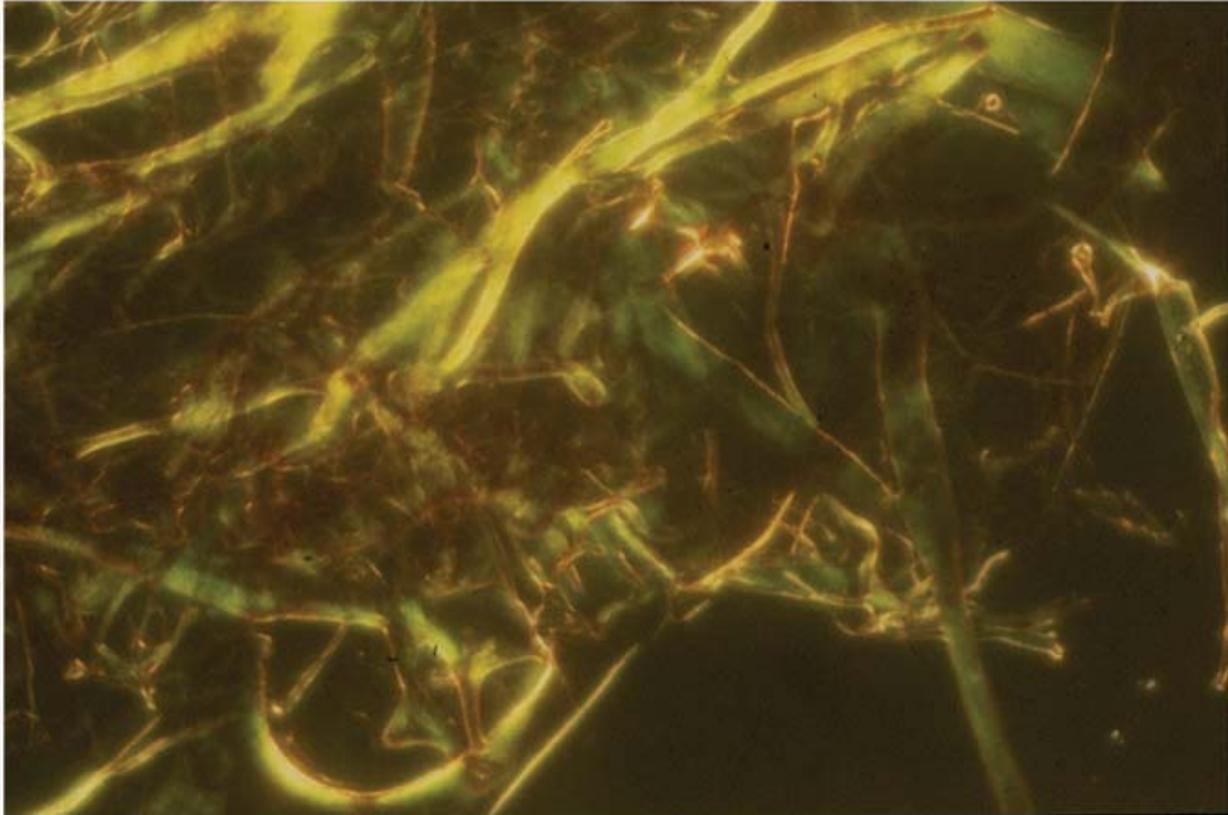


**„Raft“-Lipide und Cholesterol-Ester als Bestandteile
von humanen *ex vivo* Amyloid-Fibrillen**



Dissertation

von

Gerald Gellermann

**„Raft“-Lipide und Cholesterol-Ester
als Bestandteile von
humanen *ex vivo* Amyloid-Fibrillen**

Untersuchung von Lipiden als generelle Komponente in *ex vivo* Amyloid-Fibrillen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von

Diplom-Biologe Peter Gerald Gellermann
geboren am 8. Juli 1972, in Ettlingen.

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2003

Zugl.: Jena Univ., Diss., 2003

ISBN 3-89873-752-7

Gutachter:**Prof. Dr. Stephan Diekmann**

Institut für Molekulare Biotechnologie

Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Prof. Dr. Alfred Fahr

Institut für Pharmazeutische Technologie

Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Prof. Dr. Detlev Riesner

Institut für Physikalische Biologie

Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Tag des Rigorosums: 28. April 2003

Tag der öffentlichen Verteidigung: 26. Mai 2003

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2003

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2003

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89873-752-7

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iii
Zusammenfassung	vii
Danksagung	viii
1. Einführung	1
1.1 Allgemeine Charakteristika und Definition von Amyloidosen	1
1.2 Strukturaufbau von Proteinen	4
1.3 Fibrillenaufbau und Struktur	4
1.4 Nebenkomponenten	6
1.5 Prionen-Krankheiten und Proteinfehlfaltung als generelles Prinzip der Amyloidosen.....	8
1.6 Charakteristika der in vorliegenden Arbeit untersuchten Krankheiten	10
1.7 Lipide.....	11
1.7.1 Lipidklassen können 3 Kategorien zugeordnet werden	11
1.7.2 Aufbau biologischer Membranen	13
1.7.3 „Lipid rafts“ sind Mikrodomänen mit besonderer Funktion und Lipidorganisation.....	14
1.7.4 Lipoproteine.....	15
1.8 Zentrale Frage und Problemstellung.....	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Reagenzien.....	17
2.1.2 Lipidstandards	17
2.1.3 Physiologische Gewebeproben für Lipidextraktionen	18
2.1.4 Sonstige Materialien	18
2.1.4. Amyloid-Proben	18
2.1.5 Immunoaffinitätsgereinigte „paired helical filaments“	19
2.2 Methoden	20
2.2.1 Umgang mit Lipiden.....	20
2.2.2 Lipidextraktion von unlöslichen Proben.....	21
2.2.3 Lipidextraktion von gelösten Proben und Entfernung wasserlöslicher Verunreinigungen....	21
2.2.4 Totallipidextraktion aus Hirn	22
2.2.5 HPTLC zur Separation und zum Nachweis von Lipidklassen	22
2.2.6 Quantitative Lipidbestimmungen und Datenprozessierung	23
2.2.7 Micro-High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) der Lipidproben	24
2.2.8 Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI-MS) von Lipidproben	25

2.2.9 Unilaminare Liposome	26
2.2.10 Synthetisches Amyloid	27
2.2.11 Präparation eines nichtkovalenten Proteinfibrillen-Lipid-Komplexes	27
2.2.12 Kontrolle: Wasseraufreinigungsmethode nach Pras an „gesunden“ Tiergeweben	27
2.2.13 Spezifische Kongorotfärbung für Polarisationsmikroskopie zum Amyloidnachweis.....	28
2.2.14 Lichtmikroskopie und Polarisationsmikroskopie	28
2.2.15 Elektronenmikroskopie (EM)	28
2.2.16 Protein-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	29
2.2.17 Silberfärbung	30
2.2.18 Ninhydrin-Assay zur Protein-Quantifizierung	30
2.2.19 Proteinquantifizierung mit microBCA Test (Firma Uptima)	31
3. Ergebnisse.....	32
3.1 Charakterisierung der Proteinkomponente aufgereinigter <i>ex vivo</i> Fibrillen.....	33
3.1.1 Synthetisches Amyloid	33
3.1.2 Identifizierung amyloider Strukturen durch Kongorotbindung und Polarisationsmikroskopie.....	33
3.1.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den humanen <i>ex vivo</i> Amyloid-Fibrillen	36
3.1.4 Reinheitsgrad der <i>ex vivo</i> Fibrillen	38
3.1.5 Proteinquantifizierung der <i>ex vivo</i> Fibrillen	41
3.1.6 Parallelisierung und Aussagekraft der Mikro-Proteinquantitätstest.....	43
3.1.7 Zusammenfassung der Charakterisierung der Proteinkomponente	44
3.2 Methodenentwicklung zur qualitativen und quantitativen Lipidanalyse.....	45
3.2.1 Handhabung kleiner Lipidmengen	45
3.2.2 Extraktion kleiner Lipidmengen	45
3.2.3 Analyse kleiner Lipidmengen.....	47
3.2.4 Zusammenfassung der Methodenentwicklung	56
3.3 Lipidanalyse der <i>ex vivo</i> Amyloid-Proben	57
3.3.1. <i>Ex vivo</i> Amyloid-Fibrillen enthalten selektive Lipidmuster, „raft“-Lipide und Cholesterolester.	57
3.3.2 Die Lipidextrakte der Proben von Pras und Linke zeigen ein einheitliches Bild.....	61
3.3.3 Die Gesamtlipidmenge ist in den verschiedenen <i>ex vivo</i> Amyloid-Proben unterschiedlich .	62
3.3.3 Krankheitstyp und Patientenklasse haben keinen Einfluss auf das selektive Lipidmuster	62
3.3.4 Lipidextrakte der intrazellulären PHF haben ebenfalls ein selektives, jedoch abweichendes Lipidmuster	63

3.3.5 Kontrollexperimente: die selektiven Lipidmuster sind keine Artefakte durch die Aufreinigung.....	63
3.3.6 Degradation gelagerter Lipide.....	65
3.3.7 Die Ergebnisse werden durch Micro-HPLC und MALDI-MS bestätigt.....	66
3.3.8 Zusammenfassung: <i>ex vivo</i> Amyloid-Fibrillen haben ein selektives Lipidmuster.....	69
4. Diskussion	70
4.1 Die <i>ex vivo</i> Amyloid-Fibrillen repräsentieren die nach heutigem Stand der Technik extrahierbaren fibrillären Bestandteile von Amyloid-Geweben	71
4.2 In den <i>ex vivo</i> Amyloid-Proben sind neben der proteinösen Hauptkomponente Nebenkomponenten enthalten.....	72
4.3 Die etablierten Lipid-Analysemethoden werden den an sie gestellten Anforderungen für eine Analyse einzigartiger Proben gerecht	73
4.4 Die in <i>ex vivo</i> Amyloid-Fibrillen gefundene Lipidkonstellation unterscheidet sich zu der von physiologischen Geweben.....	75
4.5 Die Signifikanz der gefundenen Lipidmuster.....	77
4.5.1 Lipide sind anfällig gegen verschiedene Degradationsprozesse.	78
4.5.2 Der Einfluss von Degradationsprozesse auf die Amyloid-Proben	79
4.5.3 Bei dem gefundenen Lipidmuster handelt es sich um einen selektiven Effekt der mit den aufgereinigten <i>ex vivo</i> Amyloid-Fibrillen assoziiert ist.....	80
4.6 Das mit Amyloid-Fibrillen assoziierte Lipidmuster deutet auf eine Rolle von “ <i>lipid rafts</i> “ bei der Pathogenese der Amyloidosen hin.....	81
4.6.1 Anhand des Lipidmusters kann keine endgültige Aussage über eine extra – oder intrazelluläre Anlagerung der Lipid getroffen werden	82
4.6.2 Lipid-Mikrodomänen sind in die Pathogenese auch anderer Amyloidosen involviert	83
4.6.3 Die Daten sprechen für eine generelle Rolle der „ <i>lipid rafts</i> “ bei Amyloidosen	84
4.7 Der Nachweis an Cholesterol-Estern in den <i>ex vivo</i> Amyloid-Fibrillen deuten auf eine Interaktion mit Lipoproteinen hin	85
4.8 Schlussfolgerung und Hypothesen	86
4.9 Ausblick.....	87
5. Literaturverzeichnis	89
6. Anhang.....	101
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	101
Abkürzungsverzeichnis	103
Selbstständigkeitserklärung	107

Zusammenfassung

Amyloidosen sind degenerative Proteinspeicherkrankheiten, die vorrangig im Alter auftreten. Sie stellen ein wachsendes medizinisches Problemfeld mit bedeutender volkswirtschaftlicher Relevanz dar. Zu den bekanntesten Vertretern zählen die Alzheimer- und die Prion-Krankheit. Bis heute sind mehr als 20 Amyloid-Proteine beschrieben. Beim Auftreten der Krankheit aggregieren diese und lagern sich im Gewebe in der für Amyloidosen typischen Fibrillenform mit einem hohen β -Faltblattanteil ab. Die Struktur der Amyloid-Fibrillen ist unabhängig von den Fibrillenproteinen, klinischen Symptomen, Geweben oder der induzierten bzw. spontanen Entstehung. Der Ablagerungsprozess kann intra- und extrazellulär ablaufen, auf einzelne Organe beschränkt oder systemisch sein. Die Folge sind Gewebeschäden und Tod.

Bis heute ist der pathogene Mechanismus der Amyloidosen noch weitestgehend unverstanden. In der vorliegenden Arbeit wird die Frage nach der Rolle von Lipiden an der Pathogenese der Amyloidosen aufgeworfen.

Ziel der Promotion war eine Analyse von Proteinen und Lipiden humaner *ex vivo* Amyloid-Fibrillen, um Rückschlüsse auf den pathogenen Mechanismus ziehen zu können. Die Amyloid-Proben wurden von Prof. Dr. Reinhold P. Linke, Prof. Dr. Mordechai Pras und Prof. Dr. Peter Davies aus von Amyloidosen betroffenem Gewebe extrahiert. Da das Patientenmaterial nur in geringer Menge vorlag, mussten für eine sensitive und quantitative Analytik Mikromethoden etabliert werden, die eine genaue Bestimmung der Protein- und Lipid-Komponenten in Amyloid-Fibrillen erlauben.

Das erhaltene Material wurde als Amyloid charakterisiert und mit proteomanalytischen Methoden konnte die Identität der Fibrillenproteine bestätigt werden. Eine Quantifizierung der Proteine zeigte, dass noch weitere Komponenten mit diesen vergesellschaftet aufgereinigt wurden.

Bei Untersuchung des Lipidanteils der Amyloid-Fibrillen konnte in allen Proben ein selektives Lipidmuster gefunden werden, das sich von der Lipidkonstellationen von Kontroll-Gewebe unterscheidet. Auffällig war der geringe Anteil an Phospholipiden. Die Lipid-Mikrodomänen („lipid rafts“) bildenden Lipide Cholesterol und Sphingomyelin konnten stark angereichert nachgewiesen werden. Zusätzlich fanden sich in den humanen *ex vivo* Amyloid-Fibrillen hohe Werte an Cholesterol-Estern.

Die selektive Assoziation dieser Lipide mit den Amyloid-Fibrillen, die unabhängig vom Fibrillenprotein ist, weist auf einen generellen Ablauf der pathologischen Prozesse von Amyloidosen in „lipid rafts“ hin. Dabei kommt den gefundenen Cholesterol-Estern, die vorrangig im Zentrum von Lipoproteinen lokalisiert sind, eine besondere Rolle bei der Aggregation der untersuchten Serumsproteine zu.

Danksagung

Die Anfertigung meiner Dissertation am Institut für Molekulare Biotechnologie Jena e.v. in der Abteilung Molekularbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Stephan Diekmann war ein aufregender und höchst interessanter Abschnitt meines Lebens. Prof. Stephan Diekmann möchte ich für die Möglichkeit danken, die interessante Fragestellung der vorliegenden Arbeit in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu dürfen. Des Weiteren möchte ich mich für die nette Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sein Interesse am Fortgang der Arbeit sowie seine ständige Diskussionsbereitschaft herzlich bedanken.

Ganz besonders bin ich Dr. Thomas Appel zu Dank verpflichtet. Durch seine Forschungsergebnisse zu Lipiden in Prion-Fibrillen brachte er die spannende Fragestellung der vorliegenden Arbeit auf. Er führte mich in das Thema der Amyloidosen ein und hatte stets ein offenes Ohr für auftretende Probleme und deren Lösung. Dankbar bin ich ihm auch für viele Ratschläge zu chemischen Analysen und anregende Diskussionen.

Die Analyse von Lipiden in humanen Amyloid-Proben war nur möglich durch die großzügige Überlassung ausreichender Mengen dieses Materials. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhold P. Linke stellte 15 wasseraufgereinigte humane Amyloid-Proben bereit. Hierfür herzlichen Dank.

In gleicher Weise bin ich auch Prof. Dr. Mordechai Pras und Dr. Shmuel Strasburg für die Überlassung von 15 weiteren humanen wasseraufgereinigten Amyloid-Proben dankbar.

Prof. Dr. Peter Davies möchte ich herzlich für die in seiner Arbeitsgruppe immunoaffinitätsaufgereinigte Präparation von „paired helical filaments“ danken.

Vor allem bin ich Christian Leisner und Tim Luetkepohl zu großem Dank verpflichtet, die während 11monatiger hilfswissenschaftlicher Tätigkeiten und eines Sommerpraktikums viel zur Verbesserung der dünnschichtchromatographischen Techniken beitrugen. Durch ihr Engagement und ihren Einsatzwillen war es möglich, die anfallenden großen Datenmengen bei der quantitativen Analyse der Lipidextrakte aus den Amyloid-Proben zu erstellen und auszuwerten. In dieser Zeit, in der sie bei vielen wissenschaftlichen Experimenten selbstständig arbeiteten, wurden sie zu guten Freunden.

Emilia Niekrasz, die ich während eines Socrates-Praktikums betreuen durfte, bin ich für die Evaluierung der Nachweisgrenzen der polaren Lipidklassen bei MALDI-MS und die Messungen der mit micro-HPLC separierten Lipidklassen aus den Lipidextrakten einzelner Amyloid-Proben dankbar.

Dr. Karl-Heinz Gührs möchte ich für die Unterstützung bei der micro-HPLC und die Einführung in die Bedienung des MALDI-MS sowie für seine vielen guten Ratschläge herzlich danken.

Brigitte Künzel danke ich für ihre Unterstützung bei der Protein-Gelelektrophorese sowie Kathleen Buder für ihre Einführung in die Elektronenmikroskopie. Dr. Marcus Fändrich bin ich für viele wertvolle Diskussionen zum Thema Amyloid dankbar.

Die Arbeit wurde durch die Ausstattung von EXIST-HighTEPP (Existenzgründer aus Hochschulen-High Technology Entrepreneurship Postgraduate Programm) mit einem Stipendium und finanziellen Mitteln für Forschung und Reisen möglich. Der Programm-Leitung möchte ich danken, über die wissenschaftliche Seite der Biotechnologie hinaus Erfahrungen sammeln zu können.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Biotechnologie für ihr Interesse und ihre Diskussionsbereitschaft an der vorliegenden Arbeit sowie das freundschaftliche Klima während der Arbeit und auch bei vielen privaten Gelegenheiten.

Meiner Familie möchte ich für ihr Verständnis und ihre Unterstützung in allen Lebenslagen meinen größten Dank aussprechen.

1. Einführung

1.1 Allgemeine Charakteristika und Definition von Amyloidosen

Amyloidosen sind Proteinspeicherkrankheiten, bei denen normalerweise lösliche Proteine oder Peptide polymerisieren und unlösliche Ablagerungen bilden, deren Ultrastruktur fibrillär ist (Sipe und Cohen, 2000; Saeger und Röcken, 1998;). Der Ablagerungsprozess kann intra- und extrazellulär ablaufen, auf einzelne Organe beschränkt oder auch systemisch sein (Braun, 1972). Die Folge von Amyloidosen sind Gewebeschäden und oft der Tod. Amyloid besteht aus biophysikalisch definierten, biochemisch uneinheitlichen Proteinen, die im Gewebe zumeist extrazellulär in Fibrillenform mit β -Faltblattstruktur abgelagert sind. Amyloid wird definiert durch:

- ein amorphes Erscheinungsbild in der Lichtmikroskopie, wenn es mit gängigen Proteinfarbstoffen in Gewebeschnitten gefärbt wird.
- Affinität zu Kongorot, mit dem es eine feste Bindung eingeht und dann in der Polarisationsmikroskopie - aufgrund von anisotropen Eigenschaften - eine charakteristische grüne Polarisationsfarbe zeigt.
- eine fibrilläre Ultrastruktur mit Fibrillendurchmesser von ungefähr 10 nm und unterschiedlicher Länge.
- einen hohen Anteil an β -Faltblättern, die ein charakteristisches Infrarotspektrum und Röntgenbeugungsbilder hervorrufen.

Die Amyloid-Fibrillenstruktur ist unabhängig von den klinischen Symptomen, Geweben, Fibrillenproteinen oder der induzierten beziehungsweise spontanen Entstehung.

Autopsien, deren Befund auf eine Amyloidose schließen lassen, wurden schon 1639 von Fontanus erwähnt (Schwartz, 1970). Während des 17ten und 18ten Jahrhunderts wurden immer wieder Fälle vergrößerter Leber mit einem „wachsartigem“ oder „speckigen“ Aussehen beschrieben, die auf einer Ausprägung einer Amyloidose beruhen könnten. Die meisten klinischen und pathologischen Texte erwähnt Rokitansky (Rokitansky, 1842), der als erster das beschrieb, was mit einiger Sicherheit als „Amyloidose“ bezeichnet werden kann. Der Begriff „Amyloid“ liegt in der Historie der Amyloidosen begründet. Rudolph Virchow beobachtete 1854 erstmalig das stärkeähnliche Farbverhalten bei der Iod-Schwefelsäure-Reaktion von *Corpora amylacea* im Gehirn und führte für die auch andere organpathologische Veränderungen betreffende Substanz den Begriff „Amyloid“ ein (Virchow, 1854). Dies geht zurück auf die Bemerkungen von Schleiden, eines Botanikers aus Jena, über die Indikation von Stärke durch

eine blaue Farbreaktion bei der Iod-Schwefelsäure-Reaktion (Schleiden, 1838). Der Begriff „Amyloid“ (griechisch Amylon = Stärke) bedeutet stärkeähnlich, obwohl schon Virchow eher eine Celluloseähnlichkeit [„das schöne Violett ... welches von der Cellulose bekannt ist ...“ (Virchow 1854 a)] beschrieb.

Friedreich und Kekule konnten (1859) als hauptsächliche Grundsubstanz Protein in Amyloid nachweisen. Trotzdem herrschte durch die Prägung des Begriffs Amyloid und die Beschreibung von „wachsartigen“ und „speckigen“ Ablagerungen über ein Jahrhundert lang Unsicherheit über die eigentliche Natur des Amyloid. Obwohl bis heute auf biochemischem Weg außergewöhnliche Fortschritte erzielt wurden, ist es noch nicht gelungen, die Struktur und Pathogenese des Amyloid vollständig aufzuklären.

Amyloidosen stellen als degenerative Alterskrankheiten ein wachsendes medizinisches Problemfeld in den Industrieländern mit großer volkswirtschaftlicher Relevanz dar. Zu den bekanntesten Vertretern zählen die neurodegenerativen Krankheiten Morbus Alzheimer und die Prion-Krankheiten. Auch diabetische Schäden, Immunglobulin Leicht-Ketten und andere werden dazugezählt. Bislang wurden mehr als 20 verschiedene Proteine, die amyloidogen wirken können, beschrieben (Tabelle 1).

Jedem Fibrillenprotein kann ein autologes Vorläuferprotein zugeordnet werden. Alle bisher beschriebenen Vorläuferproteine treten in physiologischer Weise im Organismus auf. Die Nomenklatur der Amyloidosen wird mit einem Buchstabenschlüssel chiffriert und orientiert sich an den Vorläuferproteinen (Kazatchkine *et al.*, 1993). Das Fibrillenprotein wird durch ein vorangestelltes „A“ kenntlich gemacht, dem die Abkürzung des Vorläuferproteins folgt. Tabelle 1 gibt einen Überblick über Polypeptidsequenzen, die nach der Definition des 'International Nomenclature Committee on Amyloidosis' für die Entstehung von *in vivo* Amyloid-Fibrillen verantwortlich gemacht werden (Westermarck *et al.*, 1999). Es bleibt zu bemerken, dass bei Lysozym- und Transthyretin-Ablagerungen Fälle beschrieben wurden, bei denen die Ablagerungen des Fibrillenproteins aus dem Volllängenprotein bestanden (Westermarck *et al.*, 1990).

Krankheiten wie Parkinson („ α -synuclein“) und Huntigton („huntigtin“-Protein) lassen sich auch zu den Proteinspeicherkrankheiten zählen. Die zugrunde liegenden Proteine wurden aber noch nicht vom 'International Nomenclature Committee on Amyloidosis' unter die amyloiden Polypeptidsequenzen aufgenommen. Sie stehen allerdings auf der Liste möglicher Amyloid-Proteine und es bleibt abzuwarten, ob die zugrundeliegenden Polypeptidsequenz und deren fibrilläre Ablagerungen, die Definitionen einer Amyloidose erfüllen.

Tabelle 1: Überblick über Vorläufer und Fibrillenprotein und die mit ihnen assoziierten Krankheitenern.

Amyloid-Protein	Vorläuferprotein	Krankheiten	Besonderheiten
AL	Immunglobulin Leicht-Ketten	Monoklonale systemische / noduläre AL/AL κ /A γ -Amyloidose	entartete B-Zell-Klone produzieren identische Peptide im Überschuss
AH	Immunglobulin Schwere-Ketten	Monoklonale systemische Amyloidosen	entartete B-Zell-Klone produzieren identische Peptide im Überschuss
ATTR	Transthyretin	Senile systemische Amyloidose, Familiäre Neuropathie, Familiäre cardiovasculäre Amyloidose	fortgeschrittenes Alter, patholog. Mutationen über 50 Varianten
AA	(Apo)serum AA	Reaktive systemische AA-Amyloidose, Chronisch-inflammatorisches Syndrom, Familiäres Mittelmeerfieber	chronische Entzündung, pathologische Mutationen
Aβ2m	β 2-Mikroglobulin	Hämodialyse-bedingte Amyloidose, Prostata-Amyloidose	β -Kette MHC I-Komplex durch (Fehl)-Dialyse im Serum angereichert
AApoAI	Apolipoprotein AI	Fam. Amyloid-Neuropathie, Fam. viscerale Amyloidose	pathologische Mutationen
AGel	Gelsolin	Familiäre finnische kraniale Amyloidneuropathie	pathologische Mutationen
ALys	Lysozym	Familiäre viscerale Amyloidose / Nephropathie	pathologische Mutationen
AFib	Fibrinogen α -Kette	Familiäre generalisierte / Nieren-Amyloidose	pathologische Mutationen
ACys	Cystatin C	Hereditäre (isländische) cerebrale Amyloid-Angiopathie	pathologische Mutation führt zu verkürztem Fragment
ABri	Brit. Amyloid-Protein	Familiäre britische Demenz	pathologische Mutationen, Stopcodon überlesen
ADan	ADanPP	Familiäre Dänische Demenz	lokalisiert
Aβ	A β -Vorläuferprotein (A β PP)	Alzheimer-Krankheit, Familiäre Alzheimer-Krankheit, Down Syndrom	fortgeschrittenes Alter, pathologische Mutationen
APrP	Prionprotein	Creutzfeldt-Jakob Krankheit, neue Variante der CJD, Kuru, Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)	infektiös, fortgeschrittenes Alter, pathologische Mutationen,
ACal	Calcitonin-Vorläuferprotein	Medulläres Schilddrüsen-Karzinom	sekretiertes Hormon, durch Tumor im Überschuss produziert
AANF	Atrialer natriuretischer Faktor	Vorhof-Amyloidose	fortgeschrittenes Alter
AIAPP	Islet Amyloid Polypeptid	Diabetes (Typ II), Insulinomas	Langerhansche Inseln
APro	Prolaktin	Prolaktin-produzierendes Hirnanhangsdrüsen-Adenoma, andere Tumore	sekretiertes Hormon, durch Karzinom im Überschuss produziert
AIns	Insulin	Diabetes (Typ I, iatrogen)	an Injektionsstelle bei Diabetikern
AMed	Lactadhedrin	Mediale Aorta-Amyloidose	sekretiertes Hormon, fortgeschrittenes Alter
AKer	Kerto-epithelin	Familiäre Conea dystrophie	lokalisiert
ALac	<i>Lactoferrin</i>	<i>Familiäre subepitheliale Cornea-Amyloidose</i>	<i>sekretiertes Hormon, pathologische Mutationen</i>

Die Nomenklatur orientiert sich am Vorläuferprotein (Kazatchkine *et al.*, 1993).

Aufgenommene Proteine nach den Vorschlägen des 'International Nomenclature Committee on Amyloidosis' 2000 in Budapest. Proteine in kursiv sind vorläufig aufgenommen.

1.2 Strukturaufbau von Proteinen

Lineare Aminosäurepolymere werden in natürlicher Weise durch die Verknüpfung 20 chemisch verschiedener α -Aminosäuren synthetisiert, die in ihrer Sequenz die Primärstruktur von Polypeptiden definieren. Die ersten durch Röntgenstrukturanalyse in Proteinen nachgewiesenen Struktur motive werden als α -Helix und β -Faltblatt bezeichnet und bilden die Sekundärstruktur (Astbury *et al.*, 1930; Pauling und Corey, 1951). Bei der α -Helix werden die Wasserstoffbrücken zwischen dem Wasserstoff, das am Stickstoffatom einer Peptidbindung kovalent gebunden ist, und dem Sauerstoffatom der Carbonylgruppe, der vierten darauf folgenden Aminosäure, gebildet. Damit liegen die Wasserstoffbrücken fast parallel zur Achse der α -Helix. Bei der β -Struktur liegt die Peptidkette in Zickzackform vor. Diese so genannten Faltblattanordnungen stellen strukturelle Beziehungen über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen verschiedenen Abschnitten einer Polypeptidkette her. Haben zwei Faltblattstruktur bildende Peptidketten dieselbe Richtung (N- zu C-Terminus), spricht man von parallelem, ansonsten von antiparallelem Faltblatt. Die nächst höhere Organisationsstufe ist die Tertiärstruktur, welche die räumliche Anordnung der Sekundärstrukturelemente beschreibt. Die Quartärstruktur beschreibt dagegen die dreidimensionale Anordnung mehrerer Polypeptidketten. Ein bestimmtes Beispiel einer pathologischen und für diese Arbeit relevanten Quartärstruktur ist der Proteinkern einer Amyloid-Fibrille.

1.3 Fibrillenaufbau und Struktur

Ein charakteristischstes Merkmal einer Amyloid-Fibrille ist ihr Röntgenbeugungsmuster. Von diesem Muster wurde für Amyloid-Fibrillen ein hoher β -Strukturanteil und eine gerichtete Anordnung der Stränge zur Hauptachse der Fibrille abgeleitet. Alle bis dato untersuchten Amyloid-Fibrillen zeigen diesen strukturellen Aufbau (Sunde *et al.*, 1999). Dabei zeigte sich im Gegensatz zu der parallelen β -Strukturanordnung in gestrecktem Keratin (Astbury *et al.*, 1930; Pauling und Corey, 1951b) für Amyloid-Fibrillen eine Queranordnung der β -Struktur („cross- β -structure“) rechtwinklig zur Hauptachse der Faser (Eanes und Glenner, 1968). Im Amyloid-Muster repräsentiert vermutlich eine meridionale Reflektion von 4,75 Å den Abstand zwischen zwei über Wasserstoffbrücken verbundenen Strängen. Eine variabelere Reflektion von 10 Å beschreibt den Abstand der Packungsdichte gestapelter β -Faltblätter. (Abb. 1.1). Weitere Daten belegen die Annahme, dass Amyloid-Fibrillen aus quer zur Fibrillenachse gestapelten β -Strukturen bestehen.

