

3. Materialien

3.1. Chemikalien und Substanzen

Acetonitril	Merck
Amastatin	Sigma
Acrylamid-Fertiggel (15 %ig)	BioRad
Biosafe Coomassie	BioRad
Bovines IgG	Sigma
Bromphenolblau	Merck
BSA Fraktion V (proteasefrei)	Sigma
Citronensäure-Monohydrat	Merck
Complete	Roche
Essigsäure (99 – 100 %)	Merck
Glycerin (wasserfrei)	Merck
Glycin	Serva
Goat-anti-mouse IgG	Sigma
HCl (25 %)	Merck
Karion	BRAHMS AG
KH ₂ PO ₄	Merck
K ₂ HPO ₄	Merck
L-Cystein	Fluka
LUMItest Basiskit (J) BR1 (0,5 % H ₂ O ₂ in 0,1 M HNO ₃)	BRAHMS AG
LUMItest Basiskit (J) BR2 (0,25 M NaOH)	BRAHMS AG
Leupeptin	Sigma
MACN (M = 1365 g/mol)	invent diagnostica GmbH
β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Merck
NaCl	Merck
Na-EDTA	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaH ₂ PO ₄	Merck
NaN ₃	Merck

PBS (10fach konzentriert)	InVivo
PCT sensitiv LIA Kit	BRAHMS AG
Pferdeserum	Sigma
Proteinstandard (Protein Ladder 10 - 200 kDa)	MBI Fermentas
Rabbit-IgG	Sigma
rekombinantes PENK A (Zellkulturüberstand)	InVivo
Schaf-IgG	Sigma
SDS	BioRad
SulfoLink-Coupling-Gel	Pierce
TFA	Merck
Tris	Merck
Triton X-100	Merck
Tween 20	Merck
Waschlösung DYNOfest	BRAHMS AG

3.2. Peptide, Antikörper und Probenmaterial

3.2.1. Peptide

Tabelle 4: Immunisierungspeptide der PENK A- und PTA-Sequenz

Prohormon	Peptid	Peptidsequenz
Proenkephalin A	PENK A ₁₂₁₋₁₃₄	H-EEDDSLANSDDLK-NH ₂
	PENK A ₁₃₉₋₁₅₅	H-CTGDNRERSHHQDGSNE-NH ₂
	PENK A ₁₉₁₋₂₀₅	H-CRRVGRPEWMDYQKR-NH ₂
	PENK A ₂₂₀₋₂₃₆	H-CDEEGESYSKEVPEMEKR-NH ₂
Protachykinin A	PTA ₃₋₂₂	H- CIGANDDLNY WSDWYDSDQI K-NH ₂
	PTA ₂₁₋₃₆	H- CI KEELPEPFEH LLQRI-NH ₂
	PTA ₅₃₋₆₆	H- CDADSSIEKQ VALLK-NH ₂
	PTA ₇₆₋₈₉	H- CHKRHKT DSFVGLMG-NH ₂

Tabelle 5: Standardpeptide

Prohormon	Peptid	Peptidsequenz
Proenkephalin A	PENK A ₁₁₉₋₁₅₉	H-DAEEDDSLANSDDLKELLETGDNRE RSHHQD GSDNEEEVS- NH ₂
Protachykinin A	PTA ₁₋₃₇	H-EEIGANDDLNYWSDWYDSDQI KEELP EPFEHLLQRIA- NH ₂

3.2.2. Antikörper

Tabelle 6: Antikörper gegen Peptide der PENK A-Sequenz

Peptid	Bezeichnung Antikörper
PENK A ₁₂₁₋₁₃₄	50-3-7 *
PENK A ₁₃₉₋₁₅₅	CF108, CF109 und CF110 **
PENK A ₁₉₁₋₂₀₅	CF111, CF112 und CF113 **
PENK A ₂₂₀₋₂₃₆	CF114, CF115 und CF116 **

* monoklonaler Antikörper (InVivo BioTech Services GmbH)

** polyklonale Schafantikörper (MicroPharm Ltd)

Tabelle 7: Antikörper gegen Peptide der PTA-Sequenz (Biogenes GmbH)

Peptid	Bezeichnung Antikörper
PTA ₃₋₂₂	5194 und 5195
PTA ₂₁₋₃₆	5196 und 5197
PTA ₅₃₋₆₆	5198 und 5199
PTA ₇₆₋₈₉	5200 und 5201

3.2.3. Probenmaterial

Serum, EDTA-, und Heparin-Plasma von gesunden Kontrollprobanden für die Immunoassayentwicklung stammen aus der Serumbank der BRAHMS AG.

EDTA-Plasma- und CSF-Proben von Patienten mit einer klinisch diagnostizierten wahrscheinlichen AD sowie von Patienten mit einer DLB, einer FTD und einer VD wurden von Prof. Dr. Harald Hampel (Ludwig-Maximilians-Universität München) für diese Arbeit bereitgestellt. Des Weiteren stellte Prof. Dr. Hampel EDTA-Plasmaproben von dem Alter der Demenzpatienten entsprechenden Probanden ohne neurologische Auffälligkeiten, von Probanden mit subjektiven kognitiven Störungen sowie leichten kognitiven Beeinträchtigungen zur Verfügung.

Darüber hinaus wurden Serum- und CSF-Proben von Patienten mit einer diagnostizierten Meningitis und Enzephalitis von Prof. Dr. Richard Dodel (Philipps-Universität Marburg) bereitgestellt.

Die Entnahme und Verwendung der Proben wurden von den entsprechenden Ethikkommissionen befürwortet. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von allen beteiligten Probanden und Patienten bzw. Angehörigen der Patienten eingeholt.

