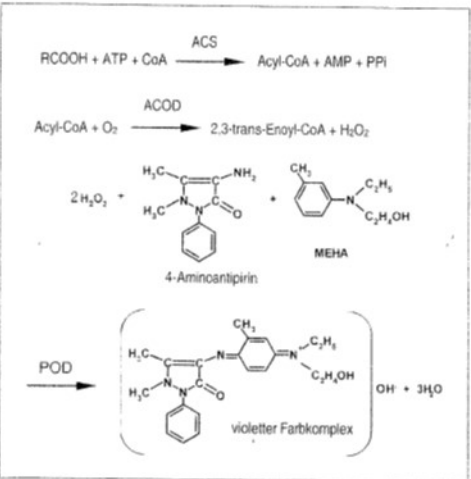
Testprinzip

Unveresterte Fettsäuren (NEFA) in der Probe werden durch Acyl-CoA Synthetase (ACS) zu Acyl-CoA, AMP und Phosphorsäure (PPI) umgesetzt unter Mitwirkung von Coenzym A (CoA) und Adenosin-5'-Triphosphat-Dinatriumsalz (ATP).

Es entsteht Acyl-CoA was unter Einwirkung von Acyl-CoA-Oxidase (ACOD) zu 2,3-trans-Enoyl-CoA und Wasserstoffperoxid umgewandelt wird. In Anwesenheit von Peroxidase (POD), wird unter Einwirkung von 3-Methyl-N-Ethyl-N-(β-Hydroxyethyl)-Anilin (MEHA) und 4-Aminoantipyrin (4-AA) durch oxidative Kupplung ein blau-violetter Farbkomplex gebildet.

Durch die Messung der Absorption der blau-violetten Farbe kann die NEFA-Konzentration bestimmt werden.

Reaktionen



Physikalische und chemische Anzeichen von Instabilität

Das Vorhandensein eines Niederschlags im Reagenz oder Kontrollwerte außerhalb des vom Hersteller angegebenen Bereichs sind ein Hinweis auf die Instabilität des Reagenzes.

Geräte

Das Reagenz ist zur Verwendung auf kommerziell erhältlichen Analysenautomaten vorgesehen. Bezüglich einer Beschreibung der Gerätebedienung und -spezifikation verweisen wir auf das Handbuch des Geräteherstellers. Eine praktische Validierung des Verfahrens vom Anwender am Einsatzort durch Bestimmung einer ausreichenden Anzahl adäquater Kontroll- und Patientenserien ist unerlässlich.

Reagenzien

Inhalt und Lagerbedingungen

R1 Set:	R1a R1:	Farbreagenz A Lösung A	Lagerung bei 2-10 °C
R2 Set:	R2a R2:	Farbreagenz B Lösung B	Lagerung bei 2-10 °C

Bestandteile

R1 Set:

R1a: Farbreagenz A	(nach Rekonstitution)	
ACS	0,53 U/ml	
CoA	0,31 mmol/l	
ATP	4,3 mmol/l	
4-AA	1,5 mmol/l	
ACOD	2,6 U/ml	
Natriumazid (Farbreagenz lyophilisiert)	0,062 % (0,8 %)	
R1: Lösung A	Phosphat-Puffer, pH 7,0	50 mmol/l
	Natriumazid	0,05 %

R2 Set:

R2a: Farbreagenz B	(nach Rekonstitution)	
ACOD	12 U/ml	
POD	14 U/ml	
R2: Lösung B	MEHA	2,4 mmol/l

Herstellung der Reagenzien

- R1: Den Inhalt einer Flasche Farbreagenz A (R1a) mit der Lösung A (R1) gut mischen. Die Gebrauchslösung bei 2-10 °C lagern und innerhalb 1 Monats verbrauchen.
- R2: Den Inhalt einer Flasche Farbreagenz B (R2a) mit der Lösung B (R2) gut mischen. Die Gebrauchslösung bei 2-10 °C lagern und innerhalb 1 Monats verbrauchen.