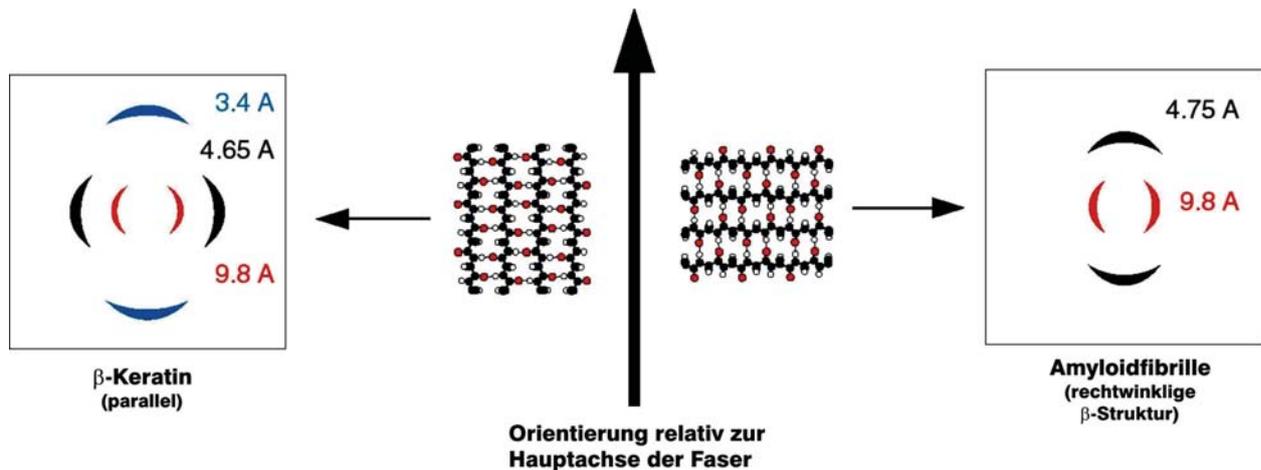


Abb. 1.1: Röntgenbeugungsmuster und „cross β -structure“ der Amyloid-Fibrille.

Im Gegensatz zum Röntgenbeugungsmuster von β -Keratin (aus gestreckten Haaren), in dem die individuellen β -Faltblattstränge parallel zur Faserhauptachse laufen, ergibt sich für Amyloid-Fibrillen eine „cross β -structure“ rechtwinklig zur Faserhauptachse.

Die Frage einer parallelen, antiparallelen oder gemischten Orientierung der β -Stränge zueinander konnte bis heute nicht ausreichend experimentell beantwortet werden. In Röntgenbeugungsmustern konnten keine meridionale Reflektion bei 9,4 Å, die typisch für eine antiparallele Ausrichtung ist, gefunden werden (Sunde *et al.*, 1999). Dahingegen gibt es Infrarotdaten, die eine antiparallele Organisation favorisieren (Fink, 1998). Zudem ist die Frage, ob und bis zu welchem Grad die übereinander gelagerten Blätter in den Fibrillen eine mögliche Drehung erfahren, noch nicht abschließend geklärt (Sunde *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 1999). Die Uneinheitlichkeit in der Interpretation der Daten und Auslegung der möglichen Ultrastruktur der Fibrillen kommt eventuell auch durch die Heterogenität jedes Systems und des zugrunde liegenden Proteins zustande.

Werden Amyloid-Fibrillen dagegen mit Elektronenmikroskopie oder Rasterkraftmikroskopie visualisiert, zeigt sich ein einheitlicheres Bild der Fibrillenstruktur. Konsistent ist ihnen ein linkshändiger Drehsinn (Bauer *et al.*, 1995; Goldsbury *et al.*, 2000). Die Beobachtung von Streifen entlang der Längsachse und dichtgepackten Stellen im Querschnitt der Fibrillen führt zu der Annahme, dass Amyloid-Fibrillen, ähnlich wie Mikrotubuli, aus nebeneinander stehenden Protofilamenten bestehen, die sich umeinander winden. Dabei soll die Protofibrille aus den aneinander gepackten β -Faltblättern bestehen die quer zur Achse orientiert sind. In den Regionen zwischen den Protofibrillen befinden sich dabei die Loop-Regionen zwischen den Sekundärstruktur-Elementen der Polypeptidkette, welche die Stränge der β -Faltblätter miteinander verbinden (Jiménez *et al.*, 1999). In Abbildung 1.2 wird ein konstruiertes Strukturmodell einer Amyloid-Fibrille gezeigt, das auf Daten von Cryo-Elektronenmikroskopie und Röntgenbeugungsmustern basiert (Jiménez *et al.*, 1999) und die meisten Kriterien, die an eine Amyloid-Fibrille gestellt werden, erfüllt.



Abb. 1.2: Strukturmodell einer Amyloidfibrille.

Das Modell basiert auf Daten von Cryo-Elektronenmikroskopie und Röntgenbeugungsmustern von Amyloidfibrillen der SH3 Domäne einer PI3-Kinase (Jiménez *et al.*, 1999; Dobson, 1999).

Die Fibrille besteht aus vier Protofilamenten, die sich umeinander drehen und eine hohle Röhre mit einem Durchmesser von 60 Å formen. Die blaue Hülle repräsentiert die durch Experimente ermittelte Elektronendichte der Fibrillen, wohingegen die β -Faltblatt Anordnung der Polypeptidketten moduliert ist und nur eine mögliche Anordnung darstellt [Bild aus Trends Biochem. Sci. 24, 331; (Dobson, 1999)].

Eine solche Amyloid-Fibrille, wie sie in Abb. 1.2 gezeigt wird, besteht aus mehreren Protofibrillen und wird als reife Fibrille bezeichnet. Obwohl einige Teile in ihrem Aufbau heterogen sind, hat sie typischerweise eine Breite von 8 bis 13 nm. Die Schwankungen in der Breite sind durch den unterschiedlichen Aufbau der zugrunde liegenden Polypeptidkette und die Variabilität in der Anzahl der umeinander gedrehten Protofibrillen bedingt (Sunde, 1997). Die durch Mikroskopietechniken beobachteten Morphologien von Fibrillen reichen von zylindrischen und glatten bis zu helikalen, rippenartigen Strukturen. Die klarsten Strukturdaten sind an *in vitro* erzeugten Fibrillen zu beobachten, wohingegen bei aus Geweben extrahierten reifen Fibrillen oft die Morphologie in Mitleidenschaft gezogen wurde (Tennet, 1999).

1.4 Nebenkomponten

Gewebe mit Amyloid-Ablagerungen wurden oft als „wachsartig“ und „speckig“ bezeichnet (Abb. 1.3. A, Einleitung 1.1). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Gewebeschnitten mit pathologischen Amyloid-Ablagerungen lässt sich erkennen, dass diese Ablagerungen zum überwiegenden Teil aus fibrillären Bestandteilen bestehen (Abb. 1.3.B). Der Kern dieser Fibrillen besteht aus umeinander gewundenen Protofibrillen (Abb. 1.3.C). Daneben konnten in Amyloiden zusätzlich zum spezifischen Fibrillenprotein eine Reihe weiterer gemeinsamer Komponenten identifiziert werden (Kisilevsky, 2000; McLaurin *et al.*, 2000). Diese chemisch diversen Komponenten bilden eine Art Mantel um den Fibrillenkern und werden hier als Fibrillenmantel bezeichnet (Abb. 1.2. C). Dazu gehören Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Proteoglycane (Heparinsulfat, Perlecan) (Kisilevsky, 1994), Glycosaminoglycane (Snow und Kisilevsky, 1985), ein pentameres Protein (die Serum Amyloid P-Komponente) (Inoue und Kisilevsky, 1999) aber auch Apolipoprotein E (Gallo, *et al.*, 1994).

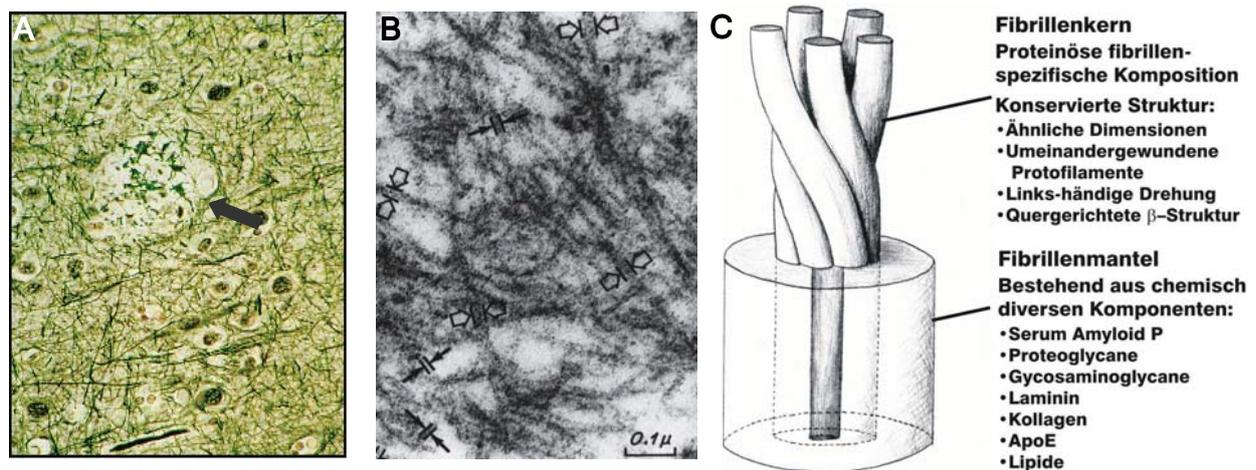


Abb. 1.3 „speckige“ Plaques bestehen überwiegend aus fibrillären Strukturen; Schematische Darstellung des Fibrillenaufbaus.

A: Lichtmikroskopische Aufnahme einer „speckigen“ und „wachsartigen“ Ablagerung“ im Gewebeschnitt eines von Alzheimerkrankheit befallenen Gehirns. Der schwarze Pfeil weist auf den Plaque. (Quelle: I-S-B.org) **B:** Elektronenmikroskopische Darstellung von ungeordneten Amyloid-Fibrillen im Gewebeschnitt einer menschlichen Niere. Die Breite der Fibrillen und Fibrillenbündel variiert zwischen 100 Å (dunkle Pfeile) und 200 bis 300 Å (offene Pfeile). (Quelle: Shirahama und Cohen, JCB: 33 679–08 (1967). **C:** Schematische Darstellung einer pathologischen Amyloid-Fibrille bestehend aus einem Fibrillenkern und einem Fibrillenmantel. Die strukturelle Organisation des Fibrillenmantels ist in der Darstellung stark vereinfacht. Die zylindrische, schematisierte Darstellung repräsentiert die periphere Lokalisation zum hoch geordneten, proteinösen Kern.

Die meisten dieser Komponenten sind Bestandteile der Basallamina, aber auch andere nicht der Basallamina angehörige wie Apo E wurden beschrieben. Die quantitative Zusammensetzung ist heterogen. Diese Komponenten des Fibrillenmantels lassen sich als gemeinsame Bestandteile in allen Amyloid-Fibrillen identifizieren und mit ihnen aufreinigen (Kisilevsky, 2000b). Die Rolle dieser Komponenten des Fibrillenmantels in der Pathogenese und Entstehung der Amyloidosen ist bis heute ungeklärt (Kisilevsky, 2000).

Kontrovers diskutiert wird, ob und bis zu welchem Grad die Amyloid-Fibrillen die zugrunde liegende Ursache der mit ihnen assoziierten Krankheiten sind oder ob sie als Folgeerscheinung anderer pathologischer Prozesse abgelagert werden (Goldsbury *et al.*, 2000). Bei primären Amyloidosen sprechen die meisten Daten dafür, dass die Amyloid-Fibrillen das Agens der Pathologie sind und in ihrer Gesamtheit über mechanische Kräfte das befallene Gewebe zerstören, wohingegen eine einzelne Fibrille noch nicht pathogen wirkt (Tan und Pepys, 1994). Obwohl der genaue Entstehungsprozess der Pathologie von Krankheiten wie Alzheimer- oder Prion-Krankheiten nicht geklärt ist, wird der cytotoxische Effekt doch den Proteinaggregaten zugeschrieben (Lansbury, 1999). Dabei bleibt offen, ob die Cytotoxizität durch reife Fibrillen oder durch Protofilamente ausgelöst wird (Rochet und Lansbury, 2000).

1.5 Prionen-Krankheiten und Proteinfehlfaltung als generelles Prinzip der Amyloidosen

Bei der Prozessierung von Proteinen kommt es teilweise zu Falsch-Faltungen. Falschgefaltete Proteine sind nicht-native Konformationsstadien, die eine stabile Struktur ausbilden, welche eine Faltung oder Rückfaltung in die natürliche und funktionelle Konformation des Proteins verhindern. Im Falle des Prion-Proteins wird vermutet, dass Monomere des falschgefalteten Proteins sehr lange existieren könnten (Jackson, 1999), was zu einer Induktion der Prionkrankheiten führen könnte.

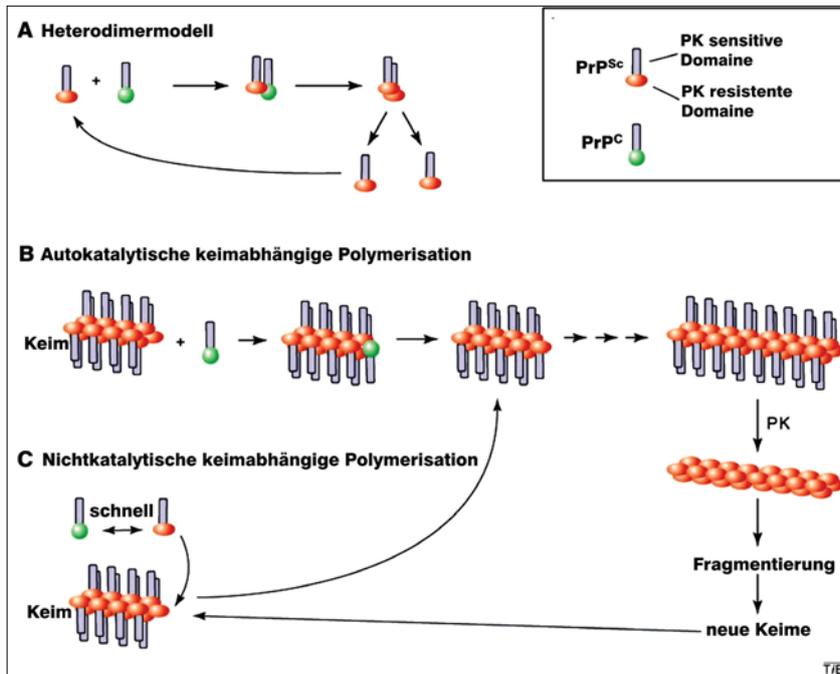
Prion-Krankheiten [Prion steht für ein proteinartiges infektiöses Partikel (Prusiner, 1982)] sind tödliche neurodegenerative Krankheiten von Säugetieren, die neben spontaner oder genetischer Induktion auch durch Infektion ausgelöst werden können. Die Prion-Erkrankungen sind aufgrund ihrer Infektiösität weitestgehend untersucht und mehrere Hypothesen sind formuliert worden, um die Infektiösität zu erklären. An ihrem Beispiel lässt sich ein genereller Entstehungsprozess für Amyloidosen ableiten. Dadurch unterscheiden sie sich von den anderen Proteinspeicherkrankheiten und werden auch als „transmissible spongiforme Enzephalopathien“ (TSE) bezeichnet, zu denen das Creutzfeldt-Jakob-Syndrom [inklusive der neuen Variante (vCJD)], Kuru, Scrapie und die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) gezählt werden.

Versuche zur Isolation des Scrapie-Erregers aus infiziertem Hirngewebe führten zur Entdeckung eines Proteinase-resistenten, Glycosylphosphatidylinositol-verankerten, extrazellulären Proteins mit zwei N-Glycosylierungen und einer Disulfidbrücken von 27-30 kDa (Prusiner *et al.*, 1980, 1982). Dieses Protein („PrP 27-30“) akkumuliert im Hirngewebe infizierter Säugetiere zumeist in Form amyloider Ablagerungen (DeArmond *et al.*, 1985).

In Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Scrapie-Erreger resistent gegen chemische und physikalische Nukleinsäure-Denaturierungsverfahren (Alper *et al.*, 1967) ist, dagegen aber inaktivierbar durch proteinmodifizierende Reagenzien (Hunter *et al.*, 1972; Prusiner *et al.*, 1982). Weitere Beweise für das Konzept eines proteinösen Erregers lieferte der Ausschluss von Nukleinsäuren mit mehr als 50 Basen je ID₅₀-Einheit (Riesner, 1991; Meyer *et al.*, 1991; Kellings *et al.*, 1994) und die Resistenz von PrP-Knockout Mäusen gegen cerebrale Injektion mit Prion-Infektiösität. Dennoch schlugen bis heute alle Versuche fehl, eine Prion-Infektiösität mit rekombinantem Protein zu erzeugen.

Im „gesunden“ Organismus wird das zelluläre Protein PrP^C (C für cellular) exprimiert, dessen Funktion noch unklar ist. Zusätzlich existiert in befallenem Gewebe die infektiöse Isoform PrP^{Sc} (SC für ‚scrapie‘), der Hauptbestandteil des Scrapie-Erregers. Unterschiede in der Aminosäuresequenz und posttranslationaler Modifikationen konnten zwischen PrP^C und PrP^{Sc} nicht gefunden werden (Stahl *et al.*, 1993). IR- und CD-Spektroskopie ergaben über 40 % α -Helix

ohne erkennbares β -Faltblatt in PrP^C, jedoch weniger als 30 % α -Helix und etwa 30 % β -Faltblatt in PrP^{Sc} (Safar *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 1993; Riesner *et al.*, 1996). Mehrere Modelle für die Prion-Replikation wurden postuliert. Dabei wird davon ausgegangen, dass PrP^{Sc} die Fehlfaltung von PrP^C in PrP^{Sc} induzieren kann.



A: Im heterodimer Modell kommt die Polymerisation als ein Epiphänomen vor (Prusiner *et al.*, 1990)

B: Im autokatalytischen Keimbildungsmodell (Griffith, 1967; Corne, 1993) wird die Konformationsänderung zu PrP^{Sc} durch Kontakt mit einem Template, dem monomeren oder polymeren Keim, induziert.

C: Im nicht katalytischen Polymerisationsmodell (Jarret und Lansbury, 1993; Corne, 1993) ist die Konformationsänderung zu PrP^{Sc} schnell, muss aber durch Bindung mit vorher geformten PrP^{Sc} Polymeren stabilisiert werden. In Modell **B** und **C** kann die Anzahl der Keime durch Fragmentierung der Fibrillen erhöht werden. Eigen verglich 1996 die Modelle. Demnach erklären Modell **B** und **C** die experimentell beobachteten Daten besser;

PK: Proteinkinase K

Abb. 1.4 Theoretische Modelle für die Prionreplikation

(Nach Caughey B, *Trends Biochem. Sci.* **26**: 235-42 (2001)).

Ob und inwieweit ein solcher Mechanismus auch für andere Amyloidosen zutreffen kann, gilt als ungeklärt. Eine Polymerisation einzelner monomerer Fibrillenbausteine zu Fibrillen in Anwesenheit eines Keims wird aber auch für Hefepriionen und für A β bei hohen Konzentrationen postuliert (Caughey, 2000; Sigurdsson *et al.*, 2002).

Durch wiederholte Injektion des aus Patienten mit A λ -Amyloidose extrahierten Bence-Jones-Proteins in Mäuse traten die histopathologischen Phänomene der menschlichen Krankheit auf (Solomon *et al.*, 1992). Eine Transmissibilität einer systemischen Amyloidose konnte auch durch Injektion des aus Amyloid-Ablagerungen extrahierten „amyloid enhancing factor“, ein Faktor der die Induktionszeit für AA-Amyloidose dramatisch senkt (Werdelin und Ranlov, 1966), zusammen mit einem entzündlichen Stimulus hervorgerufen werden. Es zeigte sich, dass die Hauptkomponente des „amyloid enhancing factor“ AA-Fibrillen sind (Lundmark *et al.*, 2002).

1.6 Charakteristika der in vorliegenden Arbeit untersuchten Krankheiten

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an *post mortem* entnommenen amyloiden Fibrillenproteinen A β_2m , AL, ATTR, AA und dem fibrillären TAU-Protein durchgeführt. Im Folgenden sind einige klinische und biochemische Charakteristika dieser Krankheiten beschrieben.

A β_2m : A β_2m ist eine relativ neue Form einer Amyloidose, die bei Patienten mit langen Hämodialysezeiten (> 8 Jahre) infolge von Nierenschäden auftritt (Gal *et al.*, 1994). Davor waren die Therapiebedingungen nicht ausreichend, um Patienten solch eine lange Überlebenszeit zu gewährleisten. Die Krankheit wird durch Dialysemembranen verursacht, die nicht adäquat in der Lage sind, β_2 - μ globulin, ein natürlich zirkulierendes Zellmembranprotein, das von den Nieren exkretiert wird, zu eliminieren (Kessler, *et al.*, 1992). Durch Einsatz moderner Dialysemembranen tritt diese Krankheit heutzutage kaum noch auf.

ATTR: Transthyretin ist ein evolutiv konserviertes, tetrameres Serumprotein aus vier identischen Untereinheiten von 14 kDa (Blake *et al.*, 1974). Plasma TTR wird hauptsächlich von der Leber, in der es schon während der frühen Entwicklung exprimiert wird (Soprano *et al.*, 1985), synthetisiert und fungiert als Transportprotein für Thyroxin und Retinol (Vitamin A) (Raz *et al.*, 1970; Kanda *et al.*, 1974). Mit dem letzteren und dem „retinol-binding protein“ bildet es einen Komplex von 75 kDa (Saraiva, 1984). ATTR Amyloidosen können in zwei Kategorien eingeteilt werden: 1. Die familiären amyloiden Polyneuropathien, die meistens mit Mutationen einhergehen, von denen über 50 Varianten bekannt sind (Saraiva, 2001). 2. Die senile systemische Form ohne Mutationen. Erstere Form wird heutzutage durch Lebertransplantation mit „Leber mit Wildtyp TTR“ therapiert. Dadurch wird die mutierte TTR-Form im Plasma abgebaut (Holmgren *et al.*, 1991) und die Amyloid-Ablagerung verringert (Hawkins, 1994), wodurch es zur Besserung der Neuropathie kommt (Bergethon *et al.*, 1996).

AA: Serum Amyloid A (SAA) ist ein Akutphasen-Apolipoprotein der „High Density Lipoproteine“ (HDL), dessen N-terminale Sequenz mit der von Amyloid A Protein identisch ist (Benditt und Eriksen, 1977). In „normal gesunden“ Individuen wird SAA nur in sehr geringen Konzentrationen hauptsächlich von Hepatozyten produziert. Die Konzentration steigt aber schnell an bei jeder Art von Gewebeerletzung, Infektion und Entzündung (Pepys und Baltz, 1983).

AL: Bei AL Amyloidosen wird das amyloide Fibrillenprotein durch eine sich normalerweise ruhig verhaltende monoclonale B-Zellpopulation, die eine Antigen-gesteuerte neoplastische Expansion erfährt, synthetisiert (Bellotti *et al.*, 2000). Aminosäuresequenzierungen von

mehreren amyloiden Leicht-Ketten-Proteinen zeigten keinen gemeinsamen Sequenzkonsens der monoklonalen Leicht-Ketten-Proteine. Alle Leicht-Ketten können amyloid sein, wobei sich ein Übergewicht von amyloiden λ -Ketten gegenüber κ -Ketten zeigt (Isobe und Osseman, 1974).

AA und AL sind beides systemische Amyloidosen, die infolge von lang andauernden entzündlichen Prozessen (z. B. Myelomen) und Plasmazell Dyskrasien auftreten. Fälle wurden berichtet, in denen eine Linderung der Symptome durch Therapie des entzündlichen Prozesses und damit der Reduktion des Vorläuferproteins gelang (Edwards *et al.*, 1988; van Buren *et al.*, 1995).

Tau-Protein und Alzheimerkrankheit: Das Tau-Protein ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das bei der Differenzierung von Nervenzellen und beim axonalen Transport eine Rolle spielt. Im pathologischen Zustand der Alzheimer-Krankheit ist es zu "paired helical filaments" (paarigen helikalen Filamenten; PHF) aggregiert und dabei anomal hoch phosphoryliert (Crowther und Goedert, 2000). Diese PHF lagern sich intrazellulär in Neuronen und im proximalen Bereich des Axons ab. Solche Ablagerungen treten meist parallel zu den neuronalen Plaques, deren Hauptbestandteil A β ist, auf. Welches oder ob eines von diesen beiden Erscheinungen das eigentliche Agens der Alzheimer Pathologie ist, ist Grundlage vieler Diskussionen (Mudher und Lovestone, 2002).

1.7 Lipide

Lipide haben in der Zelle wichtige Funktionen, wie Kompartimentierung und Energiespeicherung. Ihre Vielfalt reicht von einfachen Triacylglyceriden, die für thermische Isolation und Energiespeicherung zuständig sind, bis zu komplexen Membranlipiden, die als Hauptbestandteil der Zellmembran strukturelle Funktionen übernehmen und als Botenstoffe biologische Prozesse steuern. Lipide lassen sich in Lipidklassen einteilen, die durch die spezifische funktionelle Gruppe („Kopfgruppe“), die über einen Phosphat-Rest an Kohlenstoffatom drei (C-3) des Glycerol-Rückgrats oder an Sphingosin kondensiert ist, festgelegt wird. Eine Lipidklasse umfasst diverse Lipide, die in ihrer Kopfgruppe übereinstimmen und sich lediglich durch die Länge der Fettsäureketten und/oder die Anzahl der Doppelbindungen voneinander unterscheiden. Eine Ausnahme bildet die Lipidklasse der Steroide (z. B. Cholesterol), welche weder Glycerol-Rückgrat noch Kopfgruppe enthält.

1.7.1 Lipidklassen können 3 Kategorien zugeordnet werden

1. Unpolare Lipide: Mono-, Di- und Triglyceride bestehen aus Glycerol als dreiwertigem Alkohol und – zumeist gesättigten – Fettsäuren. Die Triglyceride (Speicherfette) und deren

Hydrolyseprodukt [Mono- und Diglyceride (nicht gezeigt)] stellen den Hauptanteil der unpolaren Lipide. Zusätzlich kommt *Cholesterol* in allen Biomembranen vor. Bei den Cholesterol-Estern ist die freie OH-Gruppe des A-Rings durch eine meist ungesättigte Fettsäure (Ölsäure, Unolsäure) verestert.

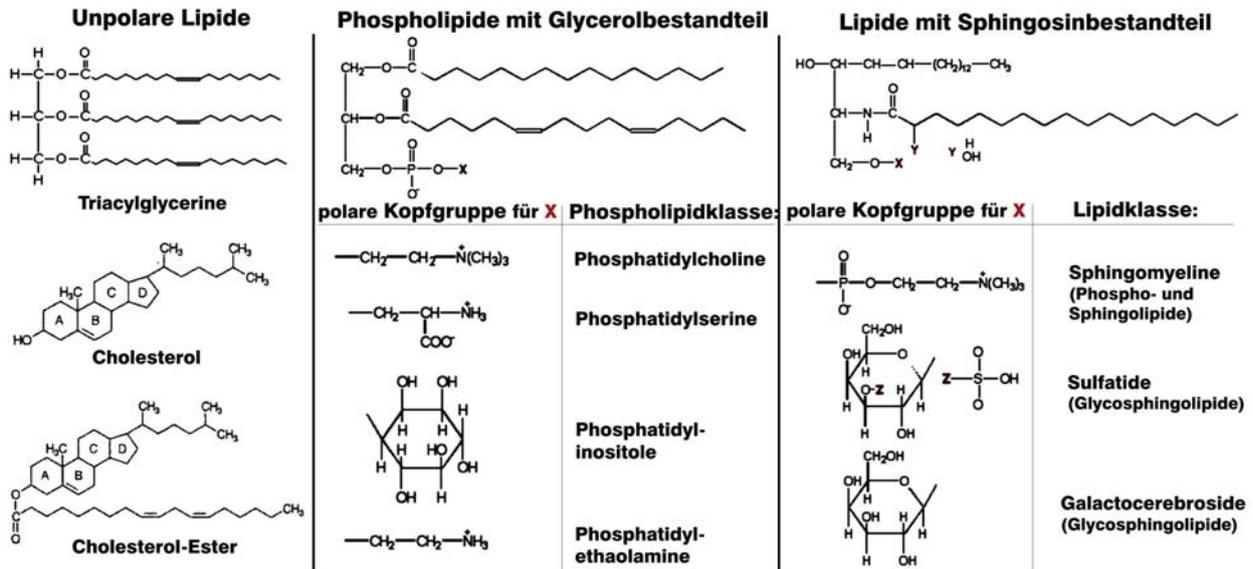


Abb. 1.5: Überblick über die Lipidklassen und Kopfgruppen.

Die Phospholipide und Lipide mit einem Sphingosinbestandteil sind nach abnehmender Polarität geordnet.

2. Phospholipide zählen zu den polaren Lipiden und bestehen aus einem zweifach mit Fettsäuren veresterten Glycerol (Diglycerid), meist mit einer gesättigten Fettsäure am C-1 und häufig einer ungesättigten Fettsäure an C-2, während an C-3 eine polare Kopfgruppe gebunden ist. Nach der chemischen Natur der Kopfgruppe werden die Phospholipide klassifiziert - *Phosphatidylcholin*, *Phosphatidylserin*, *Phosphatidylinositol*, *Phosphatidylglycerol* (nicht gezeigt), *Phosphatidylethanolamin* und *Cardiolipin* (Diphosphatidylglycerol) (nicht gezeigt). Eine zusätzliche Phospholipidklasse ist *Sphingomyelin*, welches Cholin als Kopfgruppe und anstelle von Glycerol und einer der beiden Fettsäuren die langkettige Sphingosinbase enthält. Daher zählt Sphingomyelin gleichzeitig zu den Phospho- und den Sphingolipiden.

3. Glycosphingolipide sind wie die Phospholipide polare Lipide. Sie bestehen aus *Gangliosid* (nicht gezeigt), *Galactosylceramid* und *Sulfatid*. Die beiden letzten Lipidklassen können in hydroxyliertem und nicht hydroxyliertem Zustand vorliegen.

1.7.2 Aufbau biologischer Membranen

Biologische Membranen bestehen aus amphiphilen Lipidmolekülen mit einem als ‚Kopf‘ bezeichneten hydrophilen (wasserlöslichen) Teil sowie einem als ‚Schwanz‘ bezeichneten hydrophoben (wasserabstoßenden) Teil. Werden amphiphile Moleküle in eine wässrige Umgebung gebracht, so lagern sie sich zu einer aus zwei Molekülschichten (Doppelschicht) bestehenden zweidimensionalen Membran zusammen. In dieser Struktur zeigen die hydrophilen Köpfe nach außen und die hydrophoben Schwänze nach innen. Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Cholesterol dienen als Bausteine der biologischen Membranen. Zusätzlich enthalten sie auch Proteine, die zwischen Zellen und Umgebung vermitteln und Signale und Moleküle in die Zelle hinein- und heraustransportieren. Biologische Membranen bilden Strukturen und Organellen innerhalb von Zellen, die bei den Stoffwechselprozessen der Energieerzeugung und Biosynthese mitwirken, wie z. B. Mitochondrien, endoplasmatisches Reticulum und Golgi-Apparat. Außerdem grenzt die biologische Plasmamembran die Zelle von der Außenwelt ab. Syntheseenzyme der Membranlipide sind meist integrale Membranproteine, so dass Membranlipide *in situ* produziert werden. Der Gehalt und die Zusammensetzung an Phospholipiden ist von Gewebetyp zu Gewebetyp leicht unterschiedlich. Die am häufigsten vorkommenden Lipide sind Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin.