3.3. Geräte

Analysenwaage 2022	Sartorius
Bio-Sil Sec 400-5 (Gelfiltrationssäule)	BioRad
Dispensette	Brand
Elektrophoreseapparatur	BioRad
Filtereinheit (0,45 µm)	Schleicher & Schuell
Filtereinheit (0,22 µm)	TPP
Fraktionssammler Modell 2110	BioRad
Gefriertrockner Beta I	Christ
Heiz- und Magnetplatte	Ikamag
HPLC-Anlage:	
Data Aquisition Box	Nuclear Interface
Degasser ERC-3215	ERC-Inc.
Fraktionssammler	BioRad
HPLC-Pumpe 510	Waters
Mischkammer	Knauer
Multiwavelength Detector 490E	Waters
Peristaltic-Pumpe	LKB
6-Port-Injektionsventil	Knauer
200 µl-Probenschleife	Knauer
Säulenverteiler Latex-HMV-6	LATEX
Luminometer LB 952T/16	Berthold
Microtiterplatte (Maxisorp)	NUNC
Millex GV4-Filter (0,22 µm)	Millipore
Monovette (Serum, EDTA, Heparin)	Sarstedt
Multipette plus	Eppendorf
µBondapak C18-Säule	Waters
Nap-Gelfiltrationssäulen	Amersham Biosciences
Omnifix-Einmalspritzen (20 ml)	B. Braun
pH-Meter CG840	Schott
Polystyrenröhrchen (mit Stern)	Greiner
Photometer Lambda 25	PerkinElmer
Pipette Reference 1 - 10 µl	Eppendorf

Pipette Reference 10 - 100 μ l	Eppendorf
Pipette Reference 100 - 1000 μ l	Eppendorf
Polyflaschen (125 ml)	HPT Pharma Packaging
Polytubes (15 ml)	Falcon
Polytubes (50 ml)	Falcon
Power Supply EPS 200 (für Elektrophorese)	Pharmacia Biotech
Pumpe Pump P-1	Pharmacia Biotech
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf
Recorder Rec 112	Pharmacia Biotech
Rotator Roto-Torque Model No. 7637-10	Cole-Parmer
Schüttelwasserbad 1092	GFL
Schüttler KS 250	Ika-Labortechnik
SDS-Fertiggel (15 % Tris-HCl)	BioRad
SpeedVac	ThermoSavant
Syringe Einmalspritzen (3 ml)	Becton Dickinson
Thermomixer 5436	Eppendorf
Uvicord SII	Pharmacia Biotech
Variable Pipetten (1 – 10 μ l, 10 – 100 μ l und 100 – 1000 μ l)	Eppendorf
Vortexer Reax 2000	Heidolph
Waage Excellence E 5500S	Sartorius
Waschkamm LUMItest	BRAHMS AG
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q	Millipore
Zentrifuge 5417C	Eppendorf
Zentrifuge Varifuge 3.OR	Heraeus

3.4. Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Immobilisierung der Antikörper

Immobilisierungspuffer (pH 7,8): 10 mM Tris / 100 mM NaCl

Absättigungslösung: 0,5 % BSA/ 3 % Karion

Kopplung der Immunisierungspeptide an SulfoLink-Coupling-Gel

Kopplungspuffer (pH 8,5): 50 mM Tris/ 5 mM Na-EDTA

Absättigungslösung: 50 mM L-Cystein (in Kopplungspuffer)

Waschlösung: 1 M NaCl

Lagerungspuffer: 0,1 % NaN₃

Affinitätsreinigung der spezifischen Antikörper mittels SulfoLink-Coupling-Gel

Na-EDTA-Lösung (pH 8,5): 500 mM

Protease-Inhibitor-Cocktail: 1 Tablette Complete/ 2ml Bindungspuffer

Bindungspuffer (pH 6,8): 100 mM K₂HPO₄/ 0,1 % Tween

Elutionspuffer (pH 2,2): 50 mM Citronensäure

Regenerationspuffer (pH 2,2): 50 mM Citronensäure/ 1 M NaCl

Lagerungspuffer: 0,1 % NaN₃

Acridiniumester-Markierung

HPLC-Laufmittel (pH 7,8):	50 mM Tris/ 250 mM NaCl/ 0,1 % NaN ₃
Markierungspuffer (pH 8,0):	200 mM Na-Phosphat-Puffer
Stopplösung (pH 7,8)	1 M Tris

Puffer und Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

Laufpuffer:	25 mM Tris/ 90 mM Glycin/ 0,1 % SDS
Probenpuffer (pH 6,4):	120 mM Tris 2 % SDS 20 % Glycerin 20 % β -Mercaptoethanol 0,002 % Bromphenolblau
Entfärbelösung:	5 % Methanol / 7,5 % Essigsäure

Puffer und Lösungen für die Optimierung der Immunoassays

Assaypuffer (pH 7,2):	PBS 10 mM Na-EDTA 0,09 % NaN ₃ 200 μ M Leupeptin 100 μ M Amastatin 0,5 % BSA 0,1 % bovines IgG 0,1 % Schaf-IgG 0,05 % Kaninchen-IgG
-----------------------	--

Stammlösungspuffer (pH 8,0): 20 mM K₂HPO₄
0,5 % BSA
100 µM Leupeptin
50 µM Amastatin

Puffer und Lösungen für die RP-HPLC

Laufmittel A: 5 % Acetonitril/ 0,1 % TFA

Laufmittel B: 95 % Acetonitril/ 0,1 % TFA

3.5. Software

Microsoft Office	Microsoft
Graph Pad Prism 4.05	Graph Pad Software
Protean	DNASTAR
Multicalc Routine 2.0	Wallac
NINA Chromatografic System 4.1	Nuclear Interface
EndNote	Thomson Scientific