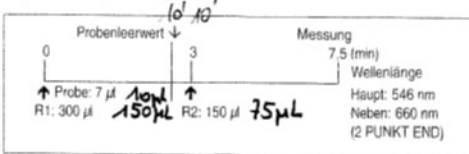
Probengewinnung und -aufbewahrung

Für die Bestimmung sollten Serumproben verwendet werden. Es wird empfohlen die Werte unmittelbar nach der Blutabnahme zu bestimmen, denn Enzyme wie Lipoproteinlipase, Phospholipase hydrolysieren die Fette und es bilden sich Fettsäuren. Zur Lagerung die Serumproben bitte einfrieren. Stabilität: 2 Tage bei 4 °C.

Heparin bewirkt eine Stimulation der Lipoprotein Lipase, was zu einem Anstieg der Freien Fettsäuren unter Heparintherapie führt. Das Blut dieser Patienten kann nur mittels einer Vorbehandlung bestimmt werden.

Standard-Verfahren

Temperatur: 37 °C (Hitachi® 737)



Kalibrator: Wako NEFA Standard (separat lieferbar)

Berechnung der NEFA-Konzentration

Die NEFA-Konzentration wird mit Hilfe einer Kalibrationskurve bestimmt.

$$\begin{aligned} \text{Umrechnungsfaktoren: } & \text{mg/dl} = \text{mmol/l} \times 28,2 \\ & \text{(bezogen auf Oleinsäure, MW (Mol. Gew.) = 282)} \\ & \text{mmol/l (mval/l) = mEq/l} = \text{mg/dl} \times 0,035 \end{aligned}$$

Anwendung auf verschiedenen Analysenautomaten

Geben Sie die Parameter entsprechend der Gebrauchsanweisung des Geräteherstellers ein. Applikationen für Analysenautomaten versenden wir auf Anfrage.

Ergebnisse

Die Endergebnisse werden automatisch berechnet und in Konzentrationseinheiten mEq/l ausgedrückt. Benutzen Sie immer auch die gleiche Maßeinheit für den Kalibrator.

Referenzbereiche*

Männer: 0,1-0,60 mmol/l (2,8-16,9 mg/dl)
Frauen: 0,1-0,45 mmol/l (2,8-12,7 mg/dl)

Da die Werte von Alter, Geschlecht, Ernährung, Land und anderen Faktoren abhängig sind, sollte jedes Labor seine eigenen Werte für dieses Verfahren bestimmen.

Hersteller:

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstr. 12 · 41468 Neuss · Germany
Telephone: +49 2131 311 272 · Fax: +49 2131 311 110
diagnostics_wk@fujifilm.com · www.wako-chemicals.de



Protokoll: Bestimmung des Lipopolysaccharidgehalts des Albumins anhand des Limulus-Amöbozyten-Lysat-Tests

thermoscientific

USER GUIDE

Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit

Endotoxingehalt
LAL

Catalog Numbers A39552S, A39552, and A39553

Doc. Part No. 2162713 Pub. No. MAN0017902 Rev. A.0

WARNING! Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDSs) are available from thermofisher.com/support.

Contents

Product	Cat. No.	Contents	Storage
Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit	A39552S	Kit sufficient for 30 tests of standards and samples in a microplate Contents: Lyophilized <i>E. coli</i> (O111:B4) Endotoxin Standard, 1 vial, 10-50 endotoxin units (EU)/vial Lyophilized Amebocyte Lysate, 1 vial, 1.7 mL/vial upon reconstitution Lyophilized Chromogenic Substrate, 1 vial, 3.4 mL/vial upon reconstitution Endotoxin-Free Water, 1 vial, 50 mL	Store at 4°C.
	A39552	Kit sufficient for 60 tests of standards and samples in a microplate Contents: Lyophilized <i>E. coli</i> (O111:B4) Endotoxin Standard, 2 vials, 10-50 endotoxin units (EU)/vial Lyophilized Amebocyte Lysate, 2 vials, 1.7 mL/vial upon reconstitution Lyophilized Chromogenic Substrate, 2 vials, 3.4 mL/vial upon reconstitution Endotoxin-Free Water, 2 vials, 50 mL/vial	
	A39553	Kit sufficient for 240 tests of standards and samples in a microplate Contents: Lyophilized <i>E. coli</i> (O111:B4) Endotoxin Standard, 8 vials, 10-50 endotoxin units (EU)/vial Lyophilized Amebocyte Lysate, 8 vials, 1.7 mL/vial upon reconstitution Lyophilized Chromogenic Substrate, 8 vials, 3.4 mL/vial upon reconstitution Endotoxin-Free Water, 4 vials, 50 mL/vial	