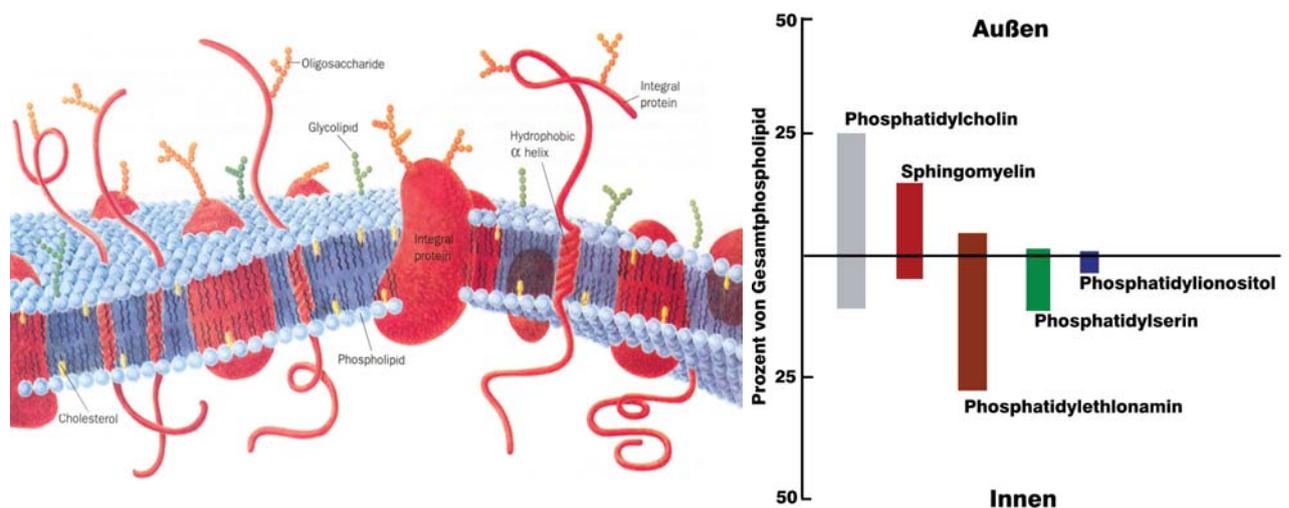


Abb. 1.6 Schematische Darstellung einer Plasmamembran und ihrer Phospholipidzusammensetzung. Plasmamembranen bestehen aus einer Lipiddoppelmembran, deren Fluidität durch den Anteil an gesättigten Fettsäuren und Cholesterol bestimmt wird. Gelb: Cholesterol. (linkes Bild aus Voet und Voet, 1994).

Die Lipiddoppelmembranen sind nicht homogen aufgebaut und oft ist der Anteil an bestimmten Phospholipiden zwischen der äußeren und inneren Membran unterschiedlich, wobei meistens mehr Phosphatidylethanolamin auf der Innenseite und mehr Phosphatidylcholin auf der

Außenseite zu finden ist (Abb. 1.5). Sphingolipide sind die wasserunlöslichsten Membranlipide und vorzugsweise in der äußeren Schicht der Membran lokalisiert (Devaux, 1993). Die Position der Moleküle in der Membran ist nicht fixiert und sie können sich innerhalb der Doppelschicht weitgehend frei bewegen. Dies wird durch das Fluiditätsmodell beschrieben (Singer und Nichol森, 1972), wobei der Cholesterol-Gehalt den Fluiditätsgrad der Membran stark beeinflusst. Dahingegen ist der Austausch von Komponenten zwischen der äußeren und inneren Schicht (Flip-flop) eher selten und wird durch Proteine gesteuert. In Plasmamembranen finden sich zudem noch spezialisierte Strukturen wie „Coated pits“ für Endo- und Exocytose (Roth und Porter, 1964; Hill *et al.*, 2001), und „lipid rafts“ (Simons und Toomre, 2000).

1.7.3 „Lipid rafts“ sind Mikrodomänen mit besonderer Funktion und Lipidorganisation

Zellmembranen werden gewöhnlich mit dem Singer-Nichol森 Fluiditäts-Model mit neutraler Lipidverteilung in der Lipiddoppelmembran beschrieben. Allerdings zeigen neue Aspekte zum Aufbau von Zellmembranen, dass es in diesen Mikrodomänen mit spezialisierter Struktur und Lipidkomposition gibt. Simons und Ikonen (1997) formulierten die „lipid raft“-Hypothese, nach der Cholesterol-Sphingomyelin-Mikrodomänen in zahlreiche zelluläre Funktionen wie Membrantransfer, Morphogenese, Zell-Zell-Kommunikation und Signaltransduktion involviert sind (Harder und Simons, 1997). Abbildung 4.4 zeigt ein Modell der Lipidorganisation in „raft“-Mikrodomänen nach Harder und Simons, (1997).

Die Detektion von Detergent-resistenten Membranen, die sich bei Saccharose-Gradientenzentrifugation in Fraktionen geringer Dichte anreichern, war der ursprüngliche Hinweis auf die Existenz solcher Strukturen. Später wurde gezeigt, dass dabei allerdings auch nicht-spezifische Artefakte auftreten (Harder und Simons, 1997; Kurzchalia *et al.*, 1995). Der verlängerte Aufenthalt eines GPI-geankerten Goldpartikel-markierten Proteins (Thy-1) in Membranregionen von unter 300 nm Größe (Sheets *et al.*, 1997) lieferte weitere Hinweise auf die Existenz von „lipid rafts“. Die Visualisierung mit modernen Fluoreszenztechniken ermöglichte einen Nachweis dieser Strukturen (Varma und Mayor, 1998; Kenworthy *et al.*, 2000).

„Lipid rafts“ im Nervensystem werden auch als Glycolipid-angereicherte Domänen bezeichnet (Olive *et al.*, 1995; Vey *et al.*, 1996). Vor allem zeichnen sich „lipid rafts“ durch die Anreicherung von Cholesterol und Sphingomyelin aus (Cinek und Horejsi, 1992; Sargiacomo *et al.*, 1993). Dies gilt auch für Neurone (Moss und White, 1992). In Fibroblasten konnten „raft“-Protein-Assemblierungen mit einem Durchmesser von rund 50 nm beobachtet werden, was ungefähr 3.500 Sphingolipidmolekülen entspricht (Pralle *et al.*, 2000).

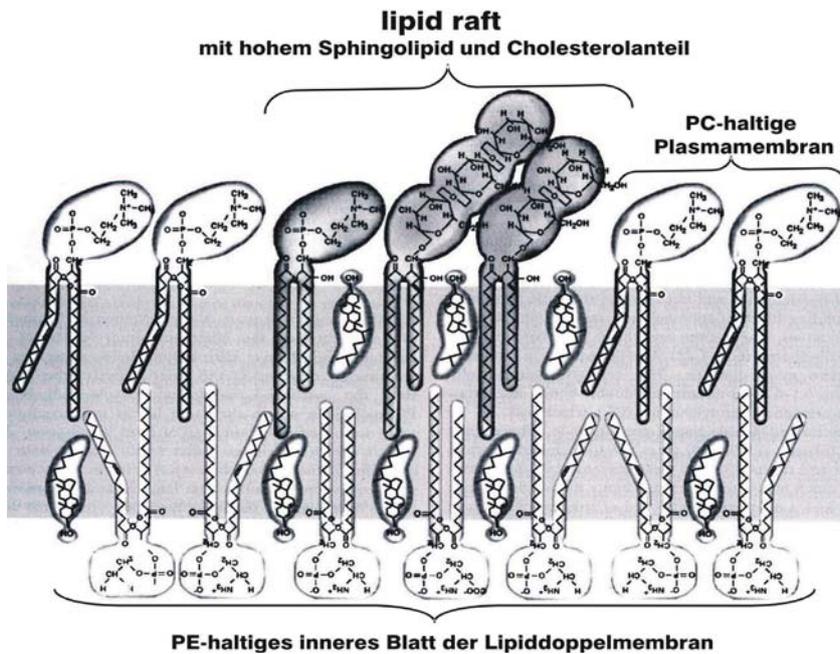


Abb. 1.7 Hypothetisches Modell der Lipidorganisation in „raft“-Mikrodomänen.

Sphingolipide sind dunkelgrau dargestellt mit darzwischen vielen Cholesterolmolekülen (grau umrandet). Die umgebenden Phosphatidylcholin-haltigen Regionen sind weniger dicht gepackt und fluider als die „raft“-Regionen. An der Außenseite sind Phosphatidylcholin (PC), Glycosphingolipide und Sphingomyelin, an der Innenseite Phosphatidylethanolamin (PE).

(Modifiziert nach Simons und Ikonen, 1997).

Eine spezielle Art von „lipid rafts“ sind Caveolae. Diese sind flakonförmige Einschnürungen an der Zelloberfläche. Ihre Morphologie wurde zum ersten Mal in den 50er Jahren beschrieben (Palade, 1953; Yamada, 1955). Caveolae werden aus „lipid rafts“ durch Polymerisierung von Caveolin gebildet, einem haarnadelförmigen intergralen Membranprotein, das stark Cholesterol bindet (Parton, 1996; Simons und Toomre, 2000). Die generelle Funktion von Caveolae ist noch unklar. Es wird vermutet, dass sie in Endozytose (Parton, 1996), Transcytose (Schnitzer *et al.*, 1994) und Signaltransduktion (Smart *et al.*, 1999) involviert sind.

1.7.4 Lipoproteine

Lipide werden im Blut durch die Plasmalipoproteine transportiert. Dies sind im Wesentlichen Tropfen aus Triacylglycerinen und Cholesterol-Estern, die den Kern der Lipoproteine bilden, der von einem Monolayer aus Phospholipiden, Cholesterol und Apolipoproteinen umhüllt ist. Die amphiphilen Apolipoprotein-Helices schwimmen in hydrophoben Kontakt mit dem Kern auf der Lipoproteinoberfläche (Voet und Voet, 1994). Chylomikronen und VLDL (Very Low Density Lipoprotein) sind hauptsächlich für den Transport und Haushalt von Speicherfetten verantwortlich. LDL und HDL (Low Density Lipoprotein und High Density Lipoprotein) transportieren im Wesentlichen Cholesterol. LDL bindet an zellständige LDL-Rezeptoren und wird dann endozytiert. Die Cholesterol-Ester im Kern des Lipoproteins werden in freie Fettsäure und Cholesterol zerlegt, welches in die Membranen eingebaut wird. Ein intrazellulärer Cholesterolüberschuss hemmt die Neusynthese von LDL-Rezeptor und Cholesterol (Fielding und Fielding, 1997). Zudem wird überschüssiges Cholesterol von HDL aus den Membranen extrahiert, mit einer Fettsäure verestert und zum Abbau zur Leber transportiert.

1.8 Zentrale Frage und Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit wird die Frage nach der Rolle von Lipiden an der Pathogenese der über ein Jahrhundert lang als „speckige“ Ablagerungen beschriebenen Amyloidosen aufgeworfen. Es gibt über 20 verschiedene amyloide Fibrillenproteine, die keine gemeinsamen Sequenzmuster zu haben scheinen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass auch nicht amyloide Proteine mit hohem α -Helix-Anteil *in vitro* Amyloid-Fibrillenstrukturen ausbilden können (Fandrich und Dobson, 2001). Auch die Immunglobulin Leicht-Ketten-Amyloidosen zeigen, dass keine spezifische Sequenz zur Ausbildung einer Amyloidose vorliegen muss (Bellotti *et al.*, 2000). Bis heute bleibt die Frage nach dem eigentlichen pathogenen Mechanismus der Amyloidosen offen.

Lipide wurden in extrahierten Amyloid-Fibrillen assoziiert gefunden (Kim *et al.*, 1967; Damas *et al.*, 1995) und es wird postuliert, dass sie Bestandteil der konservierten Struktur des Fibrillenmantels sind. Demographische Studien zeigten eine Korrelation zwischen Cholesterolspiegel und dem Auftreten der Alzheimer-Krankheit (Kivipelto *et al.*, 2001). Ob und wie weit Lipide Einfluss auf die Fibrillenbildung und Stabilisierung bestimmter Proteinkonformationen und Übergänge haben, bleibt unklar.

Ein Weg, um Informationen über einen Einfluss bestimmter Lipide auf die Fibrillenbildung zu erhalten, sind *in vitro* Rekonstitutions- und Bindungsversuche. Vor allem an A β konnte gezeigt werden, dass es Interaktionen zwischen bestimmten Lipiden und der A β -Pathogenität gibt, deren genauer Mechanismus jedoch noch unklar ist (Waschuk *et al.*, 2001; Kakio *et al.*, 2002; Kremer *et al.*, 2001).

Ein *in vivo* Nachweis selektiver Lipide am Ort der Fibrillenentstehung könnte weiteren Aufschluss über einen möglichen Einfluss von Lipiden auf die Pathogenese von Amyloidosen geben. Dies ist jedoch bei humanen Amyloidosen nicht durchführbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine Analyse von humanem *ex vivo* Amyloid-Material durchgeführt. Bei Untersuchungen im Vorfeld dieser Arbeit an aufgereinigten „prion rods“ (Prion-Fibrillen) aus Hamstern konnte eine spezifische Assoziation von 1 bis 2 % Sphingolipiden nachgewiesen werden (Klein *et al.*, 1998). Hier sollte die Lipidkomposition in von kooperierenden Pathologen und Wissenschaftlern extrahierten humanen Amyloid-Fibrillen verschiedener Amyloidosen untersucht werden. Das Vorkommen selektiver Lipidmuster kann Einblick in den Fibrillenbildungsprozess oder den cytotoxischen Mechanismus geben. Da das Patientenmaterial nur in geringer Menge vorlag, mussten sensitive und quantitative Analysemethoden, mit denen sich Lipide in Amyloid-Fibrillen analysieren lassen, etabliert werden.

2. Material und Methoden

Um kleinste Proteinmengen, Amyloid-Fibrillen und darin enthaltene NebenkompONENTEN wie Lipide untersuchen zu können, mussten herkömmliche Methoden im Mikro-Maßstab etabliert und neue Methoden entwickelt werden. Zur Vermeidung eines eventuellen Infektionsrisikos beim Umgang mit Amyloid-Fibrillen wurden alle Arbeiten im Abzug und mit Handschuhen durchgeführt.

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Die benutzten Chemikalien waren alle vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad und stammten meist von der Firma Sigma (Deisenhofen). Weitere analysenreine Chemikalien wurden von der Firma Roth (Karlsruhe), Fluka (Bruchs, Schweiz) und der Firma Merck (Darmstadt) verwendet. Das verwendete Wasser wurde durch eine Hausanlage mit nachgeschaltetem Ionenaustauscher gereinigt. Lösungen wurden, wenn notwendig, entweder 20 Minuten bei 121°C autoklaviert oder sterilfiltriert.

2.1.2 Lipidstandards

Ganglioside (Typ III), Sulfatide (Cerebrosid sulfate), Galactoceroside (Typ I: hydroxyliert; TypII: nicht hydroxyliert oder eine Mischung), Phosphatidylcholin (Type III-B), Phosphatidylethanolamin (Type I: 40 % L-A-Cephalin 60 % Plasmalogen), Phosphatidylserin und Sphingomyelin aus bovinem Hirngewebe wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Ebenfalls stammten von Sigma (Deisenhofen) Phosphatidylinositol aus boviner Leber, Phosphatidylglycerol aus Eigelb, Cholesterol und Squalen aus porciner Leber, sowie eine Reihe synthetischer Lipidstandards:

1,2-Di(perdeutero)hexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphocholin MW 796,4
1,2-Didocosanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (C22:0) MW 902,4
1,2-Dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (C15:0) MW 706,0
1,2-Distearoyl-sn-glycerol-3-phosphocholin dihydroxy (C18:0) MW 790,2
1,2-Dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholin (C18:1) MW 786,1
1,2-Dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (C18:2) MW 784,1
1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (C14:0) MW 635,9
1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (C18:0) MW 748,1
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (C18:1) MW 744,1

Daneben wurden Gesamtlipidextrakte aus boviner Leber und Herz und aus porciner Gehirn von der Firma Avanti Polar Lipids, Alabaster USA, verwendet.

2.1.3 physiologische Gewebeproben für Lipidextraktionen

Hirne von Laborratten wurden von der Bayer AG (Wuppertal) zur Verfügung gestellt. Milzgewebe vom Schwein und Herzgewebe vom Rind wurden für Kontrollexperimente frisch vom Schlachthof in Jena bezogen.

2.1.4 Sonstige Materialien

Chromatographiepapier (3MM Chr)	Whatman, Maidstone, UK
Entwicklungskammern für DC, vertikal (210×30×110 mm)	Merck, Darmstadt
Probenröhrchen mit Schraubverschluss (Polymer, 4 ml und 2 ml)	CS-Chromatographieservice GmbH, Langerwehe
Mikrozentrifugenröhrchen aus Glas, 1 ml	Werkstattanfertigung, IMB Jena
Proteinstandard 14-200 kDa, (HEW 407)	Gibco BRL, Paisley, UK
Teflon-Dichtungsscheiben, passend für Probengefäße	Werkstattanfertigung, IMB Jena
Teflonstopfen für Mikrozentrifugenröhrchen	Werkstattanfertigung, IMB Jena
HPTLC Platten Nano Silgur-20 10*10 cm oder 10*20 cm Schicht 0,2mm Kombinationsschicht Kieselgur (Auftragszone) / Nano-Kieselgel 60	Macherey und Nagel, Düren Katalog-nr.: 811032, 811033
Glasgefäße mit polyethylen-Teflon oder doppelt Teflon Crimpklappen (0.3; 0.8; 2; 3.5; 10 ml)	CS-Chromatographieservice GmbH, Langerwehe
Auftragschablone für DC	Werkstattanfertigung, IMB Jena
Hamiltonspritzen	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Halterungen für DC-Platten	Werkstattanfertigung, IMB Jena
Objektträger, Silane prep	Sigma, Deisenhofen
Deckgläser	Karl Roth, Karlsruhe

2.1.4. Amyloid-Proben

Jeweils 15 verschiedene Amyloid-Proben waren eine freundliche Gabe von Prof. Reinhold P. Linke vom MPI für Biochemie in München, Deutschland, (Bezeichnung L1 - L15) und von Prof. Mordechai Pras und Dr. Shmuel Strasburg vom Heller Inst. of Medical Research, Sackler Faculty of Medicine Tel Aviv, Israel, (Bezeichnung P1 - P15). Sie wurden nach der „Wasseraufreinigungsmethode nach Pras“ (Pras *et al.*, 1968) von den oben genannten Wissenschaftlern aufgereinigt und in lyophilisierter Form versandt.

Im Folgenden eine kurze Beschreibung: Amyloidhaltiges Gewebe wurde direkt nach dem Tod entnommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C eingefroren. 20 g amyloidhaltiges Gewebe wurden in 400 ml eisgekühlten 0,15 M NaCl mit einem Virtis-45 „high speed homogeniser“ für 30 Sek. homogenisiert, bei $1,8 \times 10^4$ g zentrifugiert und der Überstand

verworfen. Das Sediment wurde wie beschrieben erneut homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Diese Prozedur wurde 8 bis 10 mal wiederholt. Danach wurde die Salzkonzentration verringert, indem das Pellet erneut mit 300 ml H₂O dest. homogenisiert, bei $2,8 \times 10^5$ g zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen wurde. An dieser Stelle reicht die Salzkonzentration im Pellet noch aus, um die Amyloid-Fibrillen auszufällen. Nun wurde diese Prozedur mit 200 ml eisgekühltem H₂O dest. viermal wiederholt und die Überstände gesammelt. Die Überstände II-V enthielten die gereinigten Amyloid-Fibrillen. Sie wurden vereinigt und lyophilisiert.

Tabelle 2.1 Übersicht über die analysierten wasseraufgereinigten *ex vivo* Amyloid-Proben

Linke (15 Proben)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15
Amyloidtyp	AA	Aλ	AλII	Aλκ	ATTR (w)	ATTR (v)	Aβ2m	Aλ	AA	Aλ	Aλ	Aλ	Aλκ	Aλκ	Aλ
Klinisches Syndrom	systeme.	systeme.	systeme., entzü.	systeme., entzü.	senile	fam. Polyneuropat.	Subkutaner Knoten	systeme., entzü.	systeme., entzü.	systeme., entzü.	systeme., entzü.	Faktor X-Mangel	systeme. knotige	septale systeme.	systeme., entzü.
Gewebe /Organ	Milz	Gehirn	Milz	Herz	Herz	Herz	Haut	Rectum	Milz	Milz	Leber	Milz	Brust	Muskel knoch.	Milz
Publikation / Beschreibung	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.
Pras (15 Proben)	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15
Amyloidtyp	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	ATTR (v)	Aλ	Aλ	Aλ	Aλ	Aλκ	ATTR (v)
Klinisches Syndrom	systeme., entzü.	systeme., entzü.	FMF	FMF	FMF	Hypernephro.	systeme., genet.	FMF	senile	systeme., entzü.	fam. Polyneuropat.				
Gewebe /Organ	Leber	Milz	Milz	Niere	Schilddrüse	Leber	Leber (Ente)	Milz	Herz	Milz/Leber	Milz	Milz	Milz	Leber	Milz
Publikation / Beschreibung	16.	17.	18.	19.	20.	21.	22.	23.	24.	25.	26.	27.	28.	29.	30.

1. Teilssequenziert noch nicht veröffentlicht, bekannte AA-Sequenz; Geschlecht: m; Alter: 20
2. Linke *et al.*, 1992; Geschlecht: m; Alter: 55
3. Linke und Hus, 1992; Geschlecht: m; Alter: 74
4. Eulitz und Linke, 1982; Geschlecht: w; Alter: 53
5. Linke, 1988 Transthyretin-sequenz; Geschlecht: m; Alter: 88
6. Teilssequenziert noch nicht veröffentlicht Transthyretin-sequenz; Geschlecht: m; Alter: 42
7. Teilssequenziert noch nicht veröffentlicht β2-Mikroglobulin-sequenz; Geschlecht: m; Alter: 61
8. Nachweis mittels Immunhistochemie; Geschlecht: w; Alter: 57
9. Sequenziert nicht publiziert; Geschlecht: w; Alter: 58
10. Nachweis mittels Immunhistochemie; Geschlecht: m; Alter: 74
11. Nachweis mittels Immunhistochemie
12. Nachweis mittels Immunhistochemie; Geschlecht: m; Alter: 53
13. Sequenziert nicht publiziert; Geschlecht: w; Alter: 50
14. Sequenziert nicht publiziert; Geschlecht: w; Alter: 57
15. Nachweis mittels Immunhistochemie; Geschlecht: m; Alter: 55
16. Pras *et al.*, 1980
20. Prelli *et al.*, 1987; Gal *et al.*, 1995
21. Shtrasburg *et al.*, 1982
22. Gorevic *et al.*, 1977
30. Pras *et al.*, 1983; Geschlecht: m; Alter 28
17. - 19., 24 - 29. Sequenziert nicht publiziert

Abkürzungen:

systeme.: systemisch
 entzü.: entzündlich
 genet.: genetisch
 FMF: Familiäres Mittelmeerfieber
 Hypernephro.: Hypernephroma
 fam. Polyneuropat: familiäre polyneuropathie
 W: Wildtyp
 V: variant
 w: weiblich
 m: männlich

2.1.5 Immunoaffinitätsgereinigte „paired helical filaments“

Zusätzlich wurde von Prof. Peter Davies (Dept. of Pathology, Albert Einstein College of Medicine, New York, USA) 4 Röhrchen mit jeweils 1 ml aufgereinigten Proben von intra-

zellulären hyperphosphorilierten Fibrillen des Tauproteins, gelöst in Trispuffer (10mM) mit 140 mM NaCl, pH 7,4 (100 - 200 µg/ml), zur Verfügung gestellt. Diese Fibrillen wurden nach einer von Prof. Peter Davies entwickelten Methode in seinem Labor aufgereinigt (Vincent und Davies, 1992) und auf Trockeneis versandt.

Hier eine kurze Beschreibung: Hirngewebe von Alzheimer-Patienten wurde postmortem innerhalb eines 11stündigen Intervalls entnommen und bei -70°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Corticales Gewebe wurde im 10fachen Volumen Trispuffer (0,01 M Tris, 0,14 M NaCl, pH 7,4) homogenisiert. Das Homogenat wurde 30 Min. bei 4°C und $2,7 \times 10^4$ g zentrifugiert und der Überstand für eine Immunoaffinitätsreinigung verwendet. Der monoklonale Antikörper, der für die Affinitätsreinigung der PHFs verwendet wurde, war Ab42 (IgG) (Spira *et al.*, 1984). Ab42 wurde nach Reinigung durch Dialyse an „Affi-Gelkugeln“ (Bio-Rad) gekoppelt und in eine Säule gefüllt. Nach Elution mit 3 M Kaliumthiocyanat und TBS wurde der Überstand des Gehirnhomogenats auf die Säule gegeben. Adsorbiertes Protein wurde mit einem Elutionspuffer von der Säule gelöst und die Peakfraktionen dialysiert.

2.2 Methoden

2.2.1 Umgang mit Lipiden

Polymergefäße und Pipettenspitzen konnten nicht verwendet werden, da durch organische Lösungsmittel geringe Mengen organischer Verbindungen herausgelöst werden, die die Versuchsergebnisse stören. Alle Operationen wurden deshalb in speziellen Glasgefäßen (Mikrozentrifugenröhrchen mit Teflonstopfen oder Crimpkappengefäße verschiedener Volumina) sowie mit Glaspipetten und Hamiltonspritzen durchgeführt. Wenn Lipide in andere Gefäße überführt werden mussten, wurde das Ursprungsgefäß dreifach mit Lösungsmittel nachextrahiert und die Lösungen im neuen Gefäß vereinigt. Durch Verdunsten der organischen Lösungsmittel unter kontinuierlichem Argonstrom konnte das Volumen jederzeit wieder reduziert werden. Das Edelgas verhindert dabei auch eine Oxidation der empfindlichen Lipide. Um eine kontinuierliche Volumenabnahme und demzufolge Konzentrationszunahme beim Lagern der Lipide zu verhindern, wurde statt des normalerweise verwendeten Chloroform/Methanol-Gemischs (Verhältnis 2:1) 1,2-Dichlorpropan und 1-Propanol (Verhältnis 2:1 Siedepunkte von je ca. 100°C), verwendet, wodurch die Lösungen bei -20°C und -80°C wesentlich länger gelagert werden konnten. Lipidstandards, die in Chloroform/Methanol geliefert wurden, aber auch Trockensubstanzen, die noch einen geringen Teil an Wasser enthielten, wurden vor Gebrauch vollständig unter Argonbedampfung evaporiert, um ihr Gewicht zu bestimmen. Sie wurden dann

in entsprechender Konzentration in den gebräuchlichen Lösungsmitteln für die nachfolgenden Methoden aufgenommen.

Von den Lipidklassen wurde eine Stammlösung durch Verdampfen und Wiederaufnahme in neuem Lösemittel mit einer Konzentration von 5 mg/ml hergestellt. Ganglioside und Sulfatide sind aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften schwerer in organischen Lösungsmitteln löslich. Von ihnen wurden deshalb Stammlösungen von 1 mg/ml und 2,5 mg/ml angesetzt, wobei eine klare Lösung erst nach 10minütiger Behandlung im Ultraschallbad erreicht werden konnte. Für quantitative Arbeiten wurden alle Gefäße und Substanzen auf 5 Nachkommastellen genau mit einer Waage Research R200D der Firma Sartorius gewogen. Von den Stammlösungen wurden Gesamtlipidstandards mit einer Konzentration von 1 mg/ml pro Lipidklasse durch Evaporation und Aufnahme in geeigneter Lösungsmittelmenge angesetzt.

2.2.2 Lipidextraktion von unlöslichen Proben

Lyophilisierte Amyloid-Proben wurden in einem konischen Glaszentrifugenröhrchen gewogen und 500 µl 2:1 CHCl₃/CH₃OH hinzugegeben, gevortext, die Proben für 10 Min. in ein Ultraschallbad gestellt und dann 1 Std. bei 4°C inkubiert. Bei grösseren, unlöslichen Aggregaten wurde zusätzlich noch ein Mikromörser eingesetzt oder die Proben mit einem Glasstab an der Glaswand homogenisiert. Glasstab und Mörser wurden zweimal mit 100 µl 2:1 CHCl₃/CH₃OH abgespült. Die nicht-Lipid-Komponenten wurde 20 Min. bei 22.000 g pelletiert. Der Lipidextrakt wurde abgenommen und die Extraktion 4 bis 5 mal wiederholt. Die Überstände wurden vereinigt, abgedampft und gewogen. Sie wurden direkt auf die Dünnschichtplatte appliziert oder in 2:1 1,2-Dichlorpropan/1-Propanol bei -80°C gelagert. In einem Kontrollexperiment mit Probe L3 wurden die Überstände durch partielles Verdunsten konzentriert und direkt auf die Dünnschichtplatte appliziert. Dabei zeigte sich, dass nach der erste Extraktion mehr als 95 % der Lipide entfernt waren, nach der zweiten 99,5 % und mehr als 99,9 % (Nachweisgrenze) nach der dritten Extraktion.

2.2.3 Lipidextraktion von gelösten Proben und Entfernung wasserlöslicher

Verunreinigungen

Zu 80 µl einer gelösten Probe oder zu einer in 80 µl H₂O suspendierten festen Probe wurden 100 µl CHCl₃ und 200 µl CH₃OH gegeben. Nach Vermischung für drei Minuten wurden weitere 100 µl CHCl₃ zugegeben, eine weitere Minute vermischt und schließlich mit 100 µl 2M KCl (oder H₂O, wenn Alkaliionen unerwünscht waren) versetzt. Nach Vermischung für 3 Min. wurde kurz bei 3.000 g zur Phasentrennung zentrifugiert. Die organische Phase wurde unter Zuhilfenahme von

50 µl extern präparierter Unterphase quantitativ isoliert. Zur Entfernung wasserlöslicher Verunreinigungen wurde zweifach mit extern präparierter Oberphase (nicht H₂O, da es zu Lipidverlust führte) gewaschen.

2.2.4 Totallipidextraktion aus Hirn (Ratte)

Lipidextrakte aus Hirn dienten als Positivkontrollen für die Lipidanalyse. Das Extraktionsverfahren war eine Modifikation der Methode von Bligh und Dyer, (1959) und Macala *et al.*, (1983). Alle Schritte wurden bei 4°C unter Argonatmosphäre durchgeführt. Die präparierten Hirne (Ratte: ~1,7g) wurden in einen 50 ml Rundkolben zu 10 ml CHCl₃:CH₃OH 1:1 (v/v) gegeben und dreimal für eine Minute mit einem Ultradisperser (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen) homogenisiert. Die flüssige Phase wurde durch eine G3-Glassinterfritte in einen Rundkolben filtriert. Das verbliebene feste Material wurde zweimal mit demselben Lösungsmittel nachextrahiert und die Glasgeräte mit 10 ml CHCl₃ nachgespült. Zu den vereinigten Lösungen (30 ml) wurden 10 ml CH₃OH und 18 ml 2M KCl gegeben (Verhältnis C:M:KCl 2:2:1,8 v/v/v). Der Kolben wurde mit einem Schliffstopfen verschlossen und für fünf Minuten geschüttelt. Die trübe Flüssigkeit wurde in ein Glaszentrifugenröhrchen überführt und der Kolben mit 2 ml extern präparierter Unterphase gespült. Um die Phasen komplett zu trennen, wurden die vereinigten Flüssigkeiten zwei Minuten bei 3.000 g zentrifugiert. Es bildete sich eine schmale Protein-Interphase. Nach Entfernung des Großteils der farblosen Oberphase wurde die gelbliche Unterphase in einen tarierten Rundkolben überführt und der Rückstand mit 2 ml extern präparierter Unterphase nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden in einem Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 25°C eingengt und die Ausbeute ermittelt (5,9 % des Feuchtgewichts). Die Lipide wurden mit C/M zu einer Stammlösung mit 10 mg/ml Gehalt gelöst und unter Argon bei -80°C gelagert.

2.2.5 HPTLC zur Separation und zum Nachweis von Lipidklassen

Diese Methode erlaubt es polare und neutrale Lipidklassen auf einer Dünnschichtplatte (Yao und Rastetter, 1985) zu trennen. Vertikale Entwicklungskammern (210 × 30 × 110 mm), ein Fön und ein Trockenschrank wurden verwendet. Die Laufmittel (LM) in den Kammern wurden vor jeder Entwicklung erneuert. Eine gesättigte Lösungsmittelatmosphäre wurde durch eine Auslegung der Kammer mit einem Bogen aus getränktem Filterpapier erreicht. Die Entwicklungszeiten lagen in gesättigter Atmosphäre der Kammer bei 20 Min. für LM 1 und 17 Min. für LM 2/3.

