

### 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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
L-Cystein	Fluka
LUMItest Basiskit (J) BR1 (0,5 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 0,1 M HNO <sub>3</sub> )	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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
NaN <sub>3</sub>	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 <sub>121-134</sub>	H-EEDDSLANSDDLK-NH <sub>2</sub>
	PENK A <sub>139-155</sub>	H-CTGDNRERSHHQDGSNE-NH <sub>2</sub>
	PENK A <sub>191-205</sub>	H-CRRVGRPEWMDYQKR-NH <sub>2</sub>
	PENK A <sub>220-236</sub>	H-CDEEGESYSKEVPEMEKR-NH <sub>2</sub>
Protachykinin A	PTA <sub>3-22</sub>	H- CIGANDDLNY WSDWYDSDQI K-NH <sub>2</sub>
	PTA <sub>21-36</sub>	H- CI KEELPEPFEH LLQRI-NH <sub>2</sub>
	PTA <sub>53-66</sub>	H- CDADSSIEKQ VALLK-NH <sub>2</sub>
	PTA <sub>76-89</sub>	H- CHKRHKT DSFVGLMG-NH <sub>2</sub>

Tabelle 5: Standardpeptide

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

### 3.2.2. Antikörper

Tabelle 6: Antikörper gegen Peptide der PENK A-Sequenz

Peptid	Bezeichnung Antikörper
PENK A <sub>121-134</sub>	50-3-7 *
PENK A <sub>139-155</sub>	CF108, CF109 und CF110 **
PENK A <sub>191-205</sub>	CF111, CF112 und CF113 **
PENK A <sub>220-236</sub>	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 <sub>3-22</sub>	5194 und 5195
PTA <sub>21-36</sub>	5196 und 5197
PTA <sub>53-66</sub>	5198 und 5199
PTA <sub>76-89</sub>	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 $\mu$ l	Eppendorf
Pipette Reference 100 - 1000 $\mu$ 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 $\mu$ l, 10 – 100 $\mu$ l und 100 – 1000 $\mu$ 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 % NaN<sub>3</sub>

#### 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 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ 0,1 % Tween

Elutionspuffer (pH 2,2): 50 mM Citronensäure

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

Lagerungspuffer: 0,1 % NaN<sub>3</sub>

**Acridiniumester-Markierung**

HPLC-Laufmittel (pH 7,8):	50 mM Tris/ 250 mM NaCl/ 0,1 % NaN <sub>3</sub>
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 % Bomphenolblau
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 <sub>3</sub> 200 μM Leupeptin 100 μM Amastatin 0,5 % BSA 0,1 % bovines IgG 0,1 % Schaf-IgG 0,05 % Kaninchen-IgG
-----------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Stammlösungspuffer (pH 8,0):	20 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 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