Product description

The Thermo Scientific Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit is an efficient, quantitative endpoint assay that uses amebocyte lysates derived from blood of the horseshoe crab to quantitate endotoxin in protein, peptides, antibodies or nucleic acid samples. Amebocyte lysates are widely used as a simple and sensitive assay for the detection of endotoxin lipopolysaccharide (LPS), the membrane component of gram-negative bacteria. When endotoxin encounters the amebocyte lysate, a series of enzymatic reactions results in the activation of Factor C, Factor B and pro-clotting enzyme. The activated enzyme catalyzes the release of p-nitroaniline (pNA) from the colorless chromogenic substrate, Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA, producing a yellow color. After stopping the reaction, the released pNA is photometrically measured at 405 nm. The correlation between absorbance and endotoxin concentration is linear in the 0.1-1.0 EU/mL and in 0.01-0.1 EU/mL range. The developed color intensity is proportional to the amount of endotoxin present in the sample and can be calculated using a standard curve.

Important product information

- Note:** Thorough cleanliness in labware, raw materials, and in lab technique is required to accurately detect levels of endotoxin in a given sample.
- Accurate pipetting is critical for maintaining consistent results. A repetitive pipettor can aid in normalizing volumes between samples. Ensure pipetting order and rate of reagent addition remain consistent from well-to-well and row-to-row.
 - All materials (e.g., pipette tips, glass tubes, microcentrifuge tubes and disposable 96-well microplates) must be endotoxin-free.
 - Maintaining the correct temperature is critical for reproducibility. Use a proper heating block at 37±1°C. Cabinet-style incubators are not recommended to perform the assay.
 - Endotoxin adheres to glass and plastic surfaces; before pipetting, vortex solutions to ensure the correct endotoxin concentrations are measured.
 - Glass tubes are recommended for making standard stock solutions.
 - Each lysate lot is tested for functionality using the United States Reference Standard EC-6. The assay lot is then matched to a lot of our Endotoxin Standard (ES) by testing in parallel with the Reference Standard Endotoxin (RSE). The RSE/ES correlation assay determines the potency of each ES lot when used with each matching lysate lot.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Materials required but not supplied

- Disposable endotoxin-free glass tubes or pyrogen-free 1.5 mL microcentrifuge tubes
- Disposable endotoxin-free pipette tips
- Disposable endotoxin-free 96-well microplates or plate strips
- Stable temperature plate heater (37±1°C)
- Pipettor
- Repetitive pipettor (optional) or multichannel pipettor
- Pyrogen-free reservoir
- Microplate reader
- 25% acetic acid (stop solution) ← 25% Essigsäure

Eppis
Spitzer
96 well plate

Prepare materials

Note: Equilibrate all reagents to room temperature before use.

2-fach Bestimmung
↳ Probe Ang/mL

Prepare Endotoxin Standard Stock Solutions

20 EU/vial in 2.0 mL

1. Each *E. coli* Endotoxin Standard vial contains 10-50 EU of lyophilized endotoxin; the actual potency is printed on the label. Reconstitute with room temperature Endotoxin-Free Water by adding 1/10 mL of the EU amount indicated on the vial to make Endotoxin Standard (ES) Solution at 10 EU/mL (e.g., a vial with potency of 15 EU, when reconstituted with 1.5 mL of Endotoxin-Free Water (EFW), will yield a concentration of 10 EU/mL).
 2. Vortex the solution vigorously for 15 minutes (recommended <1500 rpm).
- Note: Reconstituted stock solution is stable for 4 weeks at 2-8°C. Prior to subsequent use, warm the solution to room temperature and vigorously mix for 15 minutes. This is important because the endotoxin adheres to the sides of the glass vial.
3. Prepare High Standards (0.1-1.0 EU/mL) (Table 1) or Low Standards (0.01-0.1 EU/mL) (Table 2) from the Endotoxin Standard Solution (10 EU/mL) using the dilutions and procedures in Tables 1 and 2.