Mit Kieselgel beschichtete Dünnschichtplatten des Anbieters Macherey-Nagel der Größe (10 x 10) cm und (10 x 20) cm mit 2,5 cm Vorkonzentrationszone wurden für die Trennung von

Lipidklassen eingesetzt. Die Proben wurden in 1,7 cm Höhe auf die Konzentrierungszone aufgetragen. Um für die quantitative Auswertung mit einem CAMAG TLC Scanner II gleiche Abstände und Bedingungen zu gewährleisten, wurde eine Schablone aus Acrylglas angefertigt. Sie ermöglicht das Auftragen von Proben im Abstand von 6 mm oder 8 mm. Es wurde ein Abstand vom Plattenrand von 8 bis 10 mm eingehalten.

Appliziert wurden die Proben mit Mikroliterspritzen (Firma Hamilton, Schweiz). Es wurden Volumina zwischen 0,1 µl und 10 µl gespottet. Dazu wurden die Proben unter einem kontinuierlichem Argonstrom verdampft und in der entsprechenden Menge Lösungsmittel (2:1 1,2-Dichlorpropan/1-Propanol) aufgenommen. Es wurde darauf geachtet, dass die applizierte Probenmenge nicht 1 µg/Lipidklasse überschritt.

Vor dem Auftragen der Proben wurden die Platten einmal mit Methanol und anschließend mit Laufmittel (LM) 1: (CH₃COOH:CH₃CH₂CH₂OH:CHCl₃:CH₃OH:0,25%KCl; 25:25:25:10:9) vorentwickelt, um die von der Herstellung rührenden Verunreinigungen zu beseitigen und die Platte mit Kaliumchlorid zu beladen. Anschließend erfolgte die Ausheizung der Platte bei 110°C im Heizofenschrank, damit das Laufmittel restlos verdampft und das Kieselgel auf der Platte aktiviert wird. Nach Probenauftrag wurde mit LM 1 bis 4,7 cm vom Anfang der Trennzone entwickelt. Die Platte wurde 1,5 Min. mit einem Fön getrocknet, wie auch nach den folgenden Entwicklungsschritten. Es folgte eine Entwicklung auf die volle Länge der DC-Platte mit LM 2 (n-C₆H₁₄:(C₂H₅)₂O: CH₃COOH; 75:23:2). Abschließend wurde mit LM 3 (n-C₆H₁₄) auf volle Länge entwickelt. Die Trennung der Lipidklassen wird bereits nach der Entwicklung mit LM 1 zum großen Teil erreicht. Die Folgeentwicklungen dienen der Bandenfokussierung sowie der besseren Trennung der unpolaren Lipidklassen.

Zur Färbung der Banden wurden die Platten für 3 Sek. in eine Lösung getaucht, die 10 % CuSO₄*5 H₂O (w/v) und 8 % H₃PO₄ (w/v) enthält. Die Platte wurde 6 Min. lang bei 170°C ausgeheizt. Danach wurde die Schwärzung der Platte alle 30 Sek. überprüft, bis die Vorkonzentrierungszone eine leicht gelbliche Färbung annahm. Die geschwärzten Lipidspuren ließen sich im Vergleich mit Lipidstandards bekannter Zusammensetzung eindeutig qualitativ zuordnen.

2.2.6 Quantitative Lipidbestimmungen und Datenprozessierung

Für quantitative Bestimmungen wurden ausschließlich (10 x 20) cm DC-Platten und eine Auftragsschablone mit einem Auftragsabstand von 8 mm verwendet. Mit dieser Vorrichtung lassen sich 24 Proben parallel und an genau definierte Positionen applizieren. Um alle Lipidklassen einer Probe mit einem Versuch quantifizieren zu können, wurde für eine Eichgerade Gemischstandards aus bis zu 18 Komponenten (1 mg/ml pro Lipidklasse in 2:1 1,2-Dichlor-

propan/1-Propanol) hergestellt. Abhängig vom aufzutragenden Volumen der Probe (0,5 - 1,5 µl oder 1,5 - 10 µl) wurden die Eichpunkte der Eichgeraden so gewählt, dass die Standards von 50 – 500 ng in 75 ng Schritten in einem Volumen von 0,7 µl oder 2 µl aufgetragen werden konnten.

Alle organischen Lösemittelgemische verdampfen teilweise auch bei –70°C über einen längeren Zeitraum. Um über mehrere Monate vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurden identische Gemischstandards hergestellt, unter Argon verdampft und bis zum Gebrauch bei –70°C gelagert. Vor Ansetzen einer Eichgerade wurde der Gesamtlipidstandard 20 Min. bei –20°C zwischengelagert und dann im Kühlschrank aufgetaut. Nach Zugabe von 1 ml Lösungsmittel wurden die Verdünnungen für die Eichgerade angesetzt. Verdünnungen für Eichgeraden wurden jede Woche erneuert.

Die Eichwerte wurden jeweils doppelt gespottet, was es ermöglicht auch bei einzelnen Ausreißern immer genügend Werte für eine Eichgerade zur Verfügung zu haben. Die Lipidspuren wurden quantitativ durch optische Reflektionsdensitometrie bei 428 nm ausgewertet (CAMAG TLC Scanner II). Die vom Scanner erhaltenen Daten konnten anschließend über Peakhöhe und Peakfläche ausgewertet werden. Da das Scannerprogramm keinen Datentransfer zuließ, mussten alle Daten manuell in eine Exceltabelle übertragen werden. Auswertungen erfolgten automatisch durch selbstprogrammierte Excelsheets. Durch die Eichgerade wurde ein polynomischer Fit 2ten Grades gelegt. Nur wenn die R-Werte der Geraden (Wahrscheinlichkeit eines Punktes auf der Trendlinie zu liegen) über 0,97 lagen, wurde die Eichgerade verwendet, um Proben zu quantifizieren.

2.2.7 Micro-High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) der Lipidproben

Das Micro-HPLC-Trennungsverfahren ist eine Modifikation der Methode nach Olsson *et al.*, 1996. Um eine Trennung geringer Lipidmengen zu erreichen, muss mit sehr kleinen Volumina und hohen Drücken gearbeitet werden. Dazu wurde eine Pharmacia Smart HPLC Anlage (Pharmacia-Biotech, Freiburg), wie sie für Proteinanalytik eingesetzt wird, benutzt. Die Anlage verfügt über zwei 10 ml Spritzenpumpen, die einen binären Lösemittelgradienten auch bei kleinsten Flussraten gewährleisten. Als Säulen wurden drei auf Bestellung angefertigte Microbore-Säulen der Firma Macherey und Nagel, Düren, mit den Maßen: 1,0 mm x 100 mm, 0,75 mm x 150 mm und 1,0 mm x 150 mm verwendet. Sie wurden mit einem DIOL modifizierten Kieselgel-100 mit 5 µm sphärischen Partikeln bestückt. Eine Flussrate von 50 µl/Min. wurde standardmäßig verwendet. Lipide wurden mit einem UV-Detektor bei 205 nm, 210 nm und 280 nm detektiert. Das Absorptionsmaximum für Doppelbindungen, nur diese absorbieren in den ungesättigten Fettsäuren der Lipide UV-Licht, liegt bei 204 nm. Das beste

Signal/Rausch-Verhältnis wurde bei 210 nm erhalten. Bei 205 nm konnten trotz verstärkten Rauschens noch kleinste Lipidmengen detektiert werden und eine Absorption bei 280 nm diente zu Detektion von Proteinverunreinigungen.

Es wurden nur Lösungsmittel verwendet, die im Detektionsbereich keine Eigenabsorption haben. Ein binärer Gradient aus komplexen Lösungsmittelgemischen wurde gefahren. Eluent A bestand aus: n-Hexan, 2-Propanol, n-Butanol, Tetrahydrofuran, Isooctan und Wasser (64,5:17,5:7:5:5:1, v/v); Eluent B bestand aus: 2-Propanol, n-Butanol, Tetrahydrofuran, Isooctan und Wasser (73:7:5:5:10, v/v). Standardmäßig wurden beide Lösungsmittelsysteme mit 120 mg/L Ammoniumacetat versetzt, wobei auf eine genaue Einhaltung der Salzkonzentration geachtet wurde. Anschließend wurden Eluent A und B für 10 Min. ins Ultraschallbad gebracht um Gase zu entfernen. Die Eluenten wurden in speziell von der Werkstatt des IMB in Jena angefertigten Flaschen, die die Ausnutzung auch kleinster Mengen Elutionspuffer gewährleisten, gefüllt und jeden Monat erneuert.

Applizierbare Probenvolumina wurden durch die Probenschleifen von 5 µl und 20 µl vorgegeben. Alle Proben wurden restlos vor Injektion unter Argon verdampft und mit Eluent A in einer Konzentration von rund 1 mg/ml pro Lipidklasse aufgenommen und mit einer Hamiltonspritze injiziert.

Lipidgemische wurden mit mehrstufigen Gradienten von 0 % bis 100 % Eluent B über einen Zeitraum von 50 bis 85 Min. bei Raumtemperatur eluiert. Standardmäßig wurde eine Peakfraktionierungsgröße von 280 µl mit einer Peakdetektion bei 0,05 AU und einer Steigung von 33 % eingestellt. Peaks wurden in der Fraktionierungseinheit in 0,3 ml Crimpkappengefäßen aus Glas gesammelt. Die Ausbeute und die Trennung der Lipidklassen wurde mittels quantitativer DC in Kontrollexperimenten bestimmt, wobei sich regulär eine Ausbeute von über 90 % und in den schlechtesten Fällen von noch über 80 % der eingesetzten Lipidmenge ergab. Proben für die Bestimmung mittels Massenspektrometrie wurden vollständig unter Argon evaporiert und in 2:1 C/M aufgenommen.

2.2.8 Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI-MS) von Lipidproben

Um die Empfindlichkeit der MALDI-MS von Lipiden zu erhöhen, wurde eine neue Präparationstechnik entwickelt, bei der Matrixpräparation und Probenauftrag entkoppelt sind. Sie entspricht der von Vorm *et al.*, 1994 für Proteine beschriebenen Verfahrensweise. 1 µl einer 0,5 M 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Methanol mit 0,1 % Triofluorsäure (v/v) Lösung wurden in ein Well eines Platinprobentellers (Bruker Daltonics, Bremen) mit zehn kreisförmig angeordneten, rechteckigen Wells aufgebracht. Die geringe Lösemittelmenge evaporiert dabei innerhalb von 5 Sek. bei Raumtemperatur und es bildet sich eine kristalline Matrix. Proben

wurden in verschiedener Konzentration in 2:1 oder 95:5 Chloroform/Methanol aufgenommen. Analytenlösungen wurden in einem Volumen von 1 bis 2 μl oben auf die Matrix mit einer Hamiltonspritze aufgetragen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Matrix wird dadurch leicht an ihrer Oberfläche gelöst und es bildet sich eine homogene, dünne Schicht aus kleinen Analyt/Matrix-Mischkristallen. Summenspektren wurden auf einem Bruker BiflexTM Massenspektrometer (time of flight) aus 10 bis 30 „Einzelschüssen“ mit einem gepulsten Stickstofflaser (337 nm) aufgenommen. Die Laserstärke wurde auf 10 % über dem Schwellenwert gehalten und die kinetische Energie der gebildeten Ionen betrug 20 keV. Alle Spektren wurden im Reflektorionenmode aufgenommen.

Der Druck in der Ionenkammer wurde konstant zwischen 1×10^{-7} und 4×10^{-7} Torr aufrecht erhalten. Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wurden 100 „Einzelschüsse“ für jedes Spektrum akkumuliert, wobei nach 15 Laserimpulsen manuell auf eine andere unbehandelte Stelle in einem Well gefahren wurde.

Vor jeder Messung wurde das Gerät mit einem externen synthetischen Lipidstandardgemisch, das auf eines der Wells auf dem gleichen Probenhalter wie der Analyt aufgetragen wurde, kalibriert. Bekannte Matrixpeaks wurden als interner Standard zur Kontrolle der Kalibrierung verwendet. Es wurden Spektren sowohl im negativen als auch im positiven Ionenmodus aufgenommen. Unbekannte Massen wurden anhand von Tabellen aus Publikationen, eigenen Berechnungen, und Überprüfung durch Vergleich aufgenommener Spektren bekannter Lipidstandards, zugeordnet.

2.2.9 Unilaminare Liposome

Zur Etablierung der Lipidanalysemethoden sowie für Bindungsstudien und Assoziationstest wurden Liposomen hergestellt. Dazu wurden einzelne Lipidklassen oder Gemische von Lipidklassen unter Argon vollständig evaporiert. Die Lipidklassengemische wurden darauf im Ultraschallbad kurz sonifiziert. Die Trockensubstanz wurde in H_2O dest. mit 0,1 % NaN_3 in einer Konzentration von 1 mg/ml aufgenommen und bei 4°C mehrere Stunden unter gelegentlichem Vortexen quellen gelassen. Anschließend wurden zwei Gefrier- und Auftauzyklen (bei -20°C und RT) durchschritten und die Proben jeweils 10 Min. sonifiziert. Um unilaminare Vesikel einer konstanten Größe zu erhalten, wurde eine Liposomenpräparationseinheit und lipophile Membranfilter mit Porengrößen zwischen 50 bis 400 nm (beides Firma Poretics, Livermore, USA) verwendet. Das Liposomengemisch wurde dabei in einen speziellen Probenhalter mit einem Volumen von 1 ml injiziert und 21 mal, mittels Druckluft und dichtsitzenden Kolben mit Teflonmembran, durch den Membranfilter gepresst. Die so hergestellten Liposomen wurden im Elektronenmikroskop auf ihre Größe und Unilaminarität überprüft.

2.2.10 Synthetisches Amyloid

Für die Methodenentwicklung wurde fibrilläres Insulin nach der Methode von Burke *et al.*, (1972) durch Hitze – Kältezyklen hergestellt.

15 mg bovines Insulin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) wurden in 1,5 ml 10 mM Na₂HPO₄ pH 2 gelöst. Die Probe wurde dann für 10 Min. im Wasserbad auf +92°C erhitzt und für 30 Sek. unter fließendem Wasser abgekühlt, bevor sie 30 Sek. in einem Ethanol-Trockeneis-Gemisch schockgefroren wurden. Die Proben wurden unter fließendem Wasser langsam aufgetaut und nochmals für 3 Min. auf +92°C erhitzt. Dieser Zyklus wurde 7 mal wiederholt. Danach wurde das Volumen mit 10 mM Na₂HPO₄ pH 7,4 auf 15 ml aufgefüllt.

2.2.11 Präparation eines nichtkovalenten Proteinfibrillen-Lipid-Komplexes

Ein Komplex aus Insulinfibrillen und 50 nm großen Liposomen aus einer oder 2 Lipidklassen wurde als Positivkontrolle für die Lipidextraktion benutzt (Lins *et al.*, 1993). 1 mg Insulin-Fibrillen wurden in 200 µl H₂O dest. aufgenommen und zu 10 µg Lipidvesikel in 10 µl H₂O dest. gegeben. Die Lipidvesikel wurden wie oben beschrieben hergestellt. Die Mischung (100:1 m/m) wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und nicht gebundenes Lipid durch Zentrifugation der Amyloid-Fibrillen bei 20.000 g vom Pellet getrennt. Sie wurden wie oben beschrieben extrahiert.

2.2.12 Kontrolle: Wasseraufreinigungsmethode nach Pras an „gesunden“ Tiergeweben

Zur Kontrolle wurde in dieser Arbeit die „Wasseraufreinigungsmethode nach Pras“ auf Gewebeproben von „gesunden“ Tieren angewandt. 3 Gramm einer Milz vom Schwein und 3,2 Gramm eines Herz vom Rind wurden mit einem Ultradisperser (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen) 30 Sek. bei mittlerer Stärke homogenisiert. Anschließend wurden die Zentrifugationsschritte (Sorvall, SA-300 Rotor) bei $2,1 \times 10^4$ g und Homogenisierungsschritte wie oben beschrieben, 10 mal mit 30 ml 0,15 M NaCl durchgeführt.

Danach wurden diese Prozedur fünfmal mit H₂O dest. wiederholt, wobei mit $2,8 \times 10^4$ g zentrifugiert wurde. Die Überstände II-V sollten bei erkranktem Gewebe die Amyloid-Fibrillen enthalten. Alle Überstände wurden gesammelt und auf ihren Proteingehalt überprüft. Danach wurden sie lyophilisiert und einer Lipidextraktion unterzogen.

2.2.13 Spezifische Kongorotfärbung für Polarisationsmikroskopie zum Amyloidnachweis.

0,1 % Kongorotlösungen (Merck, Darmstadt) wurden in H₂O dest. mittels Ultraschall für 20 Min. gelöst und sterilfiltriert. Nach der Methode von Scherzinger *et al.*, (1997) wurden 100 µl Natriumphosphatpuffer mit Insulin für 30 Min. mit 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet rund 100 µg Protein in 150 µl H₂O dest. gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 15 Min. wurde das Pellet in 20 µl H₂O dest. resuspendiert.

8 - 10 µl der Probe (Amyloid-Proben gelöst in H₂O dest. oder gewaschene Insulinfibrillen) wurden auf aminoalkylsilanierte Objektträger, die Proteine besonders gut adsorbieren, mit einer Pipette aufgegeben. Die Proben wurden mit einem Deckgläschen überschichtet und mehrere Stunden bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Nach Entfernung der Deckgläschen wurden die Proben mit 4 % Formaldehyd in 1x PBS fixiert. Alternativ dazu wurden 4 µl der Probenlösung direkt in einem Tropfen auf den Objektträger aufgebracht, eintrocknen gelassen und mit 4 % Formaldehyd in 1x PBS fixiert. Die Objektträger wurden zweimal für 10 Min. mit H₂O dest. gewaschen. Anschließend wurden sie mit 0,1 % Kongorotlösung für 4 Min. inkubiert (Romhányi, 1971). Das überschüssige Kongorot wurde mit zwei 10minütigen Waschschritten mit H₂O dest. und zweimal 10 Minuten mit 20 % Ethanol abgewaschen.

Zur Aufbewahrung der Proben wurden sie mit Gummiarabicum überschichtet und mit einem Deckglas eingedeckelt. Um zu verhindern, dass sich bei Langzeitlagerung Luftblasen zwischen Objektträger und Deckglas bilden, wurden die Ränder zusätzlich noch mit durchsichtigem Nagellack umrandet.

2.2.14 Lichtmikroskopie und Polarisationsmikroskopie

Amyloid-Fibrillenpräparate wurden mit einem Leica DMRE Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Polarisiertes Licht wird dabei durch die gerichteten Strukturen der Fibrillen beeinflusst. Haftet sich Kongorot an die Amyloid-Fibrillen so kann mit einem Analysator das abgelenkte Licht einer Schwingungsebene sichtbar gemacht werden und es entsteht eine charakteristische grüne Polarisationsfarbe. Der Strahlengang im Mikroskop wurde ausschließlich durch den Polarisator und Analysator durchbrochen. Alle sonstigen Filter wurden entfernt. Bilder wurden mit einer integrierten Leica - Photoappatur und einem Agfa Farbfilm Ct precisa 100 mit 200 bis 600facher Vergrößerung aufgenommen.

2.2.15 Elektronenmikroskopie (EM)

Um Liposomen oder Proteinfibrillen auf einen EM Grid zu blotten, wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. 4 µl Liposomenproben und 3 bis 5 µl Proteinproben in H₂O dest. wurden

auf Kupfer-Netzchen (400/600 mesh) (Firma Plano, Wetzlar) mit einer 25 bis 35 nm Kohlenstoff-Bedampfung pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Min. wurde der Überstand vorsichtig mit einem Filterpapier durch Kapillarkräfte vom Rand des Grids abgezogen. 4 µl 2%ige Uranylacetatlösung (frisch durch Sterilfilter gepresst) wurden auf den Grid pipettiert und 30 Sek. einwirken gelassen. Überschüssiges Uranylacetat wurde mit einem Filterpapier vollständig abgesaugt und die Grids bei Raumtemperatur getrocknet.

Als weitere Methode wurde ein schwimmender Kohlenstofffilm verwendet. Diese Methode produzierte für Proteinfibrillen aussagekräftigere Resultate und wurde deshalb für Proteine ausschließlich verwendet. Hierbei wurde ein Mikafilm mit einer Kohlenstoffbedampfung von 25 bis 35 nm Dicke verwendet. Mit einer Dumont-Umkehrpinzette wurde der Film festgehalten und ein Stück von 6 bis 7 mm Seitenlänge abgeschnitten. 4 µl Probe wurde in einem Winkel von 45° mit einer Pipette zwischen Kohlenstofffilm und Mikaplatte appliziert und für 2 Min. stehen gelassen. Das Mikaplättchen wurde dann vorsichtig von oben auf einen 50 µl Tropfen einer frisch sterilfiltrierten Uranylacetatlösung auf einem Parafilm aufgebracht. Dabei sinkt das Mikaplättchen auf den Grund des Tropfens, wohingegen der Kohlenstofffilm auf dem Tröpfchen schwimmt. Der Kohlenstofffilm wurde dann auf einen Nickelgrid (Firma Plano, Wetzlar) transferiert. Überschüssiges Uranylacetat wurde mit einem Filterpapier vorsichtig abgesaugt und der Grid bei Raumtemperatur getrocknet. Alle mit Uranylacetat in Berührung gekommenen Materialien wurden gesammelt und in speziellen Behältern für radioaktiv kontaminiertes Material entsorgt.

Die Proben wurden mit einem Philips EM 400T oder Zeiss CEM 902A Transmissionselektronenmikroskop bei einer Spannung von 80 kV mit einer 20×10^3 bis 14×10^4 fachen Vergrößerung aufgenommen.

2.2.16 Protein-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Proteinbiochemische Arbeitsschritte wurden wie durch Rehm (1997) beschrieben durchgeführt. Zur Herstellung der 12 bis 15 % vertikaler Plattengele ($140 \times 140 \times 1,5$ mm) wurde die Trenngellösung [20 ml H₂O, 20 ml 4xSDS pH 8,8, 40 ml Acryamid/Bisamid (30:0,8)] nach 10 Min. Entgasung mit 400 µl 10 % APS und 40 µl TEMED versetzt. Das Trenngel wurde nach dem Einfüllen in die Kammer mit 2-Butanol überschichtet. Nach Polymerisation und Entfernung des Butanols wurde das Sammelgel [12,33 ml H₂O, 5 ml 4xSDS pH 6,8, 2,66] ml Acryamid/Bisacrylamid (30:0,8)) mit 100 µl 10 % APS und 15 µl TEMED versetzt, in die Kammer eingegossen und anpolymerisiert.

Um Amyloid-Proben zu denaturieren, wurden verschiedene Auftragspuffer unterschiedlichen pHs benutzt. Standardmäßig wurde ein Auftragspuffer pH 10 [2 ml Tris (0,5 M), 1,5 ml 2-Mercapto-

ethanol, 1 ml 10 % SDS, 1 ml Glycerin, 4 ml H₂O, 25 mg Bromphenolblau] verwendet. Die Proteinproben wurden mit dem gleichen Volumen an Auftragspuffer versetzt und im Heizblock für 5 Min. bei 105°C denaturiert. Nach Abkühlen wurden sie auf das Gel, zusammen mit dem Molekulargewichtsstandard (10 kDa Kaleidoskope Prestained Standard, Bio-Rad, München) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte nach dem Protokoll von Laemmli (1970) nach dem Molekulargewicht bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA in einer Vertikal-Elektrophoreseapparatur der Firma BRL, Rockville MD, USA.

2.2.17 Silberfärbung

Das verwendete Verfahren für Proteine ist eine Modifizierung (Damerval *et al.*, 1987) der Methode von Heukeshoven und Dernick (1986). Seine Empfindlichkeit liegt bei etwa 1 ng Protein je Bande. Nach 15 Min. Fixierung (12 % CH₃COOH, 50 % CH₃OH). wurden die Gele 10 Min. zur Entfernung von SDS gewaschen (5 % CH₃COOH, 10 % C₂H₅OH) und 1,5 Min. reduziert [0,3 g K₃Fe(CN)₆, 0,6 g Na₂S₂O₃, 0,1 g Na₂CO₃ in 200 ml H₂O]. Danach wurden sie zweimal 5 Min. mit H₂O dest. gewaschen, bis die gelbliche Farbe verschwand. Nach 10minütiger Inkubation mit der Färbelösung (1 g AgNO₃ in 500 ml H₂O) wurden sie zweimal mit H₂O gewaschen und die Gele 2 bis 5 Min. mit Entwicklerlösung (15 g Na₂CO₃ in 500 ml H₂O, 250 µl 37 % Formaldehyd) behandelt. Zum Stoppen der Reaktion wurden sie 10 Min. mit 10 % CH₃COOH inkubiert.

2.2.18 Ninhydrin-Assay zur Protein-Quantifizierung

Die Proteinquantifizierung mit Ninhydrin wurde modifiziert nach Starcher (2001) durchgeführt. Der Test basiert auf der Bestimmung hydrolysierter Proteine und quantifiziert damit die Gesamtmenge an Aminosäuren. Für die Funktionalität des Testes gibt es zwei Voraussetzungen, um die maximale Ninhydrinfärbung zu gewährleisten. Zum Einen muss genügend reduzierendes Agens vorhanden sein, um ausreichend Ninhydrin zum reduzierten Hydantoin umzuwandeln, dass wiederum Diketohydrindyliden-diketohydrindamin formt, welches die charakteristische lila Farbe hervorruft. Zum Anderen ist die Reaktion abhängig von der Temperatur, dem Volumen und der Zeit.

Für die saure Hydrolyse wurden zu maximal 10 mg Protein 500 µl 6 N HCL für 24 Std. bei 110°C in Glasgefäßen mit Crimpkappen gegeben. Danach wurde die HCl komplett unter Argon verdampft und die Proben in entsprechendem Volumen H₂O dest. 0,1 % NaN₃ wieder aufgenommen. Um nicht nur auf die Hydrolyse von Proteinstandards angewiesen zu sein und einen Fehler durch Verlust an Material des Proteinstandards (BSA und Lysozym) bei der Hydrolyse und Überführung in andere Gefäße zu vermeiden, wurde ein künstlicher Proteinstandard gemischt,

bei dem 10 Aminosäuren (A/P/S/N/M/K/G/V/Y/C; Sigma, Deisenhofen) repräsentativ ausgewählt und in einer Konzentration von 10 mM in H₂O dest. mit 0,1 % NaN₃ (v/v) gelöst wurden. Mit diesem Gemisch und den gewogenen und hydrolisierten Proteinstandards wurden Verdünnungsreihen für eine Eichkurve mit einer Konzentration von 120, 90, 70, 50, 30, 15, 5 µg/ml pipettiert. Die zugegebene Menge an Wasser war dabei konstant. Von allen Standards wurden 100 oder 125 µl dreifach in eine 96-Well Flachbodenmicrotiterplatte der Firma Greiner-Labortechnik, Nürtingen, pipettiert. Von den Proben wurde das gleiche Volumen für eine parallele Mehrfachbestimmung 2 bis 4 mal in die Wells pipettiert. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Konzentration der Proben in der Konzentrationsreichweite der Standards befand.

Als Farbreaktion wurde Ninydrin Reagenz (200 mg Ninhydrin in 7,5 ml Ethylenglycol und 2,5 ml 4 N Natriumacetat Puffer; Sigma, Deisenhofen) verwendet. Vor Gebrauch wurden noch 250 µl zinnhaltige Silberchlorid Lösung (50 mg SnCl₂ in 500 µl Ethylenglycol; Sigma, Deisenhofen) hinzugegeben. Zu den eingesetzten Probenvolumina wurde die entsprechende Menge Farbregenz mit einer Mehrkanalpipette pipettiert. Optimal war eine Entwicklungszeit von 6 Min. bei 95°C im Wasserbad. Die Absorptionsmessung bei 575 nm und die parallele Datenverarbeitung wurde mit einem Microtiterplattenreader Spectramax 250 der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, durchgeführt.

2.2.19 Proteinquantifizierung mit microBCA Test (Firma Uptima)

Der Test basiert auf der abgewandelten Methode von Smith *et al.*, (1985) des Lowry Proteinquantifizierungstests (Lowry *et al.*, 1951). Für diese Anwendung wurde ein fertiger Kit der Firma Uptima-Intechim, Montlucon, Frankreich, verwendet. Das Protokoll wurde leicht modifiziert angewandt. Von einer mitgelieferten 2 mg/ml BSA-Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe für die Eichkurve angesetzt, wobei die zugegebene Menge an Wasser konstant 1 ml betrug. Proben und Lösungen der Eichkurve wurden in oben beschriebener Weise für eine parallele Auswertung in Flachbodenwells einer 96-Well Microtiterplatte der Firma Greiner-Labortechnik, Nürtingen, pipettiert. Das gleiche Volumen an Entwicklungsreagenz wurde mit einer Mehrkanalpipette hinzugegeben. Das Entwicklungsreagenz wurde wie vom Hersteller angegeben aus 25 Teilen Puffer A (beinhaltet 0,1 M NaOH), 25 Teilen Puffer B (beinhaltet Bicinchoninsäure) und 1 Teil der Kupferfärbelösung C vor Gebrauch zusammengemischt. Bei Raumtemperatur beträgt die Entwicklungszeit eine Stunde. Bei der Analyse von fibrillären Aggregaten wurde für 12 Stunden bei 4°C, unter gelegentlichem Umrühren mit einer Glasnadel (dadurch können Voluminaverluste durch Spritzer beim Rütteln vermieden werden), inkubiert, um die 0,1 M NaOH in Puffer 1 länger einwirken zu lassen. Teilweise wurden auch 50 µl 0,5 M NaOH in alle Wells dazugegeben.

3. Ergebnisse

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *ex vivo* Amyloid-Fibrillen sind aufgereinigte Ablagerungen aus von Amyloidosen betroffenem Gewebe, das *post mortem* entnommen wurde. Menschliche Amyloid-Proben können nur unter Einhaltung medizinischer und ethischer Richtlinien in Zusammenarbeit mit Kliniken und Pathologen erhalten werden. Die untersuchten humanen *ex vivo* Amyloid-Proben wurden von Prof. Mordechai Pras aus Tel Aviv, Israel und Prof. Reinhold P. Linke aus München zur Verfügung gestellt. Die Proben repräsentieren vier Fibrillenproteine: AA, AL, ATTR und A β _{2m}. Zusätzlich konnten noch Untersuchungen an humanen „paired helical filaments“ (PHF) aus von Alzheimer-Krankheit betroffenen Gehirnen, die von Prof. Peter Davies aus New York, USA, aufgereinigt wurden, durchgeführt werden. Die Amyloid-Fibrillen wurden von den genannten Wissenschaftlern zur Charakterisierung der Amyloidose und des zugrunde liegenden Fibrillenproteins und seiner Struktur von den anderen Gewebebestandteilen getrennt. Die PHF wurden mit Immunoaffinitätschromatographie aufgereinigt. Alle anderen Amyloid-Fibrillen wurden mit der „Wasseraufreinigungsmethode nach Pras“ (Pras *et al.*, 1968; Methods Enzymol. 309, 1999), die eine Weiterentwicklung der von Cohen und Calkins (1964) publizierten Aufreinigungsmethode für Amyloid-Fibrillen ist, extrahiert. Diese Methode gilt bis heute als Standardmethode zur Aufreinigung aller Amyloid-Fibrillen (Lundmark *et al.*, 2002). Die Aufreinigung basiert auf den biochemischen Eigenschaften der Amyloid-Fibrillen, die sich in destilliertem Wasser lösen und durch Zugabe von physiologischer Kochsalzlösung präzipitieren lassen. Durch Veränderung der NaCl-Konzentration während mehrerer Homogenisierungs- und Waschschrte lässt sich die fibrilläre Amyloidkomponente von anderen Gewebebestandteilen trennen.

Das so extrahierte humane Probenmaterial ist einzigartig und nur in geringen Mengen vorhanden. Für eine Analyse standen für einige Methoden nur Probenmengen für eine einmalige Durchführung zur Verfügung. Alle Methoden mussten deshalb anhand von Standards und künstlichen Amyloid-Proben etabliert werden, bevor Daten mit den *ex vivo* Fibrillen gesammelt werden konnten.

Die vorliegenden Untersuchungen an den *ex vivo* Amyloid-Fibrillen wurden in drei Teile gegliedert: 1. Proteincharakterisierung, 2. Methodenentwicklung und 3. Lipidanalytik von Gesamtlipidextrakten.

- Im ersten Teil wurden die aufgereinigten Fibrillen morphologisch charakterisiert und auf ihre Reinheit und ihren Proteingehalt untersucht.

- Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Entwicklung und Etablierung von Analysemethoden. Um *ex vivo* Amyloid-Fibrillen zu charakterisieren und auf ihren Lipidanteil und ihre Lipidzusammensetzung zu untersuchen, mussten diese Methoden im Mikrobereich optimiert werden.
- Im dritten Teil wurde von den Amyloid-Ablagerungen eine Lipidextraktion durchgeführt, die Lipidklassen qualitativ und quantitativ bestimmt und die molekularen Spezies der Lipidklassen analysiert.

3.1 Charakterisierung der Proteinkomponente aufgereinigter *ex vivo* Fibrillen

Die amyloiden Eigenschaften, der Reinheitsgrad und der Proteingehalt der teilweise über 15 Jahre alten Aufreinigungen wurden untersucht. Dies war wichtig, um für die folgende Analysen zu den molekularen Bestandteilen der aufgereinigten Amyloid-Fibrillen Vergleichswerte zu haben und um Rückschlüsse auf die pathologische Bedeutung gefundener Besonderheiten ziehen zu können.

3.1.1 Synthetisches Amyloid

Alle proteinanalytischen Methoden wurden erst anhand von synthetisch hergestellten Insulinfibrillen etabliert und dann entsprechend mit den Amyloid-Proben durchgeführt.

Die synthetischen Insulinfibrillen wurden durch Hitze-Kältezyklen in saurem Milieu hergestellt. Dazu wurde rekombinantes Insulin in Natriumphosphatpuffer bei pH 2 mehrmals abwechselnd auf -80°C und $+90^{\circ}\text{C}$ gebracht. Die dabei gebildeten synthetischen Amyloid-Fibrillen eignen sich unter anderem für Untersuchungen mit Polarisationsmikroskopie und für elektronenmikroskopische Morphologiestudien. Die Fibrillen zeigten in der Elektronenmikroskopie eine durchschnittliche Länge von über $1\ \mu\text{m}$ und eine Breite von $8\ \text{nm}$. (Abb. 3.2.A).

3.1.2 Identifizierung amyloider Strukturen durch Kongorotbindung und Polarisationsmikroskopie

Die Bindung von Kongorot ist eines der Kriterien zur Definition einer Amyloidose. In der Pathologie gilt die Kongorotfärbung und nachfolgende Polarisationsmikroskopie histologischer Schnitte und Biopsien bis heute als „Goldstandard“ zur Diagnose einer Amyloidose (Sipe und Cohen, 2000). Man nimmt an, dass der Farbstoff über geringe Distanzen durch nicht-ionische Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen mit der Amyloid-Fibrille wechselwirkt. Die Stärke der Wechselwirkung ist wahrscheinlich abhängig von der Proteinkonformation und dem Anteil an

β -Faltblättern (Klunk *et al.*, 1989). Amyloid-Fibrillen zeigen nach Färbung mit Kongorot im Polarisationsmikroskop dann die charakteristische apfelgrüne Polarisationsfarbe.

Die Intensität des doppelgebrochenen Lichtes ist abhängig von der Schichtdicke des betrachteten Objekts (Booth *et al.*, 1997), die bei histologischen Schnitten bei rund 5 bis 10 μm liegt. *In vitro* gebildete und *ex vivo* Amyloid-Fibrillen können zwar mit Kongorot gefärbt werden, zeigen aber trotz fibrillärer Struktur nur ein schwaches Doppelbrechungssignal im Polarisationsmikroskop. Um die Intensität des durch den Doppelbrechungseffekt hervorgerufenen Lichtsignals bei isoliert vorliegenden *in vivo* und *ex vivo* Amyloid-Fibrillen zu verstärken, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Präparationstechniken, eine sogenannte Tröpfchen- und die Deckglasmethode nach Scherziger *et al.* (1997), angewandt.

Bei der Tröpfchenmethode wurden 4 μl Probenlösung (Konzentration 1 mg/ml) direkt auf dem Objektträger aufgetropft und trocknen gelassen. Bei der Deckglasmethode wurde ein 8 bis 10 μl großer Probentropfen auf den Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas überschichtet. Dabei bildet sich ein dünner Flüssigkeitsfilm, der über Nacht trocknen gelassen wurde. Beide Methoden zeigen leicht unterschiedliche Resultate in der Formation der *ex vivo* Amyloid-Fibrillen zu mikroskopisch sichtbaren Aggregaten. Durch Kapillarkräfte bei der Verdunstung lagern sich bei der Tröpfchenmethode die Fibrillen zu Komplexen am Rand des Tröpfchens an. Bei der Deckglasmethode bilden sich meist geordnete größere Strukturen. Dies ist wahrscheinlich abhängig von der Länge der Fibrillen und deren Homogenisierungsgrad in der Lösung. So konnte bei gut gelösten Proben (Abb. 3.1 J, PHF) nur durch die Tröpfchenmethode ausreichend Material akkumuliert werden, um die charakteristische grüne Polarisationsfarbe zu detektieren.

Beide Methoden wurden auf alle *ex vivo* Fibrillenproben angewandt. Dazu wurden die lyophilisierten Proben in einer Konzentration von rund 1 mg/ml in H_2O dest. resuspendiert und durch vortexen gelöst. In Abbildung 3.1 A1 lässt sich ein kongorotgefärbtes Amyloidaggregat im Phasenkontrast erkennen. Abbildung 3.1 A2 zeigt dasselbe Aggregat unter gekreuzten Polarisationsfiltern mit der für Amyloid-Fibrillen typischen grünen Polarisationsfarbe. Anhand des Doppelbrechungseffekts und der gerichteten Ablenkung des polarisierten Licht lässt sich in diesen Aggregaten ein geordnetes Grundmuster aus einzelnen, aneinandergelagerten Amyloid-Fibrillen vermuten. Dies wird in Abbildung 3.1. B1 und 3.1. B2 anhand von synthetischen Insulinfibrillen demonstriert. Abhängig vom Winkel des polarisierten Lichts zeigen unterschiedliche Teile im Aggregat die auf gerichtete Strukturen zurückzuführende Doppelbrechung, deren Ausrichtung durch Drehung des Polarisators visualisiert werden kann.

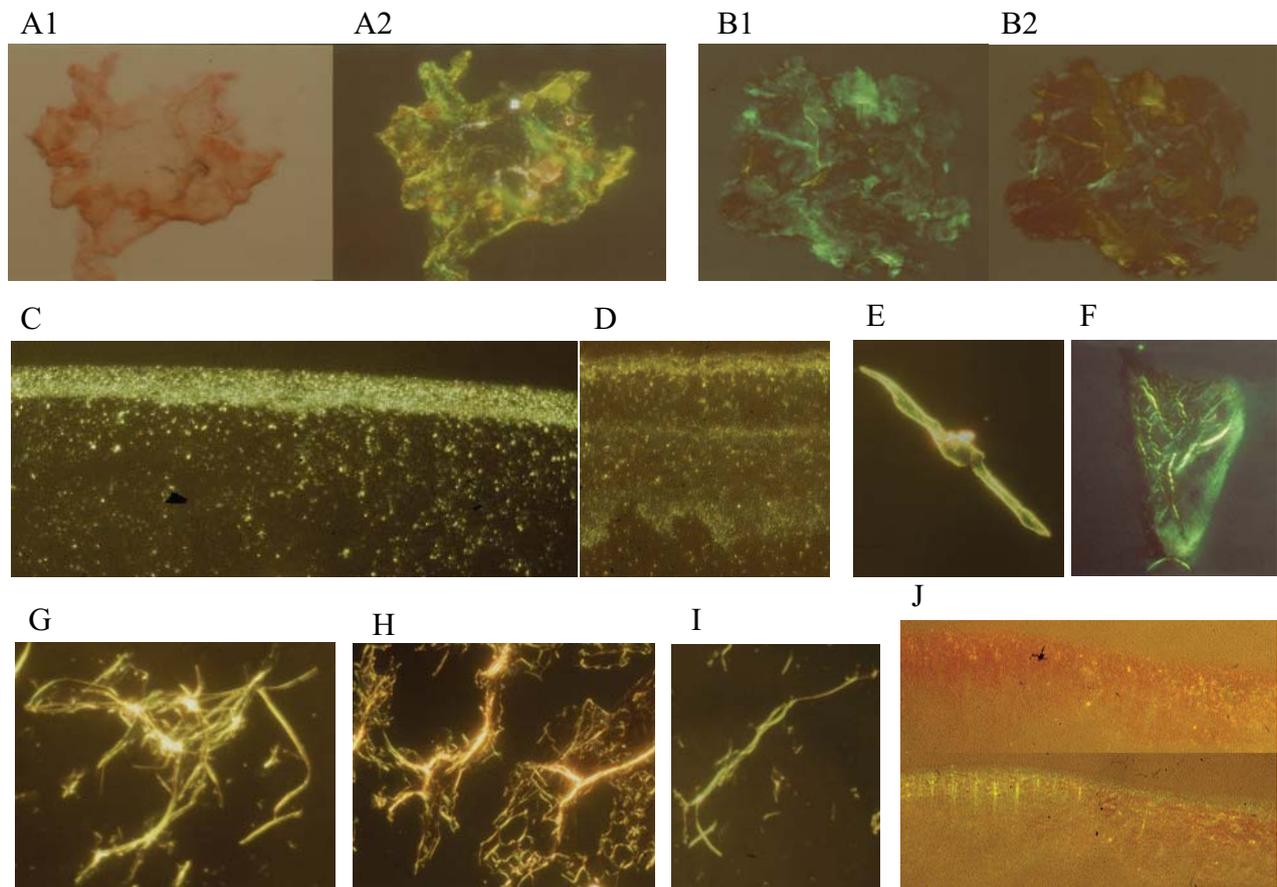


Abb. 3.1: Kongorotfärbung von Amyloid-Fibrillen.

A: Kongorotfärbung L3 ($A\lambda$) (400x) Deckglaspräparat: A1: Phasenkontrast und A2 Polarisationsmikroskopie. **B:** Polarisationsmikroskopie: synthetische Insulinfibrillen (420 x); B1: Gekreuzte Polare 88° und B2: 90° Ablenkung. **C:** Polarisationsmikroskopie Tröpfchenpräparat: L6 (ATTR(v)) (200 x). **D:** Polarisationsmikroskopie Tröpfchenpräparat: P13 ($A\lambda$) (500 x). **E:** Polarisationsmikroskopie Deckglaspräparat: P2 (AA) (420 x). **F:** Polarisationsmikroskopie Tröpfchenpräparat: P7 (AA) großes Aggregat (250x). **G:** Polarisationsmikroskopie Deckglaspräparat: L13 ($A\lambda$) (250x). **H:** Polarisationsmikroskopie Deckglaspräparat: P15 (ATTR) (200 x). **I:** Polarisationsmikroskopie Deckglaspräparat: L 14 ($A\lambda\kappa$) (500 x). **J:** Polarisationsmikroskopie Tröpfchenpräparat: PHF, oben: gekreuzte Polare 88° , unten: 90° (500 x).

Das Doppelbrechungssignal ist dabei abhängig von der Ausrichtung und Lage der durch Verdunstungseffekte aneinander gelagerten Fasern. Abbildung 3.1 C - D und J zeigen typische Bilder von Tröpfchenpräparationen, wie sie beim Austrocknen entstehen. In Abbildung 3.1 E, G - I sind durch die Deckglasmethode entstandene grössere Akkumulationen und faserige Strukturen gezeigt. Vermutlich lagern sich dabei die Fibrillen durch Scher- und Kapillarkräfte mit gleicher Ausrichtung zueinander an. Solche geordneten großen Strukturen können allerdings auch bei der Tröpfchenpräparation auftreten (Abb. 3.1 F).

Aus medizinischer Sicht ließen sich alle Amyloid-Proben anhand des Kongorottest und der grünen Polarisationsfarbe eindeutig als Amyloid diagnostizieren. Auch die intrazelluläre Ablagerung der hyperphosphorylierten „paired helical filaments“ sprach positiv auf diesen Test an. Tabelle 3.3 am Ende des Kapitels gibt eine Übersicht über die doppelbrechenden Eigenschaften der *ex vivo* Amyloid-Proben.

3.1.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den humanen *ex vivo* Amyloid-Fibrillen

Neben der Polarisationsmikroskopie gilt der elektronenmikroskopische Nachweis fibrillärer Strukturen als Indiz für eine Amyloidose. Amyloid-Fibrillen, die aus vielen monomeren Untereinheiten bestehen, können eine räumliche Ausdehnung erreichen, die im Auflösungs-bereich von Elektronen- und Rasterkraftmikroskopen liegt.

Tabelle 3.1 Dimensionen von Amyloid-Fibrillen.

Fibrillenprotein	„Fibrille“ [Breite in nm]	Literatur
A β (1-28) [#]	6-8	(1)
A β (1-42) [#]	7-10	(3)
Apolipoprotein A1	10	(4)
α -Synuclein*	8-12	(2, 3)
β 2-microglobulin	10	(5)
Calcitonin	> 8	(6)
IAPP	5.2 -6.8	(3)
Gelsolin	18-23	(3)
Immunoglobulin	6-8	(7)
Lysozyme	9	(4)
Medin	7	(8)
Prionprotein	6-20	(9)
SAA (1-11)	10	(4)
Transthyretin	13	(11)
Transthyretin (10-19)	9	(4)
Tau*	8 – 20	(12)

Die Referenz steht in Klammern und ist rechts erläutert. * α -synuclein und Tau sind nach den Vorschlägen des 'International Nomenclature Committee on Amyloidosis' 2000 in Budapest noch nicht als Amyloid-Proteine aufgenommen. [#] *In vitro* erzeugte Fibrillen.

Ex vivo Fibrillen werden bei der „Wasseraufreinigungsmethode nach Pras“ für die Extraktion aus Geweben einer Reihe von Ultrahomogenisierungsschritten ausgesetzt, was zu einer Beeinträchtigung des morphologischen Erscheinungsbildes gegenüber der in Geweben abgelagerten natürlichen Form der Fibrillen führen kann. Zusätzlich ist zu befürchten, dass die längliche Struktur der Fibrillen durch die Lyophilisation in Mitleidenschaft gezogen wurde.

Die erhaltenen *ex vivo* Amyloid-Proben mussten für elektronenmikroskopische Aufnahmen vollständig gelöst werden, um sie auf den EM-Grid zu blotten und mit Uranylacetat färben zu können. Um das fibrilläre Material wieder zu dispersieren, wurden die lyophilisierten Proben dazu in H₂O dest. aufgenommen. H₂O gilt als besonders gutes Lösungsmittel für Amyloidfasern (Pras *et al.*, 1969). Trotzdem mussten einige der wasseraufgereinigten Amyloid-Proben in einigen Fällen über 1 Std. gevortext und teilweise noch mit Ultraschall behandelt werden. Es wurde dabei versucht, einen Kompromiss zwischen Dispersion der Aggregate und Beeinträchtigung der morphologischen Struktur einzugehen.

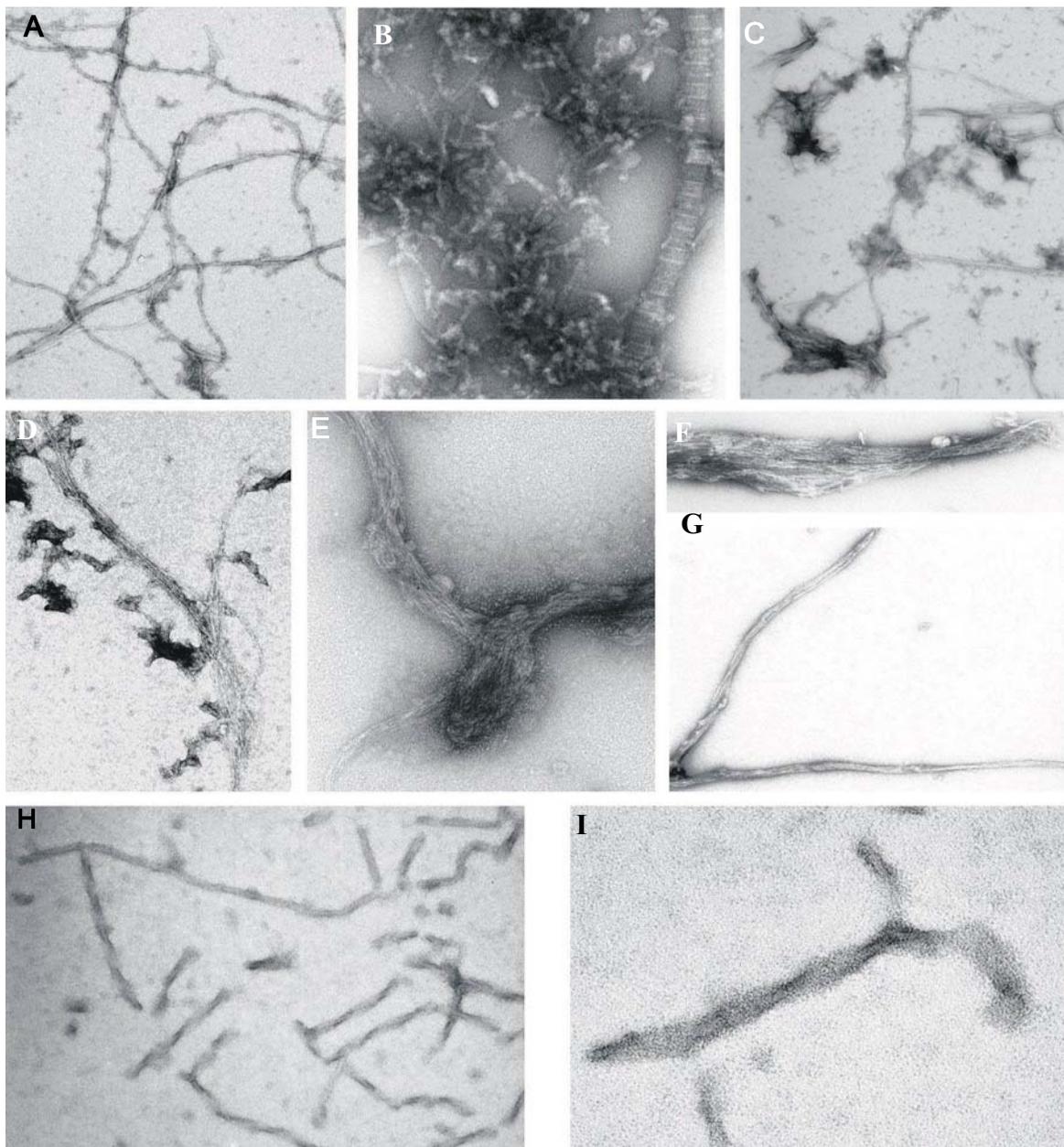


Abb. 3.2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *ex vivo* Amyloid-Fibrillen.

Ex vivo Aggregate wurden in H₂O dest. gelöst, mittels eines schwimmenden Kohlenstofffilms präpariert und mit 2 % Uranylacetat gefärbt. **A:** Synthetische Insulinfibrillen (28.000 x) zu erkennen sind typische Amyloid-Fibrillen mit ihrem Twist um die eigene Achse; **B:** L1 (AA) (46.000 x) kurze Amyloid-Fibrillen, rechts im Bild eine Kollagenfaser; **C:** L14 (Aλκ) (28.000 x). **D:** P13 (Aλ) (28.000 x) neben kurzen Fibrillen sind auch miteinander verflochtene Fibrillen zu erkennen. **E:** P6 (AA) (28.000 x) dichter Haufen umeinandergewundener, nicht dissoziierter Fibrillen. Daneben runde Strukturen die schon von Pras beschrieben wurden (Pras *et al.*, 1969). **F:** P6 (AA) (60.000 x). **G:** P1 (AA) (36.000 x) umeinandergewundene Fibrillenbündel. **H:** „paired helical filaments“ (PHF) (85.000 x) zu erkennen ist die typische Drehung umeinander gewundener Fibrillen. **I:** PHF (140.000 x)

In einigen Fällen konnte auch nach der Anwendung der Dispersionsmethoden, die eine Zerstörung der Ultrastruktur zur Folge haben können, vereinzelt noch größere sich in den Probenröhrchen absetzende Proteinklumpen beobachtet werden.

In Abb. 3.2 E - G sind akkumulierte Strukturen zu erkennen, die aus mehreren Fibrillen bestehen. Dieser Effekt der Aggregatbildung und Fällung ist in der Literatur in Anwesenheit von

NaCl beschrieben (Pras *et al.*, 1968). NaCl war nach der Gewebeextraktion durch die Wasseraufreinigungsmethode nicht mehr vorhanden. Es ist daher wahrscheinlich, dass sich die fibrillären Komponenten in den Proben bei der Lyophilisation und nach jahrelanger Lagerung nicht mehr vollständig lösen ließen. In Abb. 3.2 A sind neben den wasseraufgereinigten *ex vivo* Fibrillen zum Vergleich *in vitro* erzeugte Insulinfibrillen sowie immunoaffinitätsgereinigte PHFs gezeigt (Abb. 3.2 H,I).

Die von Prof. Linke erhaltenen Proben zeigten durchschnittlich weniger große akkumulierte Aggregate als Proben von Prof. Pras. Dafür waren, wenn einzelne reife Fibrillen detektiert werden konnten, diese generell nur zwischen 40 bis 90 nm lang, wohingegen in einigen Proben von Pras längere Fibrillen zu erkennen waren (Abb. 3.2 D-G). Aufgrund der Problematik der Unlöslichkeit konnten nicht in allen Proben Amyloid-Fibrillen detektiert werden. Dahingegen ließen sich in den immunoaffinitätsaufgereinigten PHF Fibrillen gut erhaltener Morphologie erkennen (Abb. 3.2 H, I).

Durch die Polarisationsmikroskopie konnten die erhaltenen Proben als Amyloid klassifiziert werden. Bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigte sich dagegen ein heterogenes Muster, bei dem teilweise keine morphologisch eindeutigen Fibrillen erkennbar waren. Dies ist bedingt durch die schwere Löslichkeit der lyophilisierten und wasseraufgereinigten Proben, wodurch einige der Proben für die angewandten elektronenmikroskopischen Techniken nicht ausreichend zugänglich gemacht werden konnten.

3.1.4 Reinheitsgrad der *ex vivo* Fibrillen

Amyloid-Fibrillen setzen sich aus einem proteinösen Kern und einem Mantel, der aus mehreren verschiedenen chemischen Substanzen besteht, zusammen. Dazu gehören: Serum Amyloid P-Komponente (SAP), Proteoglycane, Laminin, Kollagen, Apolipoprotein E und auch Lipide. Bei der „Wasseraufreinigungsmethode nach Pras“ werden die einzelnen Amyloid-Fibrillen in Wasser gelöst und dabei voneinander getrennt, jedoch bleiben Kern und Mantel der Fibrillen größtenteils intakt (Pras *et al.*, 1969).

Von den kooperierenden Wissenschaftlern konnten nur wenig mehr Informationen über die in Publikationen vorliegenden zu Häufigkeit der Waschritte bei der Aufreinigung sowie die molekularen Proteinbestandteile des erhaltenen amyloiden Materials erhalten werden. Neben den bekannten Proteinkomponenten wurde erwartet, dass bei einigen zur Charakterisierung des pathogenen Proteins aufgereinigten Fibrillen eventuell weitere Gewebebestandteile zu nachzuweisen seien.

Tabelle 3.2: Größe des Vorläuferproteins und Fibrillenproteins der Proben.

Vorläuferprotein	Fibrillenprotein
β2-Mikroglobulin (B2MG) 99 AA	β2-Mikroglobulin 99 AA (intakt)
Immunglobuline (λ, κ, γ)	Fragment 34-70 37 AA (integral)
Serum-Amyloid A (SAA) 104 AA	Fragment 19-94 76 AA (N-terminal)
Tau-Protein (TAU) 757 AA	Tau-Protein 757 AA, hyper-phosphoryliert
Transthyretin (TTHY) 127 AA	Voll-Länge oder Fragmente über 50 Varianten

Angegeben ist die Zahl der Aminosäuren des Vorläuferproteins und die am häufigsten vorkommende Variante des Fibrillenproteins. Für Immunglobuline und Serum-Amyloid A sind neben den angegebenen Werten noch andere Fragmentlängen beschrieben.

Mit Protein-Gelelektrophorese können Proteine im Größenbereich von 2 bis 500 kDa aufgetrennt werden. Hier wurden standardmäßig 15%ige Lämmli-Gele eingesetzt. Mit anschließenden sensitiven Färbungsverfahren, wie der Silberfärbung, lassen sich einzelne Proteine bis zu 1 ng detektieren (Rehm, 1997). Die Proben ließen sich im gebräuchlichen Auftragspuffer pH 7,4 nur ungenügend denaturieren, um die ausgetrockneten und lange gelagerten, großen Aggregate in das Gel eintreten zu lassen. Deswegen wurde ein spezieller Auftragspuffer mit einem basischen pH (pH 10), verringerter SDS- und leicht erhöhter Mercaptoethanol-Konzentration verwendet. Die Proben wurden in diesem Puffer vor Beladung des Gels bei 105°C für 15 Min. gekocht. Mit dieser Methode gelang es, die meisten der schwer löslichen Proteinaggregate zu denaturieren und sie der Protein-Gelelektrophorese zugänglich zu machen. Abb. 3.3 gibt einen Überblick über die der Gelelektrophorese zugänglichen *ex vivo* Amyloid-Proben.

Für alle analysierten Proben konnten Banden im niedermolekularem Bereich detektiert werden. Humanes AA-Protein hat ein Molekulargewicht von 8,5 kDa. Die Bande des AA-Proteins bei 6 kDa repräsentiert eine kleinere Untereinheit des AA-Proteins (Gal *et al.*, 1995; Pras *et al.*, 1980) (Abb. 3.3 L1, L9, P1-3). Die zweite Bande bei den weiteren AA-Proteinproben (Abb. 3.3 P4, P6, P7) wird als ein Fragment des AA-Proteins mit leichten Variationen in der Aminosäurekette beschrieben (Gal *et al.*, 1995). Probe P6 konnte aufgrund einer Formalinresistenz der AA-Fibrillen aus formalineingebettetem Gewebe extrahiert werden (Shtrasburg *et al.*, 1982). Dabei ist die Bande bei 7,5 kDa als AA beschrieben, wohingegen das 12 kDa Proteinfragment als Fibrillenkomponente ohne weitere Deklaration bezeichnet wird.

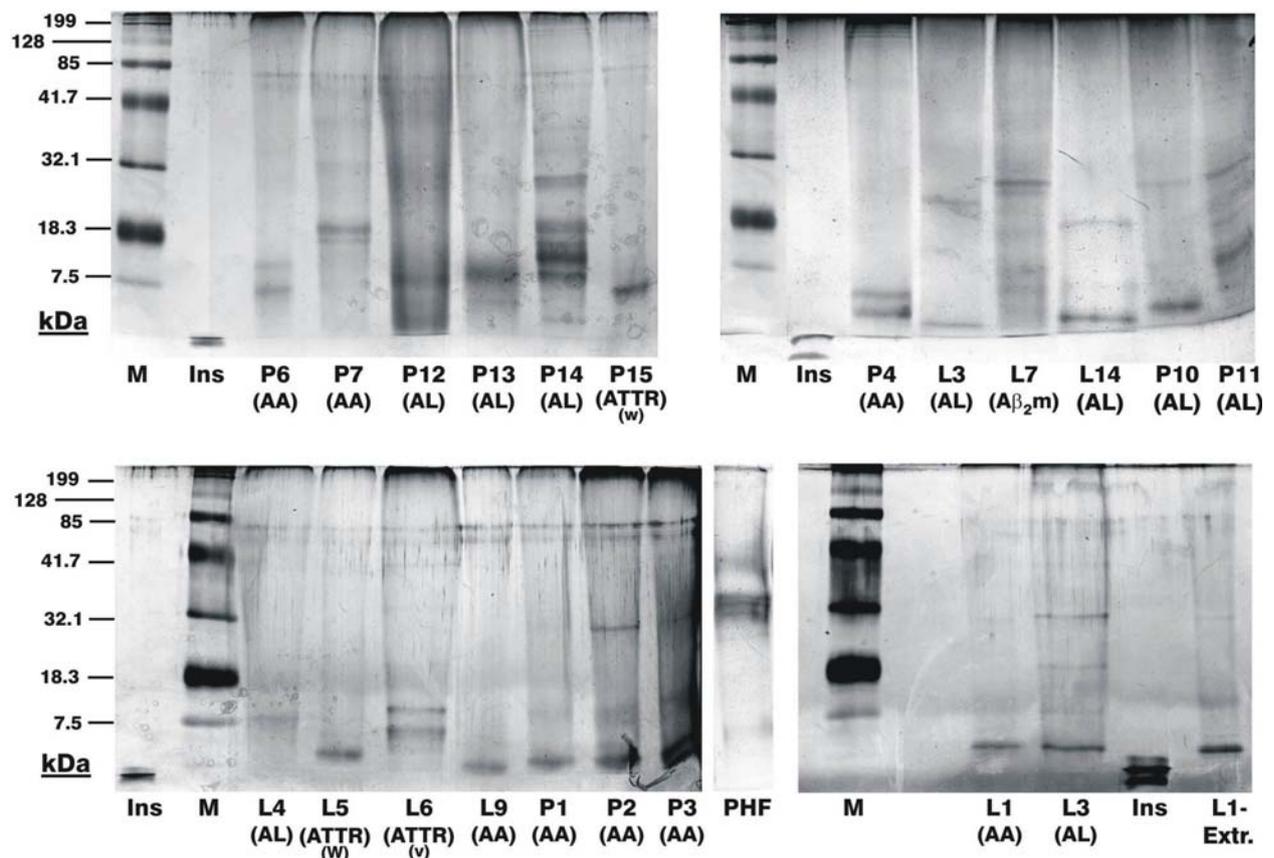


Abb. 3.3: 15 % Gelelektrophorese von *ex vivo* Amyloid-Proben mit Silberfärbung.

M: Kaleidoskop Marker (Biorad, München): 199 kDa: Myosin; 128 kDa: β -Galactosidase; 85 kDa: Bovine serum albumine; 41,7 kDa: Carbonic anhydrase; 32,1 kDa: Soybean trypsin inhibitor; 18,3 kDa: Lysozym; 7,5 kDa: Aprotinin. Die Massen der Proteine ist auf der jeweils linken Seite in kilo Dalton angegeben. Unter den Laufspuren sind die in der Arbeit verwendeten Bezeichnungen für die *ex vivo* Aggregate angegeben. **L1, L9, P1 – 4, P6, P7:** AA-Amyloidose. **L3, L4, L14, P10 – 14:** AL-Amyloidosen. **L5, P15:** ATTR (Wildtyp). **L6:** ATTR (Variant). **L7:** A β 2m. **Ins:** synthetische Insulinfibrillen, Monomer und Aggregat. **PHF:** „paired helical filaments“, hyperphosphorierte Formen. **L1 Extr.:** L1 (AA) nach Lipidextraktion.