Table 1 High Standards (0.1-1.0 EU/mL)

Vial	Volume of Endotoxin Standard Solution (mL)	Volume of Standard 1 (mL)	Endotoxin-Free Water (mL)	Final Endotoxin Concentration (EU/mL)	Vortex Time (min)
Standard 1	0.20	—	1.80	1.00	2
Standard 2	—	1.00	1.00	0.50	1
Standard 3	—	0.50	1.50	0.25	1
Standard 4	—	0.20	1.80	0.10	1
Blank	—	—	0.50	0	—

5 mL
ppis

Table 2 Low Standards (0.01-0.1 EU/mL)

Vial	Volume of Endotoxin Standard Solution (mL)	Volume of Stock (mL)	Volume of Standard 1 (mL)	Endotoxin-Free Water (mL)	Final Endotoxin Concentration (EU/mL)	Vortex Time (min)
Stock	0.20	—	—	1.80	1.00	2
Standard 1	—	0.20	—	1.80	0.100	2
Standard 2	—	—	1.00	1.00	0.050	1
Standard 3	—	—	0.50	1.50	0.025	1
Standard 4	—	—	0.20	1.80	0.010	1
Blank	—	—	—	0.50	0	—

Reconstitute Lyophilized Amebocyte Lysate

1. Reconstitute Lyophilized Amebocyte Lysate immediately before use with 1.7 mL of Endotoxin-Free Water (EFW) and swirl gently to dissolve the powder. If more than 1 vial is required, pool 2 or more vials before use. **Avoid foaming; do not vortex the solution.**

Note: Make sure to recover all of the powder from the sides and the cap of the vial by gently inverting end-over-end. Extreme care must be taken not to touch the inside part of the cap to avoid contamination.

Note: Reconstituted amebocyte lysate solution is stable for 1 week at -20°C or colder if frozen immediately after reconstitution. Upon thawing, the reconstituted lysate solution may be used only 1 time. Once thawed, gently swirl the reagent to mix before use.

T1 high 12 min
T1 low 30 min



Sample preparation

Adjust the sample pH to 6-8 using endotoxin-free 0.1M NaOH or 0.1M HCl. Avoid pH-electrode contamination of the sample by resting the pH of a small sample taken from the bulk sample.

- Components of undiluted serum interfere in the assay. Serum samples must be diluted 50- to 100-fold to be compatible. The serum must be completely free of red blood cells, and the diluted sample may need to be heat-shocked (70°C for 15 minutes).
- To stop all bacteriological activity in test samples, store samples to be tested at 2-8°C for <24 hours or -20°C for >24 hours.

Chromogenic Substrate

Each vial contains 3.4 mg of lyophilized Chromogenic Substrate. Reconstitute the substrate by adding 3.4 mL of Endotoxin-Free Water.

Note: Reconstituted Chromogenic Substrate is stable for 4 weeks when stored at 2-8°C. **Pre-warm a sufficient substrate amount for the assay to 37°C for no more than 5-10 minutes prior to use.**

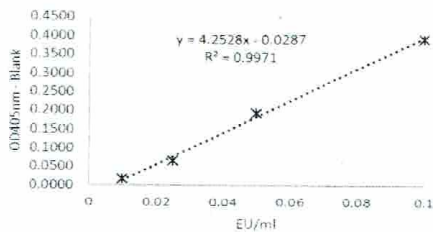
Assay procedure

Note: Equilibrate all reagents to room temperature before use. Ensure pipetting order and rate of reagent addition remain consistent from well-to-well and row-to-row throughout the procedure.