Für Immunglobulin Leicht-Ketten-Amyloidosen ist ein heterogenes Bandenmuster im niedermolekularen Bereich zu erkennen. Dies ist bedingt durch die unterschiedlichen Aminosäuremuster der Polypeptidketten bei Leicht-Ketten-Proteinen (Abb. L3, L4, L14, P10 - 14) (Bellotti *et al.*, 2000). Zudem liegen in dem von Prof. Linke beschriebenen Fall der Probe L14 eine Amyloidose, bestehend aus zwei Immunglobulin Leicht-Ketten, der λ - und κ -Kette, vor. Dies ist auch bei Probe P14 der Fall, bei der mehrere Ketten zu detektieren sind.

Die Transthyretinbande in Probe P15 (Abb. 3.3 P15, Transthyretin Wildtyp) bei 8,5 kDa wird von Pras als ein Fragment mit den Aminosäurepositionen 49 bis 127 beschrieben (Pras *et al.*, 1983). Die Bande in Probe L5 (Abb. 3.3 L5, Thransthyretin Wildtyp) entspricht einem Wildtyp-Transthyretinfragment mit den Positionen 1 bis 49 (Linke *et al.*, 1988). Bei der Probe L6 - einer Transthyretinvariante - sind zwei Transthyretinfragmente zu sehen, wie sie für heterofamiliäre Amyloidosen beschrieben wurden (Pras *et al.*, 1981).

Die wasseraufgereinigten Proben der Serumsproteine zeigen im Hintergrund Schlieren, die sich über die ganze Spur des Gels hinwegziehen. Dies lässt sich durch eine ungenügende Denaturation der Proben im Auftragspuffer erklären, wodurch sich Aggregate unterschiedlichen Molekulargewichts aus den Fibrillen bilden können. Die ungenügende Denaturation ließ sich auch in den Auftragstaschen der Gele beobachten, in denen sich undenaturiertes Probenmaterial ansammelte (nicht gezeigt). Darüber hinaus zeigen die Proben L7, P10, P11 und P12 größere Verunreinigungen durch mehrere Banden im niedermolekularen Bereich. Die in vielen Proben zu detektierende Bande bei 24,5 kDa entspricht dabei vermutlich der Amyloid P-Komponente (Thompson *et al.*, 2002).

Wie in Abbildung 3.2 gezeigt (L1 Extr.) hat eine Lipidextraktion keinen Einfluss auf das Proteinbandenmuster der extrahierten Fibrillenproteine.

Die von Prof. Davies immunoaffinitätsaufgereinigten PHFs zeigen sehr saubere Bandenmuster (Abb. 3.3 PHF). Die dreifache Bande bei 34 kDa ist durch verschiedenefache Phosphorylierung und Splicevarianten der PHFs bedingt (Goedert, 1996). Es zeigt sich weniger Hintergrundsignal im Vergleich zu den wasseraufgereinigten und lyophilisierten Proben, da die PHF in gelöstem Zustand vorlagen und sich gut für die Protein-Gelelektrophorese denaturieren ließen.

Insgesamt ließ sich die von den kooperierenden Wissenschaftlern beschriebene Protein-komponente auch nach mehreren Jahren Lagerung noch in reiner und intakter Form nachweisen.

3.1.5 Proteinquantifizierung der *ex vivo* Fibrillen

Friedreich und Kekulé hatten (1859) gezeigt, dass die Amyloidablagerungen, wie sie von Virchow (1854) beschrieben wurden, hauptsächlich aus Polypeptiden bestehen. Trotz dessen wurde lange debattiert, ob die 3-dimensionale Struktur der Fibrillen, die man mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen im Gewebe sehen kann, ausschließlich proteinös ist, oder ob sie sich aus Protein und Nebenkomponenten zusammensetzt. Mittlerweile gilt es als anerkannt, dass Amyloid-Fibrillen nicht nur aus Protein bestehen, sondern noch weitere chemische Bestandteile wie Kohlenhydrate, Lipide, Calcium, Glycosaminoglycane (Kim *et al.*, 1967; Kisilevsky, 2000) mit ihnen assoziiert sind.

Um die *ex vivo* Amyloid-Fibrillen weiter zu charakterisieren, sollte der Proteingehalt der Proben analysiert werden. Für die Proteinquantifizierung wurden in dieser Arbeit zwei unabhängige Methoden, microBCA und Ninhydrintest, verwendet. Herausforderung für beide Methoden ist es dabei, im Mikrobereich lineare und quantitative Aussagen zu leisten. Des weiteren musste eine minimale Abweichung, bedingt durch unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung zwischen Standardprotein und unbekanntem Analyt, erreicht werden. Im besonderen Fall der sehr unlöslichen, großen Proteinaggregate der *ex vivo* Amyloid-Fibrillen, sollte zusätzlich eine

vollständige Denaturierung der Fibrillen in die monomeren Untereinheiten und eine Auflösung der Tertiärstruktur gewährleistet sein, damit das farbreaktionsauslösende Agens an alle Polypeptidketten-Bestandteile binden kann.

Für die Analysen wurden die lyophilisierten Proben mit einer geeichten Sartorius Research R200D Waage gewogen. Die Waage wurde vor jeder Wägung kalibriert. Sie wiegt mit einem statistischen Fehler von weniger als 3 % bis in einen Wägebereich von 10 mg. Bei Wägungen von 1 mg betrug der Fehler bis zu 15 %. Aufgrund der Limitierung an Probenmaterial mussten die Wägungen zur Proteinquantifizierung dennoch in diesem Mengbereich durchgeführt werden. Die Proben wurden mit H₂O dest. in einer Konzentration von 1 mg/ml aufgenommen und für die Messung im Konzentrationsbereich der Eichgeraden verdünnt.

Bei der "microBCA Methode" werden Proteine mittels einer Farbreaktion durch die "Biuretreaktion" quantifiziert, deren Intensität abhängig von der eingesetzten Menge an Protein ist (Lowry *et al.*, 1951). Das Prinzip beruht auf der Anlagerung von Cu²⁺ in alkalischem Milieu an die Peptidbindungen. Dieses System wird empfindlicher durch Kupferreduktion und Verwendung der komplexbildenden Bicinchoninsäure. Somit lassen sich auch kleinste Proteinmengen im 1 µg Bereich detektieren (Smith *et al.*, 1985). Ein Nachteil dabei ist, dass Proteine mit einem hohen Thyrosin- und Cysteinanteil eine stärkere Farbreaktion hervorrufen. Im Vergleich von unbekanntem Peptidsequenzen zum weitverbreitet eingesetzten "bovine serum albumin" (BSA) als Standard für die Eichgerade können in einzelnen Fällen unvermeidbare Maximalabweichungen von bis zu 15 % auftreten. Dies ist auch der Fehler der bei den Wägungen in 1 mg Bereich auftrat. Eine Denaturierung der Proteine und Zugang zu den Peptidbindungen wird durch Inkubation mit 0,1 M NaOH erreicht. Für die *ex vivo* Amyloid-Fibrillen wurden die Inkubationszeit mit NaOH und teilweise auch die Konzentration der NaOH erhöht.

Um bei der Proteinquantifizierung nicht nur auf die Aussagekraft einer Methode mit all ihren Limitierungen angewiesen zu sein, wurde eine weitere Methode zur Proteinquantifizierung durchgeführt. Die zweite Methode beruht auf dem Nachweis einzelner Aminosäuren hydrolysierter Polypeptide mittels Ninhydrinbindung und Reduzierung. Das Verfahren umgeht dabei von vorn herein das Problem der Zugänglichkeit des farbreaktionsauslösenden Agens bei großen Proteinfibrillen. Dazu wurden Proben und Proteinstandards für 24 Std. bei 110°C in 6 N HCL einer sauren Hydrolyse unterzogen. Die Ninhydrinbindung und Reduzierung ist von Volumenschwankungen unabhängig, was eine Entwicklung bei 100°C über 10 Min. erlaubt. Die Intensität der Farbreaktion wurde an einzelnen Aminosäuren getestet. Unterschiedliche Aminosäuren zeigten dabei Unterschiede in der Intensität der Farbreaktion. Auch bei diesem Test kommt es zu Abweichungen beim Vergleich unbekannter Polypeptidsequenzen mit

Proteinstandards. Neben BSA als hydrolysiertem Proteinstandard wurde in dieser Arbeit deswegen ein Aminosäuregemisch aus 10 Aminosäuren verwendet. Diese wurden repräsentativ für alle 20 physiologisch relevanten Aminosäuren ausgewählt und in gleicher molarer Menge verwendet. Dadurch ergab sich im Vergleich von BSA, Insulinfibrillen, Aminosäuregemisch und Lysozym eine quantitative Maximalabweichung von Probe zu Standard von unter 12 %.

3.1.6 Parallelisierung und Aussagekraft der Mikro-Proteinquantitätstest

Um bei der quantitativen Proteinanalyse Pipettierfehler und Fehler durch Solubilisierungsprobleme großer Fibrillenaggregate so gering wie möglich zu halten, wurden sowohl für die Eichgerade, als auch für die Analyten Mehrfachbestimmungen durchgeführt. Dazu wurden 96-Well Mikrotiterflachbodenplatten verwendet. Dies erlaubt eine parallele Mikroanalyse mit maximal eingesetzten Probenmengen von 125 μ l. Die Absorptionsmessung erfolgte automatisiert mit einem Mikrotiterplattenreader (Spectramax 250, MWG-Biotech, Ebersberg), mit dem sich parallelisierte Absorptionsmessung innerhalb weniger Minuten durchführen lassen. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse lag beim microBCA-Test mit maximalen Abweichungen von 12,5 % Reproduzierbarkeit (in zwei unabhängigen Experimenten gemessenen Proben) und durchschnittlicher Abweichung von 6 % deutlich unter der des Ninhydrintestes mit einer maximalen Abweichung der Reproduzierbarkeit von 18 % und einem durchschnittlichem Fehler von 13 %, gemessen an synthetischen Insulinfibrillen in einem Mengenbereich von 2 bis 10 μ g Gesamtprotein pro Messung. Die Ungenauigkeiten des Ninhydrintests kommen durch mehrmaliges Umpipettieren der Proben bei der sauren Hydrolyse zustande. Beide Tests ergaben für synthetische Insulinfibrillen und *ex vivo* Fibrillen vergleichbare Resultate.

Da die *ex vivo* Aggregate nicht ausreichend homogenisiert werden konnten, um beim Pipetieren eine hundertprozentige gleichmäßige Verteilung zu erhalten, konnten bei parallelen Mehrfachbestimmungen Abweichungen von bis zu 25 % beobachtet werden. Beide Tests konnten aufgrund der Limitation an vorhandenem Material mit den *ex vivo* Fibrillen nur 2mal durchgeführt werden. Die Werte zeigten eine gute Übereinstimmung (maximale Abweichung 25 %, durchschnittliche Abweichung 8 %) und wurden für das Endergebnis gemittelt. Zieht man die geschilderten Fehlerquellen (Wägung, Pipettierfehler, homogene Verteilung großer Aggregate und die Limitation an Amyloidmaterial für eine Reproduktion der Ergebnisse) in Betracht, so ergibt sich ein Maximalfehler der erhaltenen Ergebnisse von bis zu 30 %. Die in Tabelle 3.3 dargestellten Proteinwerte in Prozent zur Einwaage sind deshalb mit diesem Fehler angegeben.

Tabelle 3.3: Übersicht über die Proteinkomponente der *ex vivo* Amyloide

Linke (15 Proben)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15
Amyloidtyp	AA	A λ	A λ II	A λ K	ATTR (w)	ATTR (v)	A β 2m	A λ	AA	A λ	A λ	A λ	A λ K	A λ K	A λ
Grüne Polarisationsfarbe	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++	++	++	++	++	++
Fibrilläre Struktur Elektronenm.	+/Z	n. d.	+/Z	n. d.	+/Z	+/Z	n. d.	n. d.	n. d.	0/L	+/L	n. d.	+/Z	+/L	0/Z
Proteingehalt % zur Einwaage	65%	72%	60%	65%	53%	91%	58%	98%	61%	61%	57%	56%	50%	59%	59%
Pras (15 Proben)	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15
Amyloidtyp	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	ATTR (v)	A λ	A λ	A λ	A λ	A λ -K	ATTR (v)
Grüne Polarisationsfarbe	+	++	++	0+	++	++	++	++	+	++	+	++	++	++	++
Fibrilläre Struktur Elektronenm.	+/L	+/L	+/Z	0/L	n. d.	+/L	n. d.	+/L	n. d.	0/L	+/L	n. d.	+/L	n. d.	0/Z
Proteingehalt % zur Einwaage	55%	80%	55%	63%	71%	90%	70%	52%	56%	63%	74%	89%	99%	92%	90%

Grüne Polarisationsfarbe: ++ = stark grün doppelbrechend, + = grün doppelbrechend. Fibrilläre Struktur im elektronenmikroskopischen Bild: n. d.: nicht detektiert. +/L= längliche Fibrillen in kleinen Zusammenschlüssen guter Struktur, 0/L = längliche Fibrillen in großen Präzipitaten, +/Z = kurze Fibrillen, 0/Z = heterogenes Muster kurzer Fibrillen. Der Proteingehalt ist in % zur Einwaage mit einem maximalen Fehler von 30 % angegeben (siehe Text).

3.1.7 Zusammenfassung der Charakterisierung der Proteinkomponente

Alle *ex vivo* Amyloid-Proben konnten nach medizinischen Maßstäben, Kongorotbindung und grüne Polarisationsfarbe, als Amyloid charakterisiert werden. Bedingt durch die schwere Löslichkeit der wasseraufgereinigten und lyophilisierten *ex vivo* Amyloid-Proben konnte nicht von allen Proben ein elektronenmikroskopischer Nachweis fibrillärer Amyloidfasern erbracht werden. Die in Natriumphosphatpuffer versandten immunoaffinitätsgereinigten PHF zeigten dahingegen eindeutige Fibrillen-Morphologie.

Das Fibrillenprotein der pathologischen *ex vivo* Amyloid-Fibrillen ließ sich in allen für die Gelelektrophorese zugänglichen Proben detektieren und schien größtenteils wenig Kontaminationen mit anderen nicht amyloiden Gewebebestandteilen aufzuweisen. Durch Proteinquantifizierung konnte in allen Proben ein Proteinbestandteil von mindestens 50 % gefunden werden. Es zeigte sich dabei, dass neben Proteinen auch weitere Komponenten mit den aufgereinigten und als Amyloid charakterisierten *ex vivo* Fibrillen assoziiert vorliegen. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass mit den wasser- und immunoaffinitätsgereinigten *ex vivo* Amyloid-Proben die Hauptbestandteile der amyloiden Ablagerungen aufgereinigt vorlagen und für weitere Analysen zugänglich waren.

3.2 Methodenentwicklung zur qualitativen und quantitativen Lipidanalytik

3.2.1 Handhabung kleiner Lipidmengen

Beim Umgang mit kleinen Lipidmengen müssen Verluste und Kontaminationen vermieden werden. Ein Großteil der Verluste erfolgt durch unspezifische Adsorption an die Gefäßoberfläche. Hydrophobe Oberflächen, wie die von Polymergefäßen, adsorbieren Lipide besser als hydrophile Glasoberflächen. Zur Handhabung von Lipiden wurden Glasgefäße unterschiedlicher Volumina mit Teflon-Crimpkappen verwendet. Diese lassen sich mit Spritzenadeln durchstoßen und gewährleisten nach Entfernung der Nadel eine genügend große Abdichtung an der Injektionsstelle, um flüchtige organische Lösungsmittel zurückzuhalten. Für Zentrifugationen wurden konische Zentrifugenröhrchen aus Glas mit passenden Teflonstopfen (beides Werkstattanfertigung des IMB) verwendet. Da die Polymer-Pipettenspitzen Verunreinigungen abgaben, wurden sie durch genau dosierbare Hamilton-Glasspritzen ersetzt. Weiterhin reduzierten hohe Lipidkonzentrationen, d. h. kleine Lösungsmittelvolumina, die Verluste durch Adsorption. Zusätzlich wurden alle benutzten Glasgefäße 3 bis 4 mal nachextrahiert.

Lipide haben die Eigenschaft, sich aneinander zu lagern und Aggregate zu bilden. Da sowohl die polaren Kopfgruppen als auch die unpolaren Fettsäuren interagieren können, muss das Lösungsmittel in der Lage sein, beide Funktionen abzuschirmen. Deshalb ist es sinnvoll, ein Lösungsmittelgemisch bestehend aus einer polaren und einer unpolaren Komponente zu benutzen. 1-Propanol/1,2-Dichlorpropan im Verhältnis 1:2 wurde als neues Lösemittelsystem zur Lagerung von Lipiden verwendet (Raskatow, in verb.). Es hat die Eigenschaft, dass es bei -20°C nur minimalen Dampfdruck hat. Dadurch ist eine stabilere Langzeitlagerung von Lipidklassen unter Vermeidung von Voluminaschwankungen im Vergleich zu herkömmlichen organischen Lösungsmittelgemischen für Lipide möglich. Um Oxidation der sehr empfindlichen Lipide durch Glasoberflächen oder Luftsauerstoff zu vermeiden, wurden alle Lipide in 2:1 1,2-Dichlorpropan/1-Propanol unter Argon-Überschichtung gelagert und, soweit möglich, alle Arbeiten unter einer Argonatmosphäre ausgeführt.

3.2.2 Extraktion kleiner Lipidmengen

Als ersten Schritt zur Analyse müssen die Lipide vom im Überschuss vorhandenen Protein getrennt werden. Die wasseraufgereinigten Amyloid-Proben lagen als lyophilisiertes Material vor. Von ihnen konnten nicht-kovalent gebundene Lipide direkt extrahiert werden. Benutzt wurde dazu 2:1 Chloroform/Methanol (C/M). C/M verdampft schon bei Raumtemperatur und ist daher leicht wieder zu entfernen. In orientierenden Versuchen wurde die Extraktion dreimal

nacheinander an einem künstlichen Insulin-Amyloid-Lipid-Mix und der Probe L3 (AA), von der am meisten Ausgangsmaterial vorlag, durchgeführt. Die erste Extraktionsrunde (Solubilisierung der Probe und Abzentrifugation der Nicht-Lipidkomponente) ergab eine Ausbeute von mehr als 95 % Lipid. Die zweite Extraktion erhöhte die Ausbeute auf über 99 % und die dritte Extraktion zeigte keine feststellbare Änderung mehr.

Um schwerlösliche Amyloid-Proben zu solubilisieren und zur Entfernung wasserlöslicher Verunreinigungen wurde eine Lipidextraktion von gelösten Proben in H₂O nach der Methode von Bligh und Dyer, 1959 durchgeführt. Die Extraktion beruht auf einer schrittweisen Verteilung im ternären System Chloroform/Methanol/Wasser (oder C/M/KCl) (siehe nebenstehende

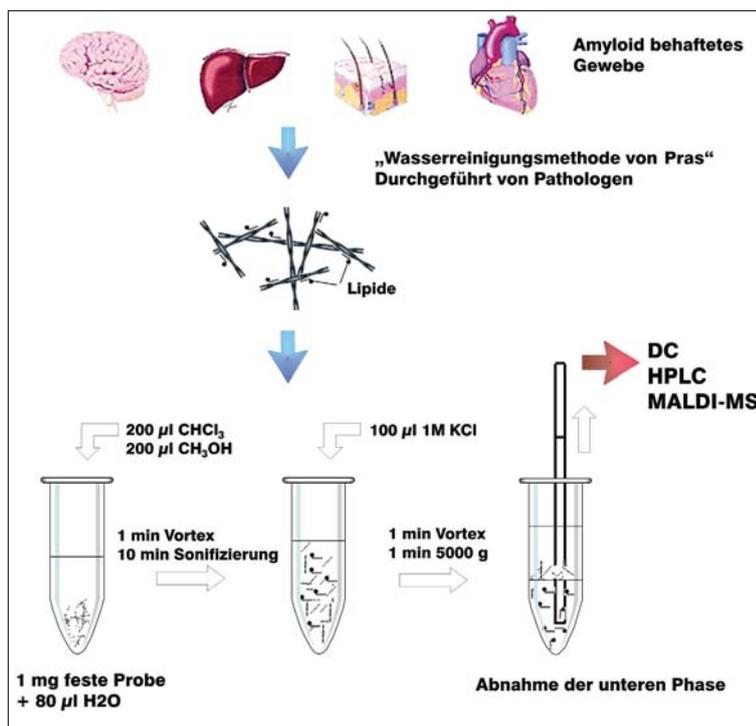


Abb. 3.4 Schema der Lipidextraktion von Amyloid-Fibrillen nach Bligh und Dyer.

Im letzten Schritt der Lipidextraktion werden die Phasen durch kurze Zentrifugation separiert und die untere Phase mit den Lipiden isoliert.

Teil durch Zentrifugation oder Inkubation bei 4°C über Nacht ausfällen. Trotzdem konnte eine leichte Kontamination der Lipidfraktionen mit anderen Bestandteilen der Amyloidprobe bei beiden Methoden nicht verhindert werden. Dies machte sich bei den quantitativen Bestimmungen des Gesamtlipidextraktes durch Wägung bemerkbar. Deswegen wurde der Gesamtlipidgehalt in Extrakten durch Summation der durch Dünnschichtchromatographie (DC) quantitativ bestimmten Lipidklassen ermittelt.

Abbildung). Unabhängige Versuche ergaben auch bei dieser Methode eine Effizienz von jeweils größer 95 % für die einmalige Extraktion. Durch den Wasserreinigungsschritt der zweiten Methode wurden keine Unterschiede im Ergebnis zur ersten Methode erreicht. Der Vorteil beruht dabei in einer besseren Löslichkeit der Amyloid-Proben. Es wurden bei beiden Methoden keine Zersetzungsprodukte detektiert.

Als problematisch stellte sich eine leichte Lösbarkeit nicht-lipider Komponenten der kristallinen und lyophilisierten Amyloid-Proben in Chloroform heraus. Die fibrillären Bestandteile ließen sich in Chloroform zum

3.2.3 Analyse kleiner Lipidmengen

Unterschiedliche Methoden zur Analyse polarer Lipide, wie sie in Zellmembranen von Säugetieren vorkommen, sind publiziert (Übersicht: McDonald und Mossoba, 1997; Hamilton, 1998). Chromatographische und massenspektrometrische Methoden liefern die besten Resultate und ergänzen sich in ihrer Aussage.

Hochauflösende Dünnschichtchromatographie (DC)

DC auf mit Kieselgel beschichteten Glasplatten trennt alle polaren Lipidklassen aus Geweben (Touchstone, 1995; Myher und Kuksis, 1995). Die beste publizierte Empfindlichkeit für eine Nachweis von Lipidklasse auf DC-Platten ist 10 ng (Klein *et al.*, 1998). Das Verfahren beruht auf dem Erwärmen mit $\text{CuSO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ auf 180°C (eingeführt von Bitman und Wood, 1982; modifiziert von Alvarez und Ludmir, 1993). Die Nachweisgrenze wird unter den chromatographischen Techniken nur durch eine mit Massenspektrometrie gekoppelte Hochdruckflüssigchromatographie übertroffen (0,5 ng je Lipidklasse; Olsson und Salem, 1997). Dem hohen instrumentellen Aufwand dieser HPLC-MS-Kopplung steht die einfache Methodik der DC gegenüber, die außerdem die gleichzeitige Analyse mehrerer Proben zulässt. Um quantitative Aussagen machen zu können, müssen mehrere Vergleichstandards unterschiedlicher Menge analysiert werden. Die DC konnte in dieser Arbeit so verbessert werden, dass eine gleichzeitige Analyse von bis zu 14 Proben und 8 Standardspuren reproduzierbar möglich war. Deswegen wurden alle quantitativen Lipid-Bestimmungen mit dieser Methode durchgeführt.

Als das beste Färbeverfahren für Lipidklassen auf Dünnschichtplatten erwies sich das Erhitzen der Platte nach Tauchung in 8 % $\text{CuSO}_4/10$ % H_3PO_4 für ca. 8 Minuten bei 170°C . Diese Methode produziert dunkelbraune bis schwarze Banden auf hellem Hintergrund, die durch Reflektionsdensitometrie auswertbar sind (Macala *et al.*, 1983). Die dem Färbeverfahren zugrunde liegenden thermisch induzierten chemischen Vorgänge sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird angenommen, dass bei hohen Temperaturen die H_3PO_4 das CuSO_4 zu $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ umsetzt, wobei H_2SO_4 frei wird. Die H_2SO_4 entzieht organischen Verbindungen Wasser unter Bildung von Kohlenstoff, der in Form dunkler Banden sichtbar wird. Das $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ wirkt wahrscheinlich als Abscheidungskeim und verstärkt die Farbtiefe. Bei der densitometrischen Auswertung existiert ein linearer Bereich, in welchem die Schwärzungsintensität direkt proportional der Lipidmenge ist. Zu kleine Lipidkonzentrationen rufen kein Signal mehr hervor, während bei zu großen Mengen die einzelnen Lipidbanden auf der Platte gesättigt vorliegen, und keine lineare Zunahme der Schwärzung mehr beobachtet werden kann.

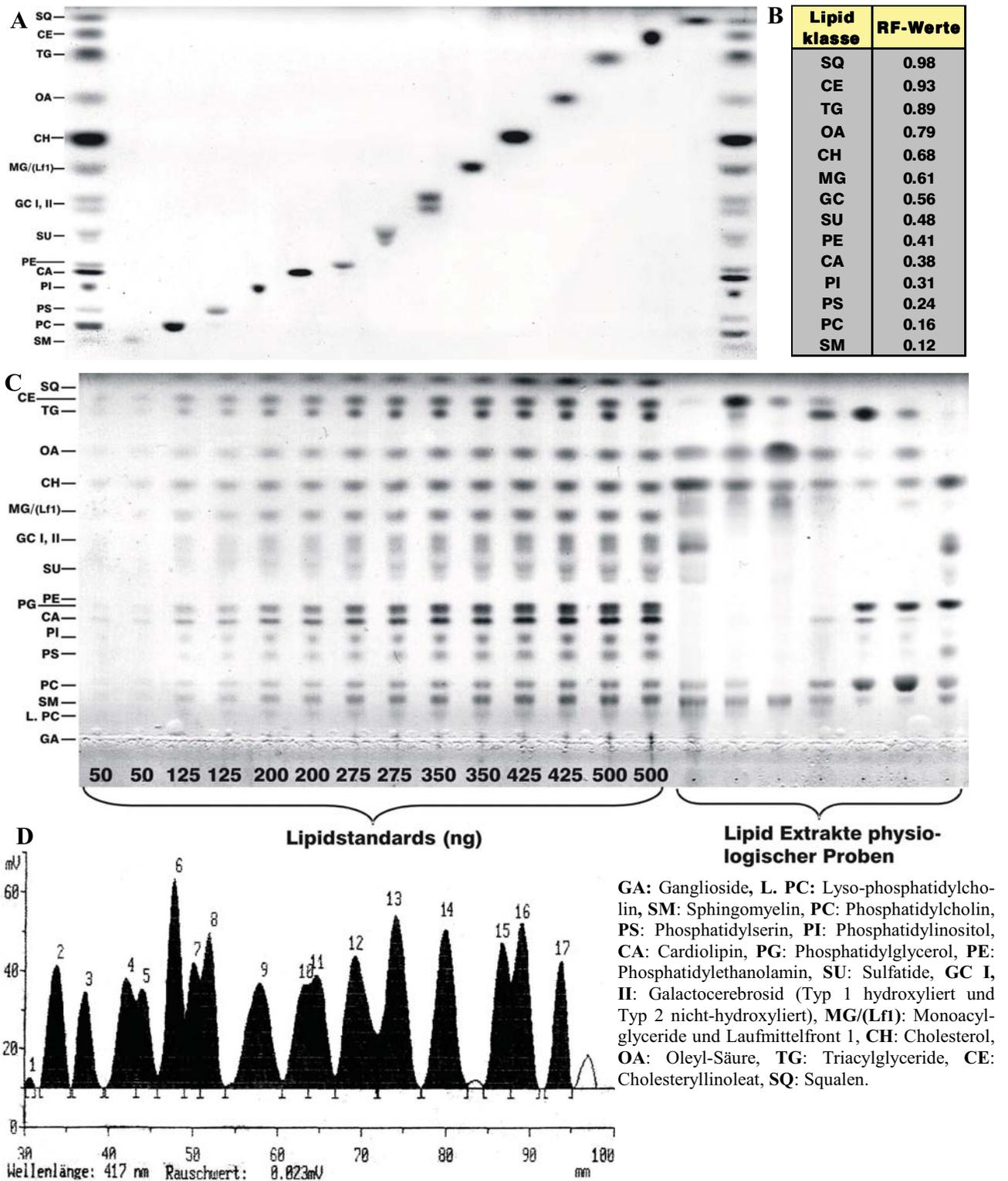


Abb. 3.5. Hochauflösende DC von Standards und physiologischen Lipidextrakten

Färbung mit $\text{CuSO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ für 8 Minuten bei 170°C . **A**: DC von physiologisch relevanten Lipidklassen: links und rechts Standardgemisch, in der Mitte einzelne Lipidklassen die unterschiedliche Retentionszeiten bei der DC erfahren. **B**: R_f -Werte bei der DC von polaren und unpolaren Lipidklassen. **C**: Quantitative DC mit 7 doppelt-gespotteten Lipidstandards (50 bis 500 ng) aus 17 Lipidklassen (links) und physiologischen Lipidextrakten (rechts). **D**: Densitometrischer Scan einer DC-Spur eines 500 ng Lipidstandards. Obwohl alle Lipidklassen in der gleichen Konzentration vorliegen, zeigt sich ein unterschiedlicher Farbkoeffizient einzelner Lipidklassen beim Veraschen. Dies äußert sich im Intensitätssignal beim densitometrischen Scan. Die Zahlen der Peaks entsprechen den gespotteten Lipidklassen. Zu berücksichtigen ist dabei, dass Ganglioside aufgrund ihres Laufverhaltens beim Übergang Trennzone zu Sammelzone densitometrisch nicht erfasst werden können. GC zeigt dafür einen Doppelpeak (Peak 10 und 11).

Die Sensitivität (dreifaches Hintergrundsignal) konnte von durchschnittlich 50 ng (Macala *et al.*, 1983) auf 30 ng pro Lipidklasse gesteigert werden. Es wurden Lipidstandardgemische aus verschiedenen Einzelkomponenten mit gleicher Konzentration gemischt. Hauptsächlich wurden Standards aus 15 oder 17 Lipidklassen verwendet, die das gesamte Lipidspektrum das in natürlichen Lipidextrakten aus Säuger-Geweben zu finden ist, repräsentieren. Nach Entwicklung und Färbung kann durch Zuordnung der Laufstrecke (R_f -Wert) einer Bande die Lipidklasse qualitativ (Abb. 3.5 A, B) und mittels Densitometrie auch quantitativ ausgewertet werden (Abb. 3.5 C, D). Die Laufstrecke ist bei einem bestimmten Laufmittelsystem und einer bestimmten Trennschicht für die jeweilige Lipidklasse konstant (Abb. 3.5 A, B). Die Intensität der Färbung ist von dem jeweiligen Lipid abhängig (Abb. 3.5 D). Beispielsweise färbt Cholesterol bei schon wesentlich kleinerer Auftragsmenge als andere Lipide (ab 10 ng). Sulfatide hingegen werden erst im Bereich 75 ng ausreichend angefärbt. Die Erklärung dafür liefert eine Betrachtung des Aufbaus der verschiedenen Lipidklassen. So bestehen Steroide aus einem kondensierten Kohlenwasserstoff-Ringsystem; sie besitzen nur wenige Heteroatome. Andere Lipidklassen enthalten noch zusätzlich Phosphor, Schwefel oder Stickstoff. Der Schwärzungsgrad ist aber umso höher, je größer der Kohlenwasserstoffanteil im Lipid ist. Abbildung 3.5 D zeigt einen densitometrischen DC-Plattenscan eines Lipidstandards (500 ng/Lipidklasse) bestehend aus 17 Lipidklassen.

Speziell angefertigte Hilfsmittel und Verfahrens-Verbesserungen

Im Rahmen unserer Arbeitsgruppe wurde eine Reihe von Verfahrensverbesserungen eingeführt, die es erlauben, die qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie reproduzierbar anzuwenden. Über das standardisierte Verfahren wurde eine Applikationsbroschüre geschrieben (Appel, 2002). Im Folgenden sind einzelne Verbesserungen aufgeführt.

Die Entwicklung in Vertikalkammern mit Filterpapierauskleidung stellte sich im Vergleich zu Horizontalkammern sowie Vertikalkammern ohne Filterpapierauskleidung als optimale Trennmethode heraus. Zur Standardisierung und genauen Applikation bestimmter Proben volumina wurden Hamilton-Spritzen mit nicht angeschragten Kanülen verwendet. Für eine bessere Trennung der polaren Lipidklassen, besonders schwer chromatographisch zu trennen sind Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol (Abidi, 1998), wurde eine verlängerte Entwicklung in Laufmittel 1 von 4,5 cm (Macala *et al.*, 1983; Yao und Rastetter, 1985) auf 4,8 cm eingeführt. Durch ein von der Werkstatt des IMB eigens angefertigtes Entwicklungsgestell konnten die Dünnschichtplatten während der Chromatographievorgänge sicher gehandhabt und leicht in die Laufmittel und Entwicklungslösungen transferiert werden. Eine ebenfalls selbst angefertigte Auftragschablone ermöglicht eine reproduzierbare Probenapplikation an definierte Stellen der DC-Platte und macht sie so der exakten densitometrischen Auswertung zugänglich.

Bei der densitometrischen Auswertung durch den DC-Scanner fallen große Datenmengen an. Zur Auswertung wurden selbstgeschriebene Excel-Tabellen verwendet, die über Verknüpfungen und einzelne programmierte Makros, eine automatisierte quantitative Auswertung nach exakten, analytischen Maßstab erlauben.

Micro-HPLC

Um polare Lipidgemische einer Untersuchung mittels MALDI-Massenspektrometrie zugänglich zu machen, empfiehlt sich eine vorherige präparative Trennung des Gemischs in einzelne Lipidklassen. Vor allem Phosphatidylcholin muss aus einem Lipidgemisch isoliert werden, da dieses Lipid bei der Ionisierungsreaktion der Massenspektrometrie die meiste Energie absorbiert und somit Signale anderer Lipidklassen unterdrückt (Petkovic *et al.*, 2001; Abb. 3.8).

Generell ist eine erfolgreiche Lipidklassentrennung nicht nur von der Probenmatrix, sondern auch von den chromatographischen Variablen, wie der mobilen Phase, stationären Phase und der Elutionsmethode, abhängig (Shibamoto, 1994). Bei der verwendeten Normalphasen-Chromatographie interagiert der Analyt mit der stationären Phase vordringlich über Adsorptionskräfte (Yandrasitz *et al.*, 1981). Der Grad der Lipidtrennung ist damit grundsätzlich abhängig von ihrem ionischen und polaren Charakter (Abidi, 1998). Mittels Gradientenelution wird meist ein besserer Trennungsgrad multipler Lipidgemische gegenüber isokratischen Systemen erreicht (Letter, 1992; Abidi, 1998).

Es gibt verschiedene Detektionssysteme für eluierte Substanzen: Lichtbrechungsdetektoren, online-gekoppelte Massenspektrometrie, Flammenionisierungsdetektoren und die in dieser Arbeit benutzten UV-spektrometrischen Detektoren. Der häufig verwendete UV-Detektor kann nur für mobile Phasen die frei von UV-Chromophoren sind eingesetzt werden. Heutzutage wird meistens ein Gemisch aus Hexan, Isopropanol und Wasser verwendet, da chloroformhaltige Phasen für die UV-Detektion ausscheiden (Patton *et al.*, 1982).

Die in dieser Arbeit verwendete Methode ist eine Adaption der von Olsson *et al.*, (1996) publizierten Methode im Mikromaßstab. Ein binärer Gradient aus komplexen Lösungsmittelgemischen wurde für multiple Lipidgemische und Lipidextrakte aus Amyloid-Proben über einen Zeitraum von 50 Min. gefahren (Abb. 3.6. B). Nach Evaluation der geeigneten Methodenparameter konnte von multiplen Lipidgemischen eine Grundlinientrennung aller Lipidklassen erreicht werden. Der UV-Detektor war mit einem automatisierten Fraktionensammler gekoppelt. Die Methode erlaubte es, Lipidgemische mit minimal 1 µg pro Lipidklasse mit einer Ausbeute von rund 90 % präparativ zu fraktionieren (Abb. 3.6. A, C).

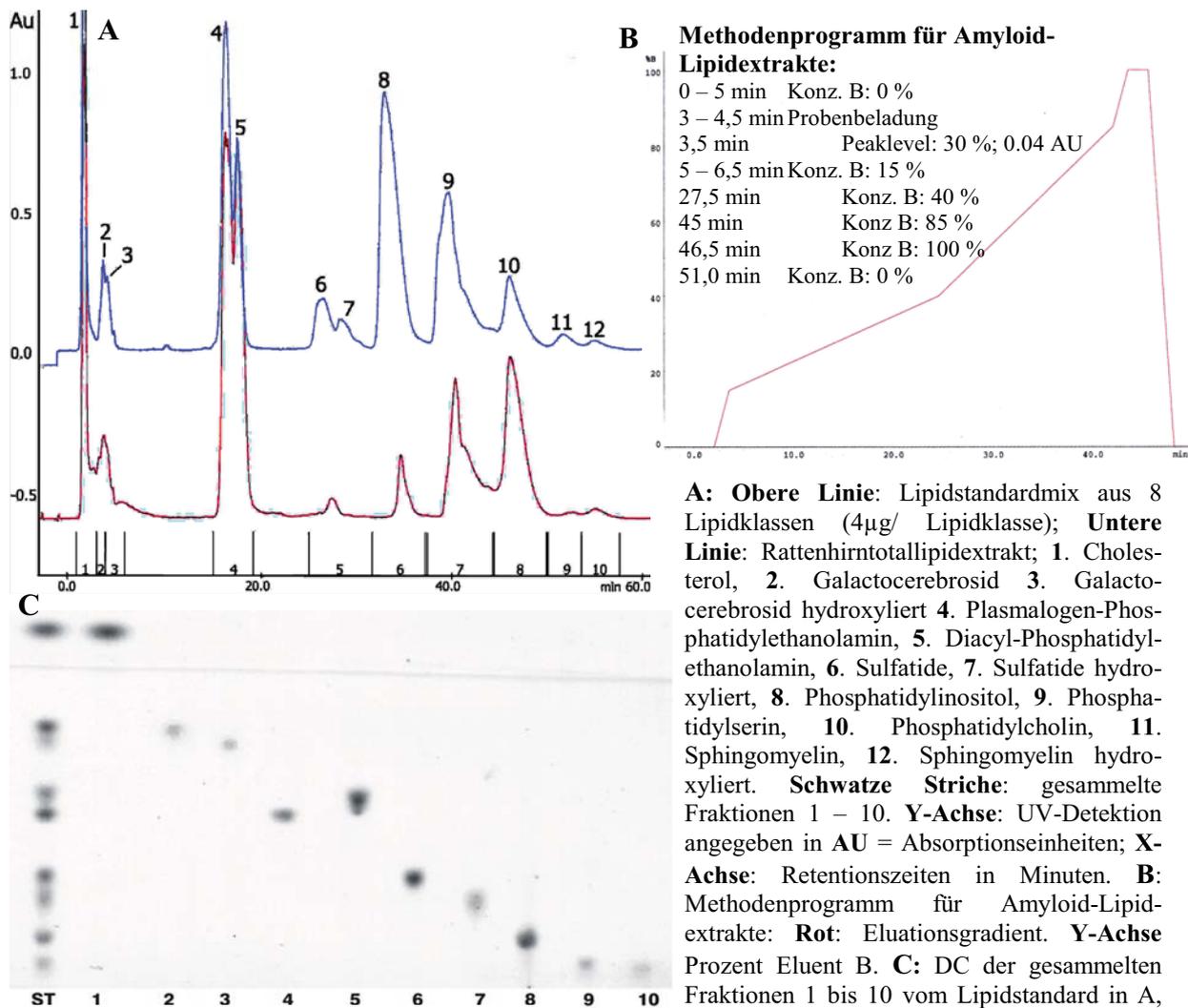


Abb. 3.6: Micro-HPLC-Trennung von Lipidgemischen.

Micro-HPLC-Elutionsprofil: Abhängigkeit von der Salzkonzentration

Wie beschrieben ist das Elutionsverhalten von Lipiden abhängig von mehreren Parametern. Das hier verwendete Micro-HPLC Verfahren ist empfindlich bezüglich Salzkonzentration in den mobilen Phasen. In mehren Versuchen zeigte sich, dass bei verschiedenen Ammoniumacetatkonzentrationen eine hohe Varianz im Elutionsprofil auftrat. Sulfatide haben bei der DC eine ähnliche Retenzionszeit wie Phosphatidylethanolamin (PE). Bei der micro-HPLC konnte eine Veränderung der Salzkonzentration auf 120 mg/L gegenüber der von Olsen *et al.*, (1996) publizierten von 180 mg/L ausgenutzt werden, um Sulfatide nach PE zu eluieren und sie so von PE zu trennen.

Eine Absenkung der Salzkonzentration lässt sich auch für schwierige Trennungen, wie die von Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin, einsetzen (Abb. 2.7 A). Bei 0 % Ammoniumacetat kommt es zu einer teilweisen Umkehr des Elutionsverhaltens polarerer Lipide, und PS und PI

eluierten nach PC und SM. Durch eine graduelle Salzkonzentration können bei sonst gleichen Bedingungen unterschiedliche Trenneigenschaften hervorgerufen werden. Standardmäßig wurde für eine Trennung polarer Lipidextrakte von physiologischen Proben eine Salzkonzentration von 120 mg/L eingehalten, mit der sich auch die kürzesten Retentionszeiten ergaben (Abb. 3.6 B).

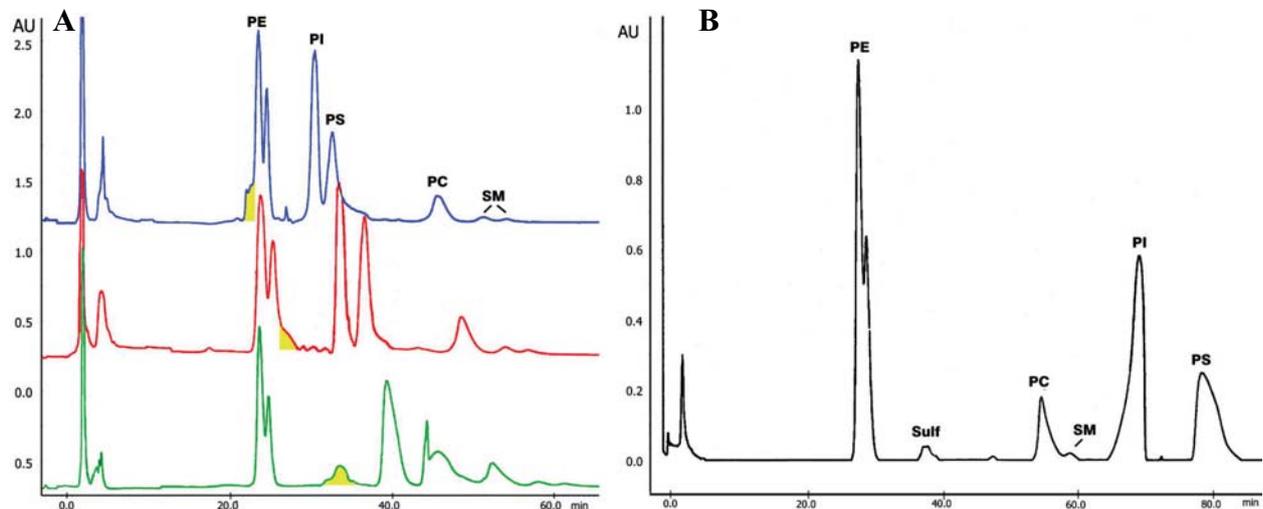


Abb. 3.7: Micro-HPLC: Einfluss der Salzkonzentration.

A und B: Y-Achse: UV-Detektion angegeben in AU = Absorptionseinheiten; X-Achse: Retentionszeiten in Minuten; Lipidstandardgemisch. **A:** Blau: 360 mg/L NH₄Ac; Rot: 180 mg/L NH₄Ac; Grün: 90 mg/L NH₄Ac; Gelb: Sulfatidpeak. **B:** 0 mg/L NH₄Ac mit verzögertem Eluatiionsprofil.

Matrixassistierte Laserdesorption/Ionisierung (MALDI) von Lipiden

Massenspektrometrie (MS) ist die empfindlichste Methode zur Lipidanalyse. MALDI-MS ist ein modernes Ionisierungsverfahren zur Massenspektrometrie intakter Molekülonen von hochmolekularen, thermisch labilen und schwer verdampfbaren Verbindungen. Erst seit kurzer Zeit ist es möglich, signifikante Mengen von Molekülonen, d. h. nicht fragmentierter, einfach geladener Ionen mit der molaren Masse des Analytmoleküls, aus den üblichen biologischen Molekülen zu produzieren. Im Falle von MALDI entstehen Quasimolekülonen M+H, M+Na oder M+K. Neben MALDI (Karas und Hillenkamp, 1988; Kaufmann, 1995) sind noch „fast atom bombardment“ (FAB; zur Übersicht: Murphy und Harrison, 1994) und „electrospray ionisation“ (Kerwin *et al.*, 1994) als vergleichbare Ionisierungsverfahren zu nennen. FAB von polaren Lipiden benötigt Probenmengen zwischen 2 µg (Bryant *et al.*, 1991) und 100 ng (Mollova *et al.*, 1995), vorherige Entfernung von Verunreinigungen und chromatographische Trennung der Lipidklassen, um deren unterschiedliche Flüchtigkeit zu kompensieren. Elektrospray-Ionisierung-MS (ESI-MS) setzt in wässrigen Systemen lösliche Proben voraus, die durch eine Düse vernebelt werden und ist damit sehr gut mit HPLC koppelbar. MALDI-MS ist auch für hochpolymere, wasserunlösliche Proben einsetzbar. Beide Techniken sind hochempfindlich. ESI (als nano-ESI) kommt mit 10 pg einer gereinigten Lipidklasse (Han und

Gross, 1994) oder 1 ng einer Mischung aus 4 Lipidklassen (Kerwin *et al.*, 1994) aus. ESI wird stark durch Verunreinigungen beeinflusst, indem z. B. Detergenzien und Salze die Ionenbildung aus Lipiden unterdrücken (Kerwin *et al.*, 1994). MALDI-MS ist robuster gegen kleine Verunreinigungen in biologischen Proben und liefert gute Lipidspektren mit geringer Fragmentierung (Harvey, 1995 a, b).

Messungen von Lipiden wurden auf einem Bruker BiflexTM MALDI-MS am IMB durchgeführt. Bei der Analyse komplexer Lipidgemische ergaben sich keine Möglichkeiten einer klaren Zuordnung einzelner Massenzahlen zu Lipidklassen (Abb. 3.8. A). Auch bei Reduktion der Laserenergie, was zu einer Verminderung der Fragmentierungsreaktion führt und bei gleichzeitiger Überlagerung mehrere „Laserschüsse“ zur Signalverstärkung konnten keine eindeutigen Signale für die Lipidklassen herausgearbeitet werden. Allerdings werden nicht alle Lipidklassen gleichermaßen gut ionisiert (Petkovic *et al.* 2001; Schiller *et al.*, 2002). Wie in Abbildung 3.8. B zu sehen ist, wird in einem Lipidgemisch aus PE und PC die Laserenergie hauptsächlich von PC absorbiert. Diese Beobachtung kann auf den MALDI-Ionenbildungsprozess zurückgeführt werden und ist durch die vorgebildete positive Ladung der polaren Kopfgruppe des Phosphatidylcholins bedingt (Harvey, 1995). In anderen Experimenten konnte gezeigt werden, dass besonders die Detektion von Phosphatidyletanolamin abhängig ist von der Anwesenheit von Phosphatidylcholin (Abb. 3.8. B). Deswegen war zur Detektion aller Lipidklassen in den biologischen Proben unbedingt eine vorherige Trennung der Lipidgemische mit microHPLC erforderlich.

Bei der MALDI-MS ist die Wahl der Matrix und der Ionisationsbedingungen von entscheidender Bedeutung. In unabhängigen Experimenten wurden verschiedene Matrizen verwendet, um vor allem die Nachweisgrenze des schwer zu detektierenden PE zu senken. Es wurden Matrizen wie α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure, Sinapinsäure, Hydroxypicolinsäure, Nicotinsäure und flüssige wie Glycerin ausprobiert. Als bestes System erwies sich 0,5 M 2,5-Dihydroxybenzoensäure in Methanol mit 0,1 % Triofluoressigsäure (v/v) (Schiller *et al.*, 1999) auf Platinprobentellern. Durch Zugabe der Triofluoressigsäure wird das Hintergrundrauschen vermindert und es lässt sich ein klareres Signal-Rauschverhältnis erhalten (Schiller *et al.*, 1999). Lipide wurden sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmode gemessen. Abbildung 3.8 C-E zeigt Beispiele der Massenspektren von mit microHPLC getrennten Lipidenklassen aus einem Standardgemisch. Alle molekularen Spezies können anhand ihrer Masse unterschieden werden.

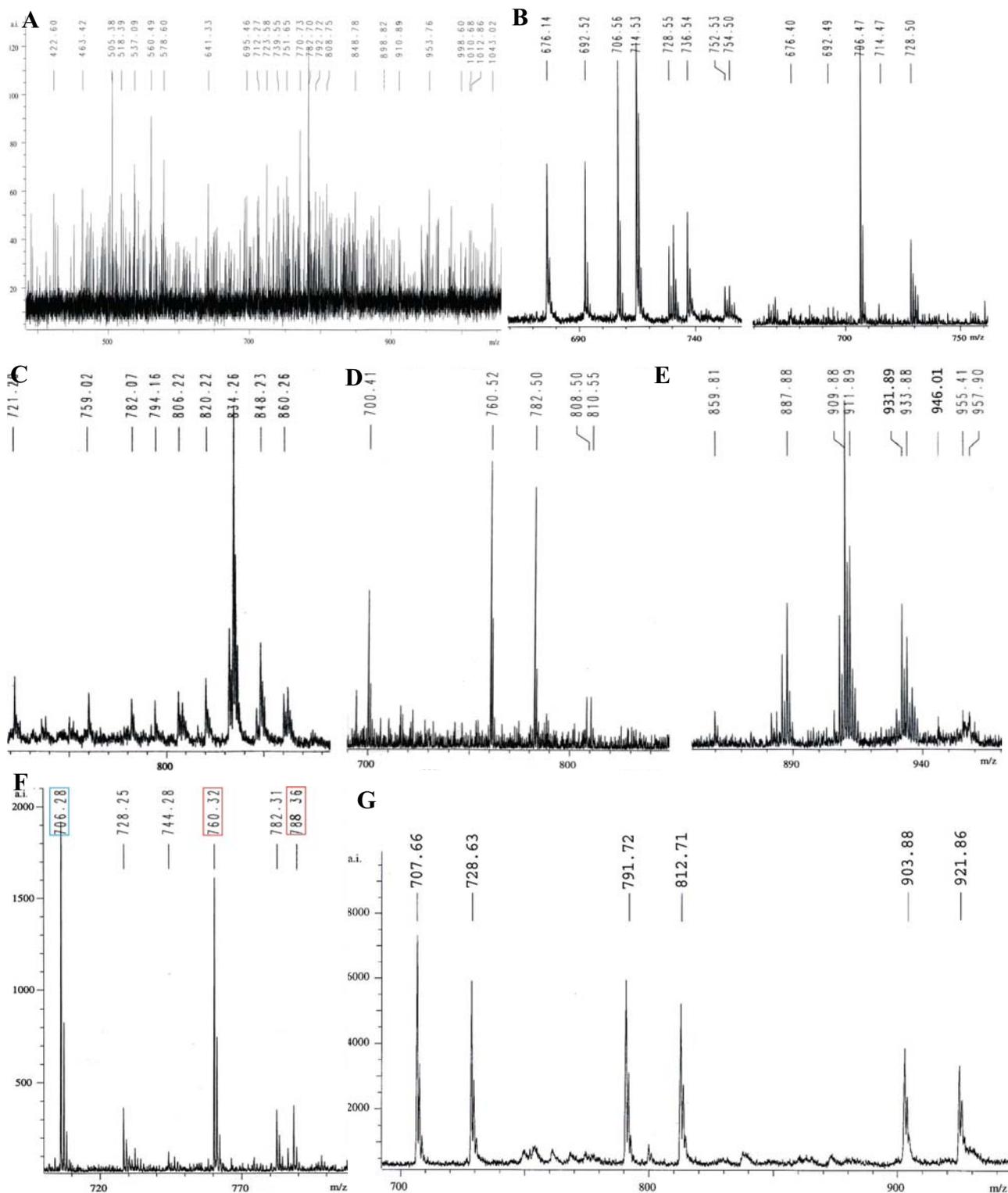


Abb. 3.8: MALDI-MS von Lipiden.

A: Lipidstandardgemisch mit „sanfter Ionisierung“, wenig Laserenergie; Insert: Lipidstandardgemisch hohe Laserenergie. **B:** Mischpräparation PC (MW 706, Natriumaddukt MW 728) und PE (MW 692, Natriumaddukt MW 714) Effekt der Energieabsorption durch PC. Links: 1 µg PE/0,1 µg PC, rechts: 1 µg PE/0,25 µg PC. Schon bei 0,25 µg PC wird das Signal von PE vollständig unterdrückt. **C – E:** Beispiele von Massenspektren physiologischer Lipidstandards aus Rinderhirn nach Trennung mit microHPLC. **C:** Galactocerebroside Typ I; **D:** Phosphatidylcholin; **E:** Phosphatidylinositol.; Alle molekularen Spezies können anhand ihrer Masse unterschieden werden. **F:** Quantifizierung von PC mittels eines synthetischen Standards: Linker Kasten: 0,5 µg PC C15:0/C15:0; MW 706. Rechter Kasten: 0,5 µg PC vom Rinderhirn C16:0/C18:1 und C18:0/C18:1; MW 760 und 788, rot). **G:** Lineare Abhängigkeit der Ionenaussbeute von der Molekülmasse dreier synthetischer PC-Standards gleicher molarer Menge: C15:0/C15:0; MW 706+H; C18:0/C18:0 MW 790,2+H; C22:0/C22:0 MW 902,4+H). **Y-Achse:** Signalstärke angegeben in AI = „Artificial Intensity“; **X-Achse:** Masse in m/z.

Mit einer „add on“-Methode konnte das Detektionslimit einzelner Lipidklassen 10 – 100fach zu publizierten Werten gesteigert werden (Petkovic *et al.*, 2001; Harvey, 1995 a, b) (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Detektionslimit von MALDI-MS einzelner Lipidklassen

Lipidklasse	Detektionslimit [in ng]
Galactocerebrosid	0.050
Phosphatidylcholin	0.020
Phosphatidylethanolamin	1
Phosphatidylglycerol	0.050
Phosphatidylinositol	1
Phosphatidylserin	0.029
Sphingomyelin	0.285
Sulfatid	2

Das Detektionslimit erwies sich im positiven Ionenmodus um die Hälfte sensitiver als im negativen Ionenmodus. Von allen polaren Phospholipidklassen wurden Tabellen mit den in der Natur vorkommenden möglichen Fettsäurekombinationen errechnet und angelegt, die es erlauben, unbekannte Analyten anhand ihrer Massenzahl zu bestimmen.

Quantifizierung von Lipiden mittels MALDI-MS

Wie beschrieben zeigen verschiedene Lipidklassen ein unterschiedliches Muster in der Ionenausbeute. PC ist als dominante Lipidklasse anzusehen und muss von den anderen separiert werden. Natürliche Lipidklassen können aus bis zu 30 verschiedenen molekularen Spezies bestehen. Dabei unterscheiden sie sich in der Länge und in der Anzahl der Doppelbindungen in den Fettsäuren.

Das Signal und die Ionenausbeute sind bei Maldi-MS abhängig von einem homogenen Kristallisationseffekt der Matrix mit der überschichteten Lipidprobe. Die Lipide verteilen sich aber über die gesamte Probenoberfläche nicht vollkommen gleichmäßig. Deswegen müssen mehrere Spektren einzelner „Laserimpulse“ auf unterschiedliche Stellen derselben Probe akkumuliert werden, um Vergleichswerte einer Lipidklasse zu erhalten. Zudem sind die Ionisierungsbedingungen bei jedem Experiment und sogar von Probenspot zu Probenspot leicht unterschiedlich.

Um bei der Bestimmung einer unbekanntem Mengen einer Lipidklasse diese Differenzen auszugleichen, muss ein interner Standard in bekannter Konzentration zu der zu analysierenden Lipidklasse vor Präparation auf dem Probensteller hinzugegeben werden (Abb. 2.8 I). Eine absolute Quantifizierung einer Lipidklasse ist dann möglich, wenn alle molekularen Spezies eine gleich starke Ionenausbeute zeigen und sich so der Gesamtgehalt einer analysierten Lipidklasse anhand einer Addition der Peakintensitäten aller molekularen Spezies ergeben würde (Koivusalo

et al., 2001). Molekulare Spezies zeigen aber Unterschiede in der Ionenausbeute bei MALDI-MS. In Abbildung 2.8 J ist am Beispiel von 3 synthetisch hergestellten PC-Standards mit unterschiedlich langen, ungesättigten Fettsäuren die Veränderung der Ionenausbeute gezeigt. Es konnte jedoch ein linearer Zusammenhang zwischen Zunahme der Fettsäurenkettenlänge und Abnahme der Ionenausbeute festgestellt werden (Abb. 2.8 J). Durch Zugabe von Lipidstandards bekannter Konzentration über den gesamten Massenbereich einer Lipidklasse lassen sich so unbekannte Mengen einer Lipidklasse und deren molekulare Spezies, durch Nutzung der linearen Beziehung in der Ionenausbeute und Fettsäurekettenlänge, quantifizieren. Dazu sind besonders synthetische Lipidstandards mit einer Fettsäurekettenlänge aus einer ungeraden Anzahl an Kohlenstoffatomen geeignet. Diese Standards sind leicht von Signalen natürlicher Lipide zu unterscheiden und geben aufgrund ihrer Reinheit durch synthetische Herstellung ein sehr klares Signal.

Das bedeutet als Voraussetzung für quantitative Aussagen über die Verteilung molekularer Spezies in Lipidklassen, dass mehrere interne Standards über den gesamten Massenbereich der zu analysierenden Lipidklasse, mit gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, mitgeführt werden müssen.

3.2.4 Zusammenfassung der Methodenentwicklung

Um die einzigartigen humanen *ex vivo* Amyloid-Proben auf ihren Lipidgehalt und ihre Lipidzusammensetzung charakterisieren zu können, mussten genaueste Mikromethoden etabliert werden. Diese sollten sensitiv genug sein, um bei einem eventuellen Lipidanteil von 1 bis 10 % in 1 mg Probenmaterial qualitative und quantitative Aussagen zu liefern. Zur Bestimmung und Quantifizierung der Lipidklassen wurde die hochauflösende Dünnschichtchromatographie so verbessert, dass sie quantitative Ergebnisse in diesem Mikrobereich liefert. Micro-HPLC zur präparativen Lipidklassentrennung konnte genutzt werden, um kleinste Mengen Lipide einer Analyse mittels MALDI-MS zugänglich zu machen. Damit stand eine weitere Methode zur Verfügung, die komplementäre Aussagen zur Lipidkonstellation im Mikrobereich leisten kann und darüber hinaus noch die Bestimmung der molekularen Spezies einzelner Lipidklassen erlaubt.

3.3 Lipidanalyse der *ex vivo* Amyloid-Proben

3.3.1. *Ex vivo* Amyloid-Fibrillen enthalten selektive Lipidmuster, „raft“-Lipide und Cholesterol-Ester.

Für die Untersuchung nicht-kovalent gebundener Lipide in *ex vivo* Amyloid-Fibrillen wurden die lyophilisierten Amyloidproben abgewogen und einer Lipidextraktion unterzogen.

Der Lipidextrakt wurde für quantitative Lipidbestimmungen unter Argon verdampft und gewogen. Er wurde in 2:1 1,2-Dichlorpropan/1-Propanol in einer Konzentration innerhalb der Eichpunkte der Lipid-Standardgeraden aufgenommen. Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt. Zusätzlich wurde der Lipidextrakt einmal in erhöhter Konzentration aufgetragen, um Lipide zu detektieren, die im Lipidgemisch in verhältnismäßig geringer Menge vorkommen und im ersten Fall unter die Nachweisgrenze fallen würden. In Ergänzung wurden noch physiologische Standards, die einen Vergleich mit natürlichen Lipidkompositionen erlauben, mit aufgetragen.

Abbildung 3.9 zeigt ein Übersichtsdünnschichtchromatogramm einzelner Gesamtlipidextrakte von Proben von Prof. Linke, Prof. Pras, Prof. Davies und physiologische Standards.

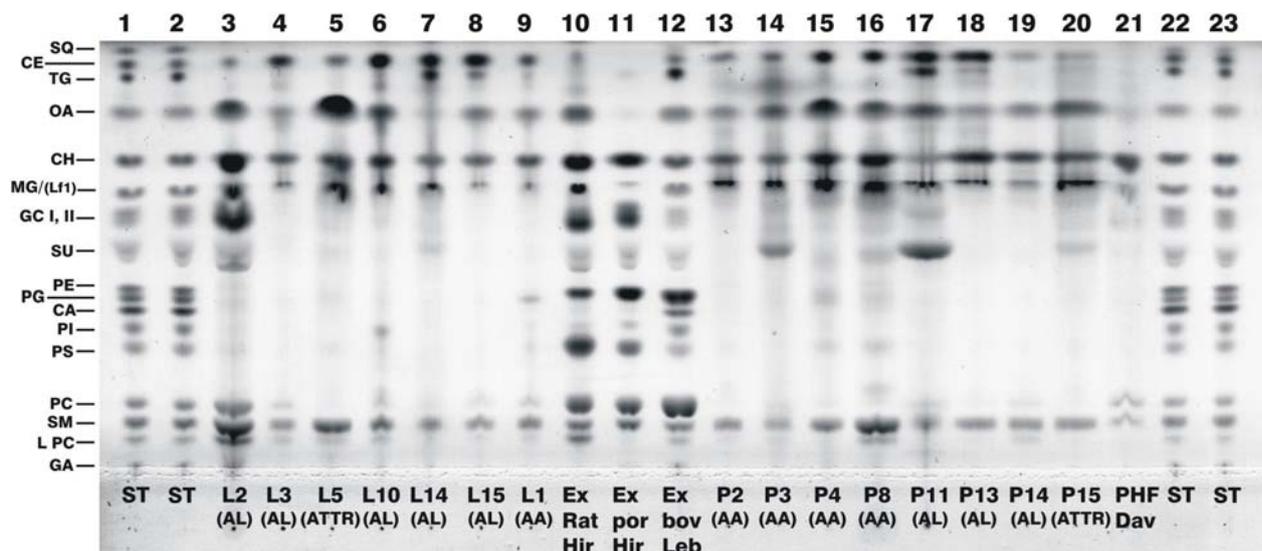


Abb. 3.9: Hochauflösende DC von physiologischen Standards und Gesamtlipidextrakten aus *ex vivo* Amyloid-Fibrillen.