1. Prepare all reagents and standards as directed in previous section immediately before use.
2. Pre-equilibrate plate in a heating block at 37±1°C. **Throughout the assay procedure, maintain the plate at 37±1°C.**
3. Add 50 µL of Endotoxin Standard dilutions, blank, and samples per well.
Note: It is recommended to run each sample and standards in triplicate, including triplicate of a blank (50 µL of Endotoxin-Free Water).
4. Keeping the plate at 37±1°C, add 50 µL of the reconstituted Amebocyte Lysate Reagent per well. Begin timing as the lysate is added to the first well.
5. Once the Amebocyte Lysate Reagent has been added to the plate wells, briefly remove from the plate heater and mix by gently tapping 10 times on the side of the plate, avoiding spilling. Return the plate to the plate heater and incubate at 37±1°C for the time **T1 indicated on the lysate vial.**
Note: T1 High = Time 1 for High Standards and T1 Low = Time 1 for Low Standards.
6. Reconstitute the Chromogenic Substrate as described in Material Preparation with 3.4 mL of Endotoxin-Free Water. Mix gently by tilting and swirling the vial. Pre-warm to 37±1°C for 5 minutes before use.
7. After exactly time T1, add 100 µL per well of pre-warmed reconstituted Chromogenic Substrate Solution.
8. Once the substrate solution has been added into all plate wells, briefly remove from the plate heater and mix gently by tapping 10 times to facilitate mixing. Return to the plate heater at 37±1°C for **T2 = 6 minutes.**
9. At exactly T2 = 6 minutes, add 50 µL per well of Stop Solution (25% acetic acid).
10. Once the stop solution has been added to the plate wells, remove the plate from the plate heater and mix by gently tapping 10 times on the side of the plate.
11. Read the optical density (OD) at 405 nm immediately after assay completion. If the plate is read at a later time, keep covered to avoid evaporation.
12. Subtract the average absorbance of the blank replicates from the average absorbance of all individual standards and sample replicates to calculate mean Δ absorbance.
13. Prepare a standard curve by plotting the average blank-corrected absorbance for each standard on the y-axis vs. the corresponding endotoxin concentration in EU/mL on the x-axis. The coefficient of determination, R^2 , must be ≥ 0.98 .
Note: Do not include the blank OD in the calculation of the regression line.
14. Use the formulated standard curve (linear regression) to determine the endotoxin concentration of each sample.

Table 3 Example data and standard curve for Low Standard.

UE/mL	Avg. OD (405 nm)	Δ	Std. Dev.	%CV
0.1	0.5120	0.3937	0.0137	3
0.05	0.3129	0.1945	0.0015	1
0.025	0.1851	0.0668	0.0001	0
0.01	0.1353	0.0170	0.0003	2
0	0.1183	0	0.0024	—



Protokoll: Photometrischer Farbttest zur Bestimmung des Gesamtbilirubingehalts

312

BILIRUBIN liquicolor

Photometrischer Farbttest für Gesamtbilirubin
DCA-Methode

Handelsform
REF 10012 200 ml Komplette Testpackung
IVD

Methode^{1,2}

Das Albumin-gebundene Bilirubin wird durch ein Detergenz freigesetzt. Das Gesamtbilirubin reagiert mit diazotiertem 2,4-Dichloranilin zu einem roten Azofarbstoff, der als Indikator dient.

Wirksame Bestandteile

[DCA]	1 x 100 ml DCA-Reagenz	
	2,4-Dichloranilin	3,0 mmol/l
	Salzsäure	95 mmol/l
	Detergenz	70 g/l
[NIT]	1 x 100 ml Nitrit-Reagenz	
	Natriumnitrit	2,5 mmol/l
[BLK]	2 x 100 ml Probenleerwert-Reagenz	
	2,4-Dichloranilin	1,5 mmol/l
	Salzsäure	47,5 mmol/l
	Detergenz	35 g/l

Reagenzienvorbereitung

Je nach Bedarf [DCA] mit [NIT] im Verhältnis 1 : 1 mischen. Vor Gebrauch mindestens 15 Min. bei Raumtemperatur lichtgeschützt stehen lassen.

[BLK] ist gebrauchsfertig.

Haltbarkeit

Ungeöffnet sind die Reagenzien bei 2...25°C bis zum angegebenen Verfalldatum haltbar. Die Gebrauchslösung ist lichtgeschützt 10 Tage bei Raumtemperatur, 21 Tage bei 2...8°C haltbar.

Untersuchungsgut

Frisches, hämolysefreies Serum, EDTA- oder Heparin-Plasma.

Keine hämolytischen und lipämischen Proben verwenden! Proben lichtgeschützt aufbewahren!

Bestimmungsansatz

Wellenlänge: 546 nm, Hg 546 nm

Schichtdicke: 1 cm

Temperatur: 20...25°C

Messung: gegen Probenleerwert

Pipettierschema

	Normalansatz		Pädiatrieansatz	
	Probe	[BLK]	Probe	[BLK]
Probe	100 µl	100 µl	20 µl	20 µl
Gebrauchslösung	1000 µl	---	1000 µl	---
[BLK]	---	1000 µl	---	1000 µl

Mischen und 10 Min. bei 20...25°C lichtgeschützt inkubieren. Innerhalb von 60 Min. Extinktion der Probe gegen den Probenleerwert messen:
 $\Delta E_{\text{Probe}} = E_{\text{Probe}} - E_{\text{Probenleerwert}}$

Berechnung der Bilirubin-Konzentration

Falls erforderlich, Reagenzleerwert berücksichtigen (siehe Hinweise).

Bilirubin Konz.	Normalansatz		Pädiatrieansatz	
	c [mg/dl]	c [µmol/l]	c [mg/dl]	c [µmol/l]
546 nm,	ΔE_{Probe}	ΔE_{Probe}	ΔE_{Probe}	ΔE_{Probe}
Hg 546 nm	x 12,5	x 214	x 58	x 992

Testcharakteristik

Linearität

Der Test ist im Normalansatz bis 30 mg/dl bzw. 510 µmol/l linear. Bei Konzentrationen von mehr als 20 mg/dl bzw. 342 µmol/l wird der Pädiatrieansatz empfohlen, um zu hohe Extinktionen zu vermeiden.

++++ Geändert ++++ - Bitte markierten Text sorgfältig lesen!

Typische Leistungsdaten sind im Verification Report zu finden, zugänglich über

www.human.de/data/gb/vr/su-bildc.pdf oder

www.human-de.com/data/gb/vr/su-bildc.pdf

Wenn die Leistungsdaten nicht über das Internet zugänglich sind, stellt sie unser lokaler Distributor kostenlos zur Verfügung.

Normalbereich³

Erwachsene: bis 1,1 mg/dl bzw. 19 µmol/l

Neugeborene: bis 13,3 mg/dl bzw. 227 µmol/l

Qualitätskontrolle

Alle Kontrollseren mit Bilirubin-Sollwerten, die nach dieser Methode ermittelt wurden, können eingesetzt werden.

Wir empfehlen unsere HumaTrol-Kontrollseren, die aus tierischen Seren hergestellt werden, oder unser SERODOS auf Humanserumbasis.

Automation

Vorschläge zur Applikation der Reagenzien auf Automaten stehen auf Anforderung zur Verfügung. Die Validierung der Applikation liegt in der Verantwortung des Labors.

Hinweise

1. Zu niedrige Werte können nach Lichteinwirkung auf das Probenmaterial und in hämolytischen Proben gefunden werden, da Hämoglobin die Diazotierungsreaktion stört.

2. Die Gebrauchslösung verfärbt sich bei Lagerung schwach. Die Funktionsfähigkeit des Tests wird dadurch nicht beeinträchtigt. Es sollte jedoch in jeder Serie ein Reagenzleerwert mitgeführt werden. Dazu wird im Testansatz dest. Wasser anstelle einer Probe eingesetzt. Falls erforderlich, wird die Extinktionsdifferenz des Reagenzleerwertes ($\Delta E_{\text{Reagenzleerwert}}$) von der Extinktionsdifferenz jeder Probe (ΔE_{Probe}) abgezogen. Übersteigt $\Delta E_{\text{Reagenzleerwert}}$ 0,040, sollte frisches Gebrauchsreagenz angesetzt werden.

Sicherheitshinweise

[DCA] und [BLK]-Achtung!

Gefahrenhinweise

H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

Sicherheitshinweise

P234 Nur im Originalbehälter aufbewahren.

P350 Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.

P405 In korrosionsbeständigem/ Behälter mit korrosionsbeständiger Auskleidung aufbewahren.

Literatur

1. Rand R. N., di Pasqua A. Clin. Chem. **8**, 570 (1962)

2. Weigl E. et al., Med. Klin. **70**, 664 (1975)

3. Schellong G., Icterus neonatorum, Thieme Verlag, Stuttgart (1962) 82

SU-BILD INF 101301 D

04-2015-16M

CE

Human

Human Gesellschaft für Biochemie und Diagnostica mbH
Max-Planck-Ring 21 65205 Wiesbaden Germany
Telefon +49 6122-9988-0 Telefax +49 6122-9988-100 e-Mail human@human.de