Spur 1, 2, 22, 23: Lipidstandard (500ng/Lipidklasse). **Spur 4 - 9:** Proben von Prof. Linke, L1 (AA), L2 (Aλ), L3 (Aλ), L5 (ATTR wildtyp), L10 (Aλ), L14 (Aλk), L15 (Aλ). **Spur 10:** Lipidextrakt aus Rattenhirn. **Spur 11:** Lipidextrakt aus Schweinehirn (Avanti Polar Lipids). **Spur 12:** Lipidextrakt Rinderleber (Avanti Polar Lipids), **Spur 13 – 20:** Proben von Prof. Pras, P2 (AA), P3 (AA) P8 (AA), P11 (Aλ) P14 (Aλk), P15 (ATTR wildtyp). **Spur 21:** Probe von Prof. Davies („paired helical filaments“). **GA:** Ganglioside, **L. PC:** Lyso-Phosphatidylcholin, **SM:** Sphingomyelin, **PC:** Phosphatidylcholin, **PS:** Phosphatidylserin, **PI:** Phosphatidylinositol, **CA:** Cardiolipin, **PG:** Phosphatidylglycerol, **PE:** Phosphatidylethanolamin, **SU:** Sulfatide, **GC I, II:** Galactocerebroside Typ 1 und Typ 2 hydroxyliert und nicht-hydroxyliert), **MG/(L1):** Monoacylglycerid und Laufmittelfront 1, **CH:** Cholesterol, **OA:** Oleyl-Säure, **TG:** Triacylglycerid, **CE:** Cholesteryllinoleat, **SQ:** Squalen.

An den Rändern sind ein für Quantifizierungen verwendeter Lipidstandard (500 ng/Lipidklasse) zweifach (Abb. 3.9 Spur: 1, 2, 22, 23) und in der Mitte drei physiologische Lipidgesamtextrakte aus Rattenhirn, Schweinehirn und Rinderleber (Abb. 3.9 Spur: 10, 11, 12) mit aufgetragen, die auch bei den quantitativen Lipidanalysen verwendet wurden.

Die stärksten Banden in den *ex vivo* Amyloid-Proben sind Sphingomyelin, Cholesterol, eine einzelne Fettsäure und Cholesterol-Ester (Cholesteryllinoleat) (Abb. 3.9 Spur: 3 bis 9, 13 bis 20). Zu beachten ist dabei der unterschiedliche Farbkoeffizient beim Veraschen einzelner Lipidklassen. So ergibt Sphingomyelin ein stärkeres Signal als Phosphatidylcholin und Triacylglyceride ein stärkeres Signal als Cholesterol-Ester (zur Orientierung siehe Standardspuren, Abb. 3.9 Spur: 1, 2, 22, 23). Besonders auffällig ist der geringe Wert an PC, PS und PI und das vollständige Fehlen von PE in fast allen *ex vivo* Proben. Im Vergleich mit den physiologischen Lipidextrakten fällt zudem ein starkes SM-Signal gegenüber dem in natürlichen Lipidmembranen dominanten PC auf (Abb. 3.9 Spur: 3 bis 9, 13 bis 20; DC-Bereich unter Cholesterol). Auch auffällig ist der in einigen Proben hohe Wert an Sulfatiden und Galactocerebroside (Abb. 3.9 L14, P3, P4, P11, P15). An neutralen Lipiden konnten Triacylglyceride detektiert werden (Abb. 3.9 L14, L15, P11, P13). Der Gehalt an Monoacylglycerid ist schwer zu bestimmen, da Monoacylglyceride dicht unterhalb der Laufmittelfront erscheinen. An der Laufmittelfront lagern sich aber bei physiologischen Proben Kontaminationen wie Proteinfragmente und Zucker ab, die bei der Veraschungsreaktion ebenfalls schwarz gefärbt werden können. Diacylglyceride, die nahe bei Cholesterol laufen, konnten nicht detektiert werden. Interessant ist ein hoher Wert an Cholesterol-Estern, die in der Natur überwiegend im Zentrum von Lipoproteinen vorkommen (Voet und Voet, 1994).

Ein ebenfalls selektives Lipidmuster zeigt sich auch für die intrazelluläre Ablagerung der „paired helical filaments“. Allerdings findet sich dort im unpolaren Bereich der DC nur ein schwaches Signal für die freie Fettsäure. Zu detektieren sind hier: SM, PC, CH, und etwas GC. Im Gegensatz zu den Proben von Pras und Linke erscheint hier das Verhältnis SM zu PC dem der physiologischen Lipidextrakte zu gleichen. Zudem konnten keine Cholesterol-Ester nachgewiesen werden.

Die Lipidextrakte aller Proben wurden nach der beschriebenen Methode einer quantitativen Analyse unterzogen. Dabei zeigte sich in allen Lipidextrakten der *ex vivo* Amyloid-Proben ein selektives, von den physiologischen Gesamtlipidextrakten abweichendes Muster. In Abbildung 3.10 ist eine Übersicht über alle auswertbaren Proben von Prof. Linke (Abb. 3.10 A) und Pras (Abb. 3.10 B) gegeben. Es sind die Massenverteilungen in 2 µg Gesamtlipidextrakt angegeben. Zum Vergleich ist die Massenverteilung in 2 µg Gesamtlipidextrakte aus physiologischen Gewebeproben mit aufgeführt. Links ist die Lipidverteilung der intrazellulären PHFs angegeben.

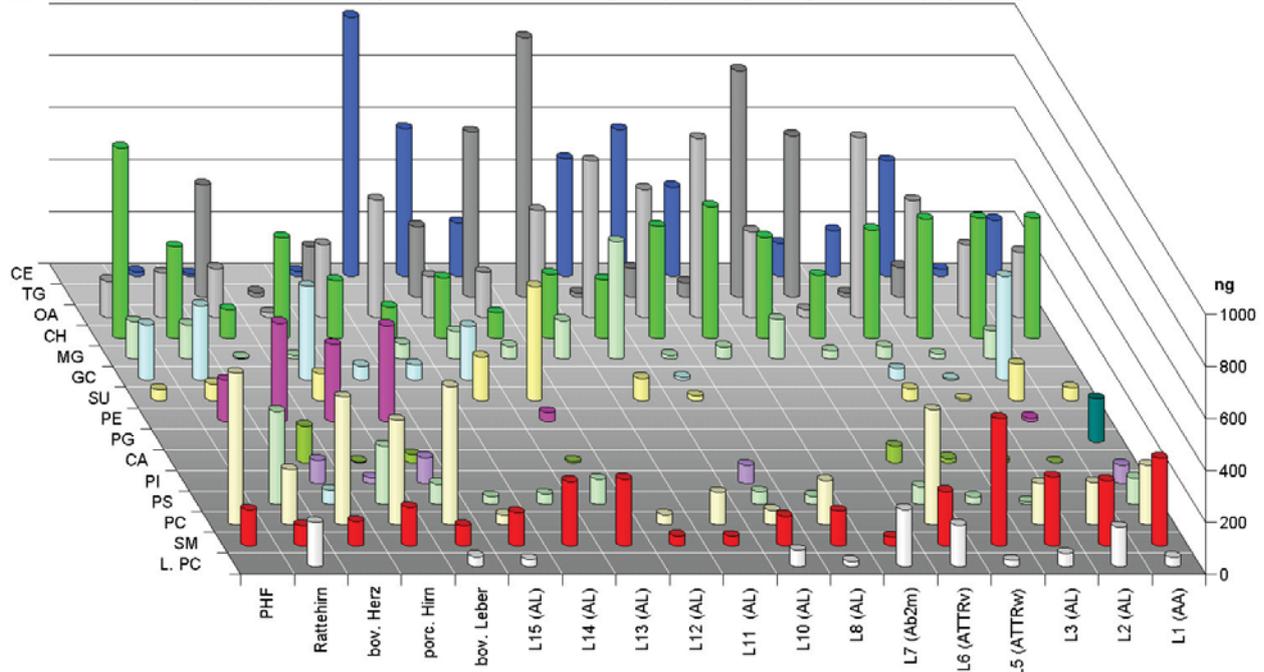
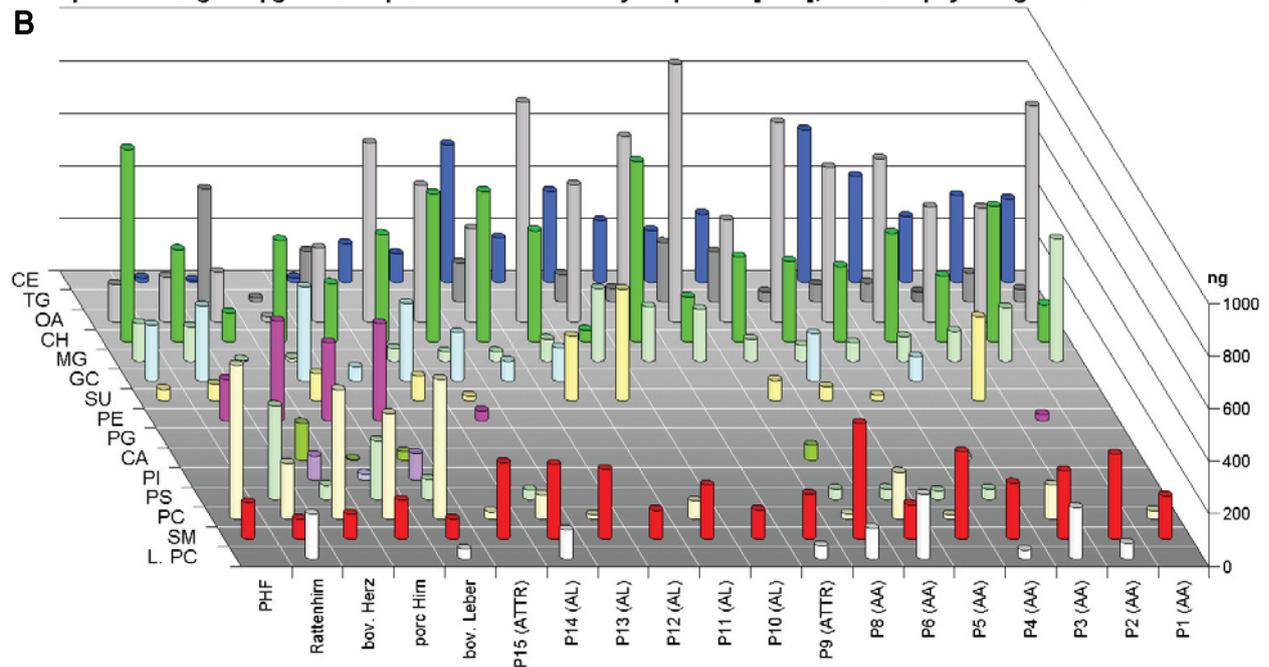
A Lipidverteilung in 2 µg Gesamtlipidextrakt: ex vivo Amyloidproben [Linke], PHF und physiologische Standards**B Lipidverteilung in 2 µg Gesamtlipidextrakt: ex vivo Amyloidproben [Pras], PHF und physiologische Standards**

Abb. 3.10: Lipidklassenverteilung in 2 µg Gesamtlipidextrakt aus ex vivo Amyloid-Proben und physiologischen Säuger-Geweben.

A: Lipidextrakte der Proben von Linke und physiologische Lipidstandards; **B:** Lipidextrakte der Proben von Pras und physiologische Standards; **L. PC:** Lyso-Phosphatidylcholin, **SM:** Sphingomyelin, **PC:** Phosphatidylcholin, **PS:** Phosphatidylserin, **PI:** Phosphatidylinositol, **CA:** Cardiolipin, **PG:** Phosphatidylglycerol, **PE:** Phosphatidylethanolamin, **SU:** Sulfatide, **GC I, II:** Galactocerebroside (Typ 1 und Typ 2 hydroxyliert und nicht-hydroxyliert), **MG/(Lfl):** Monoacylglyceride und Laufmittelfront 1, **CH:** Cholesterin, **OA:** Oleyl-Säure, **TG:** Triacylglyceride, **CE:** Cholesteryllinoleat.

Es sind keine Auswertungen der Proben P7, L4 und L9 vorhanden. L9 ging unwiderruflich durch Platzen eines Zentrifugenröhrchens verloren. Die Lipidextrakte der Proben P7 und L4 zeigten keine auswertbaren Banden, sondern auf der DC-Platte nur eine schwarze Schliere über die

gesamte Laufspur. Vermutlich sind alle lipiden Komponenten in diesen Proben vollständig degradiert oder mit Kontaminationen versehen (nicht gezeigt).

PC und PE sind die häufigsten Phospholipide in natürlichen Lipidgemischen aus Geweben (Abb. 2.9 Spur: 10, 11, 12). Zusätzlich findet sich noch Cholesterol, welches die Fluidität von Membranen beeinflusst. In Gesamtlipidextrakten aus Geweben reichern sich daneben auch Spuren von neutralen Speicherlipiden wie Mono-, Di- und Triacylglycerinen und einzelnen Fettsäuren an (Abb. 2.9). Die gefundenen Werte für die Lipidextrakte aus Ratten- und Schweinehirn, sowie Rinderherz und Leber stimmen sehr gut mit den in der Literatur gemachten Angaben (Rouser *et al.*, 1967, 1969) und den von Avanti Polar Lipids publizierten prozentualen Anteilen einiger Phospholipide in ihren Lipidextrakten (PC, PI, PS und PE) mit weniger als 5 % Abweichung überein.

Im Gegensatz zu den physiologischen Lipidextrakten zeigen nur die Proben L2, L13, P2 und P15 geringe Spuren an Phosphatidylethanolamin. Außerdem ist in allen Proben, mit Ausnahme von L6, ein sehr geringer Wert an Phosphatidylcholin zu erkennen. In den Proben ist dagegen ein hoher Anteil an Sphingolipiden nachzuweisen. Sphingomyelin ist in fast allen Proben der Serums-Amyloid-Proteine (AL, AA, ATTR, A β _{2m}) über eine in natürlichen Geweben vorkommende Menge hinaus, vorhanden. Zudem sind vor allem die hohen Werte an Cholesterol und Cholesterol-Ester in den Proben der amyloiden Serumsproteine bemerkenswert.

Besondere Strukturen in Plasmamembranen sind „lipid rafts“ (Lipidflösse) die sich durch einen hohen Anteil an den in den Proben der Serumsproteine gefundenen Sphingolipiden und Cholesterol auszeichnen, was ihnen eine geordnete Struktur mit hoher Festigkeit verleiht (Simons und Toomre, 2000). Cholesterol-Ester sind dagegen in physiologischen Lipidextrakten nur in geringer Menge zu finden, da sie hauptsächlich als apolares Lipid im Zentrum von Apolipoproteinen im Blut vorkommen und an der Regulation des Cholesterol- und Phosphoglycerinhaushalts beteiligt sind (Voet und Voet, 1994).

Ausnahmen zu dem beschriebenen Lipidmuster der Serums-Amyloid-Proteine stellen die Proben L7, L12 und P6 dar. P6 (AA), das aus Formalin eingebettetem Gewebe extrahiert wurde, zeigt auch in Bezug auf den SM- zu PC-Gehalt ein untypisches Beispiel für die *ex vivo* Amyloid-Proben, obwohl auch hier vorwiegend Sphingomyelin und Cholesterol zu finden sind. Dahingegen scheint sich in Probe L12 (A λ) überwiegend das Speicherfett Triacylglycerid angelagert zu haben. Ein ähnlicher Effekt ist auch in Probe L7 (einer Amyloid-Aufreinigung eines subkutanen Knotens angereichert mit A β _{2m}-Fibrillen) zu detektieren. Tabelle 3.5 gibt eine Übersicht über die Molprozentage der gefundenen Lipidklassen in den Gesamtlipidextrakten.

Tabelle 3.5: Lipidklassenverteilung in Mol %: Proben: von Linke, Pras, PHF und physiologische Lipidstandards

Lipid klasse	L1	L2	L3	L5	L6	L7	L8	L10	L11	L12	L13	L14	L15
L. PC	2	8	3	1	8	11	1	3					1
SM	11	13	13	25	11	2	7	6	2	2	13	12	6
PC	7	8	8		22		9	3	6	2			2
PS	3			1	3		2	2			5	2	1
PI	2							4					
CA			1	1	3								
PG	6												
PE		1									2		
SU	1	7		2				1	4		22	8	
GC		20		2				1				10	3
MG		5	1	2	2	8	2	1	23	7	3	5	3
CH	29	23	23	21	12	20	25	22	23	12	5	15	15
OA	22	14	23	35	2	17	35	25	17	21	9	7	14
TG	2		6	1	31	44	3	6	1	56	32	14	
CE	14	1	22	9	6		17	28	23		10	28	54

Lipid klasse	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15
L. PC		2	9	1		10	5	2					5	
SM	4	9	8	6	9	4	13	4	3	6	3	7	8	8
PC	1		4			5	1			2			3	1
PS				1	1	1	1							
PI														
CA							1							
PG														
PE													1	
SU			9		1	1	2			11	6			2
GC				2		4					3	2	5	7
MG	22	11	7	5	4	3	5	10	10	16	4	2	2	3
CH	6	27	14	21	14	16	19	8	31	2	20	31	31	22
OA	51	31	34	42	41	55	31	62	44	40	56	26	39	49
TG	1	3	1	2	2	1	5	5	1	3		4		
CE	14	17	14	20	29		15	9	11	19	8	28	6	8

Lipid klasse	bov. Leber	porc. Hirn	bov. Herz	Hirn (Ratte)	PHF	Lipid klasse	Molekulargewicht
L. PC	2			9		L. PC	510
SM	4	7	5	4	7	SM	750
PC	27	20	25	11	29	PC	760
PS	4	11	3	18		PS	800
PI	5	1	4			PI	880
CA	2		7			CA	1500
PG						PE	740
PE	18	15	19	8		PG	750
SU		5		3	2	SU	820
GC	3	18		14	11	GC	820
MG		1		7	7	MG	366
CH	11	19	6	18	37	CH	388
OA	14	1	9	9	7	OA	283
TG	10	1	22			TG	800
CE	1			1		CE	388

Als Molekulargewichte für Phosphoglyceride und Triacylglycerine wurden Mittelwerte der Massen der häufigsten molekularen Spezies genommen (nebenstehende Spalten).

L. PC: Lyso-Phosphatidylcholin, **SM:** Sphingomyelin, **PC:** Phosphatidylcholin, **PS:** Phosphatidylserin, **PI:** Phosphatidylinositol, **CA:** Cardiolipin, **PG:** Phosphatidylglycerol, **PE:** Phosphatidylethanolamin, **SU:** Sulfatide, **GC I, II:** Galactocerebroside (Typ 1 und Typ 2 hydroxyliert und nicht-hydroxyliert), **MG:** Monoacylglyceride, **CH:** Cholesterol, **OA:** Oleylsäure, **TG:** Triacylglycerine, **CE:** Cholesteryllinoleat.

3.3.2 Die Lipidextrakte der Proben von Pras und Linke zeigen ein einheitliches Bild

Beim Vergleich der gefundenen selektiven Lipidmuster in den wasseraufgereinigten Amyloid-Proben der Serumsproteine gab es keine auffallenden Unterschiede (Abb. 2.9; 2.10). In den Pras-Proben war insgesamt etwas weniger Triacylglycerid zu detektieren. Die Werte an Sphingomyelin sind einheitlicher in den Pras-Proben. Jedoch liegt in ihnen ein etwas höherer Gehalt an freier Fettsäure vor.

3.3.3 Die Gesamtlipidmenge ist in den verschiedenen *ex vivo* Amyloid-Proben unterschiedlich

Die Gesamtmenge der in den *ex vivo* Aggregaten gefundenen Lipide wurde durch quantitative DC und Summation der Werte der Lipidklassen bestimmt. Der Lipidgehalt ist bei den Proben der Serumsproteine unterschiedlich und schwankt zwischen 1 bis 14 %. In den PHF konnte mit die geringste Lipidmenge detektiert werden (Tab.2.6).

Tabelle 3.6: Lipidgehalt der *ex vivo* Amyloid-Fibrillen in Prozent zur Einwaage

Probe	L1	L2	L3	L5	L6	L7	L8	L10	L11	L12	L13	L14	L15	PHF
Amyloid typ	AA	A λ	A λ II	ATTR (W)	ATTR (V)	A β 2m	A λ K	A λ K	A λ	PHF				
Lipidgehalt %	6	1	3	2	4	7	3	2	10	10	11	12	3	2
Probe	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15
Amyloid typ	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	ATTR (V)	A λ	A λ	A λ	A λ	A λ -K	ATTR (V)
Lipidgehalt %	14	8	6	1	1	11	3	10	9	12	13	2	5	6

Die Werte sind in Prozent zur Einwaage der für die Lipidextraktion verwendeten *ex vivo* Amyloid-Fibrillen angegeben. Aufgrund des Fehlers der Waage im Milligrammbereich, sowie eventueller Verluste bei der quantitativen DC kann eine Maximalabweichung von 20 % nicht ausgeschlossen werden. Die Werte sind deswegen ohne Nachkommastellen angegeben.

Die gefundenen Werte zeigen, dass 1 bis 14 % Lipide mit den Amyloid-Fibrillen assoziiert aufgereinigt wurden. Der unterschiedliche Lipidgehalt ist im Moment nicht erklärbar. Trotz dessen ist die Lipidklassenverteilung in den Proben der Serumsproteine untereinander sehr ähnlich. Addiert man den gefundenen Gesamtlipidgehalt und Proteingehalt in den Proben zusammen (Tabelle 3.3), so ergibt sich für die meisten der Proben, dass noch weitere unbestimmte Komponenten in den aufgereinigten Amyloid-Fibrillen vorliegen.

3.3.3 Krankheitstyp und Patientenklasse haben keinen Einfluss auf das selektive Lipidmuster

Betrachtet man die erhaltenen Lipidverteilungen im Hinblick auf das zugrunde liegende Fibrillenprotein, so lassen sich zwischen den verschiedenen untersuchten Krankheitstypen keine signifikanten Unterschiede in der Lipidverteilung detektieren. Der Schwerpunkt der Untersuchungen wurde auf AA und A λ Amyloidosen gelegt, da hier das meiste Patientenmaterial vorhanden war. Aber auch beim Vergleich mit den Transthyretin-Wildtypproben, der Thransthyretin-Variant und der β_2 Mikroglobulinprobe ist ein ähnliches Lipidmuster zusehen.

Des Weiteren konnten keine systematischen Unterschiede im Lipidmuster bei Patienten unterschiedlicher Altersklasse gefunden werden. Zum Beispiel sind beim Vergleich der Lipidmuster der Patienten L1 (28 Jahre) und P15 (29 Jahre) mit Patient L5 (88 Jahre) keine

altersspezifischen Unterschiede zu erkennen (Abb. 3.10). Auch bei den mit MALDI-MS analysierten molekularen Spezies der Lipidklassen waren keine altersspezifischen Muster im Grad der Sättigung oder Länge der Fettsäuren zu detektieren (Abschnitt 3.3.12)

3.3.4 Lipidextrakte der intrazellulären PHF haben ebenfalls ein selektives, jedoch abweichendes Lipidmuster

Die intrazellulären und fibrillären Ablagerungen der „paired helical filaments“ wurden von Professor Davies mit Immunoaffinitätschromatographie aufgereinigt. Auch in diesen Ablagerungen fällt bei der Betrachtung der Lipidklassenverteilung das Fehlen von PE auf. PI und PS sind ebenfalls nicht nachzuweisen. Zudem konnten noch die in den *ex vivo* Amyloiden der Serumsproteine gefundenen Sphingolipide, wenn auch in etwas geringerer Menge detektiert werden. Cholesterol war stark angereichert nachzuweisen. Signifikanter Unterschied zu den anderen *ex vivo* Amyloid-Proben der Serumsproteine ist aber ein hoher Wert an PC und die Abwesenheit von Cholesterol-Estern.

3.3.5 Kontrollexperimente: die selektiven Lipidmuster sind keine Artefakte durch die Aufreinigung

Um ausschließen zu können, dass das in den Amyloid-Proben gefundene selektive Lipidmuster kein Artefakt der „Wasseraufreinigungsmethode nach Pras“ ist, wurde diese Methode in der vorliegenden Arbeit mit „gesundem“ tierischem Kontroll-Gewebe durchgeführt. Es wurden dazu Gewebe einer Schweinemilz und eines Rinderherz, die frisch nach der Schlachtung entnommen wurden, verwendet. Mit rund 3 Gramm dieses Gewebes wurden 10 Homogenisations- und Zentrifugationsschritte ($2,0 \times 10^4$ g) mit 0,15 M NaCl durchgeführt. Die Überstände enthalten bei erkranktem Gewebe die nicht-amyloiden Gewebestandteile. Zur Kontrolle wurden sie gesammelt und einer Lipidextraktion mit C/M unterzogen. Das Pellet wurde mit H₂O dest. fünfmal homogenisiert und bei $2,8 \times 10^4$ g zentrifugiert (ÜI – ÜV). Bei amyloidhaltigem Gewebe reichern sich die gereinigten Fibrillen in Überstand II bis V an. Die Überstände II bis V sowie der Überstand I (Überstand der Fraktion nach dem ersten Homogenisationsschritt mit H₂O dest.) wurden ebenfalls einer Lipidextraktion mit C/M unterzogen. Abbildung 2.11 zeigt ein DC von Gesamtlipidextrakten der Überstände II bis V der Schweinemilz und des Rinderherz. Daneben sind jeweils Gesamtlipidextrakte von Überständen aus den 10 Homogenisations- und Zentrifugationsschritten sowie Überstand I des ersten Homogenisierungsschritt mit H₂O dest. aufgetragen. Bei den Gesamtlipidextrakten aus dem Rinderherz und der Schweinemilz der Überstände II bis V der bei der Wasseraufreinigungsmethode mit Amyloidgewebe

amyloidhaltigen Fraktionen konnten keine selektiven Lipidbanden detektiert werden. Dagegen ist ein Lipidmuster, das dem des in Milz- und Herzgewebe vorkommenden entspricht, in allen Überständen der Homogenate 1 bis 10 bei zu finden. Interessanterweise reichert sich nach dem ersten Homogenisationsschritt mit H₂O dest. noch ausreichend Material an, aus dem sich ein natürliches Lipidgemisch der Milz und des Herzen extrahieren lässt (Überstand I; Abb. 3.11 Spur 2 und 12).

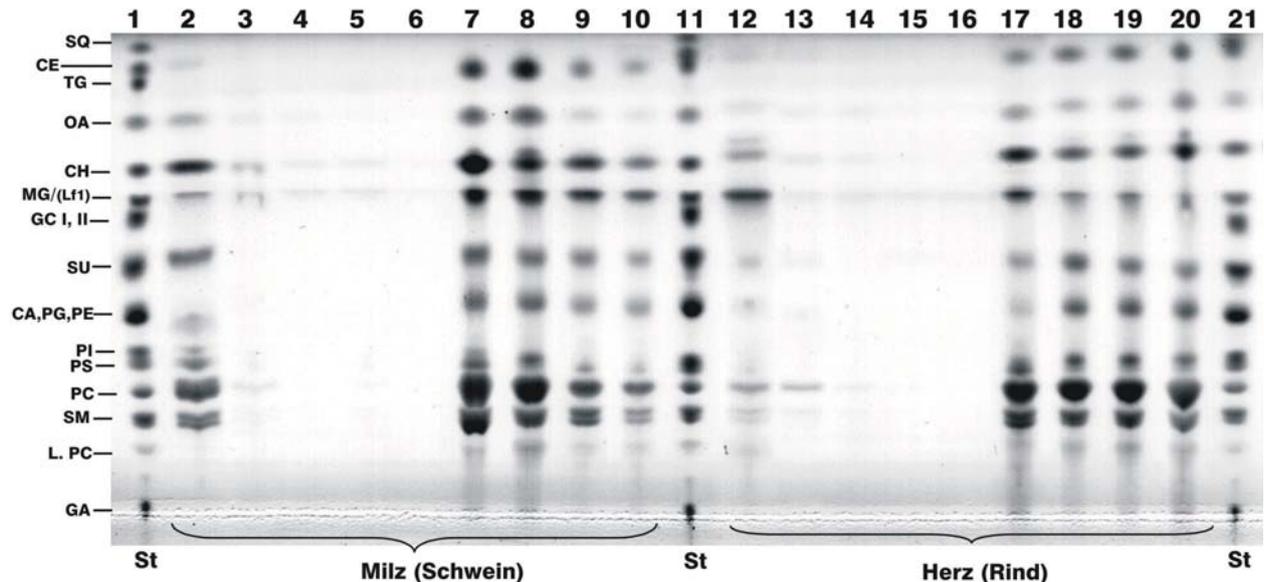


Abb. 3.11: Gesamtlipidextrakte von Überständen der Homogenisierungs- und Zentrifugationsschritte bei der Wasserreinigungsmethode von Pras.

Spur 1, 11, 21: Lipidstandardgemisch. **Spur 2:** Milz (Schwein), Gesamtlipidextrakt von Überstand I (Prozedur durchgeführt mit H₂O dest., NaCl ist aber noch aus den vorherigen Schritten vorhanden). **Spur 3-6:** Milz (Schwein), Gesamtlipidextrakt Überstand II-V in H₂O dest. (enthält das Amyloid bei „erkranktem“ Gewebe). **Spur 7-10:** Milz (Schwein), Lipidextrakt vom Homogenat Ü1 (7), Ü2 (8), Ü5 (9), Ü8 (10) in 0,15 M NaCl. **Spur 12:** Herz (Rind) Gesamtlipidextrakt von Überstand I nach erstem Waschschrift mit H₂O dest. **Spur 13-16:** Herz (Rind) Gesamtlipidextrakt Überstand II-V in H₂O dest. (enthält das Amyloid bei „erkranktem“ Gewebe). **Spur 17-20:** Lipidextrakt vom Homogenat Ü1 (17), Ü2 (18), Ü3 (19), Ü6 (20) in 0,15 M NaCl. **GA:** Ganglioside, **L. PC:** Lyso-Phosphatidylcholin, **SM:** Sphingomyelin, **PC:** Phosphatidylcholin, **PS:** Phosphatidylserin, **PI:** Phosphatidylinositol, **CA:** Cardiolipin, **PG:** Phosphatidylglycerol, **PE:** Phosphatidylethanolamin, **SU:** Sulfatide, **GC I, II:** Galactocerebroside Typ 1 und Typ 2 hydroxyliert und nicht-hydroxyliert), **MG/(LFI):** Monoacylglycerid und Laufmittelfront 1, **CH:** Cholesterin, **OA:** Oleyl-Säure, **TG:** Triacylglycerid, **CE:** Cholesteryllinoleat, **SQ:** Squalen.

Es ist kein selektiver Verlust einer bestimmten Lipidklasse während der Aufreinigung zu erkennen. Im Homogenisationsschritt konnten einzelne Lipidklassen weniger stark im Überstand nachgewiesen werden, was auf eine nicht ausreichende Homogenisierung im ersten Schritt hindeutet (Abb. 3.11 Spur 17, Spur 7 Triacylglyceride aus Speichervakuolen).

Bei der Durchführung der Wasserreinigungsmethode nach Pras wurden keine selektiven Lipidmuster einzelner Lipidklassen, wie sie in den Lipidextrakten der *ex vivo* Amyloid-Fibrillen zu finden sind, angereichert.

3.3.6 Degradation gelagerter Lipide

In Langzeitversuchen wurde das Zersetzungsverhalten von Phospho-, und Sphingo-Lipiden untersucht. Dazu wurden Verdünnungen von Ausgangsstandards der Lipidklassen angesetzt und in C/M bei -20°C gelagert. Nach 0,5 Jahren Lagerungszeit wurden zwei Proben jeder Lösung aufgetragen (200 ng, 2 μg). Dabei zeigte sich, dass vor allem PE degradierte und eine Fettsäure abgespalten wurde. Die verwendeten Lipidstandards wurden von Sigma Deisenhofen bezogen und haben laut Hersteller eine Reinheit von 98 bis 99 %. Degradation durch Phosphatasen ist weitestgehend auszuschließen. Der Plasmalogenanteil des bovinen PE-Standards beträgt 60 %. Es ist wahrscheinlich, dass hier vor allem die Enoletherbindung von Oxidation betroffen ist und dadurch eine Fettsäure abgespalten wird (Abb. 3.12).

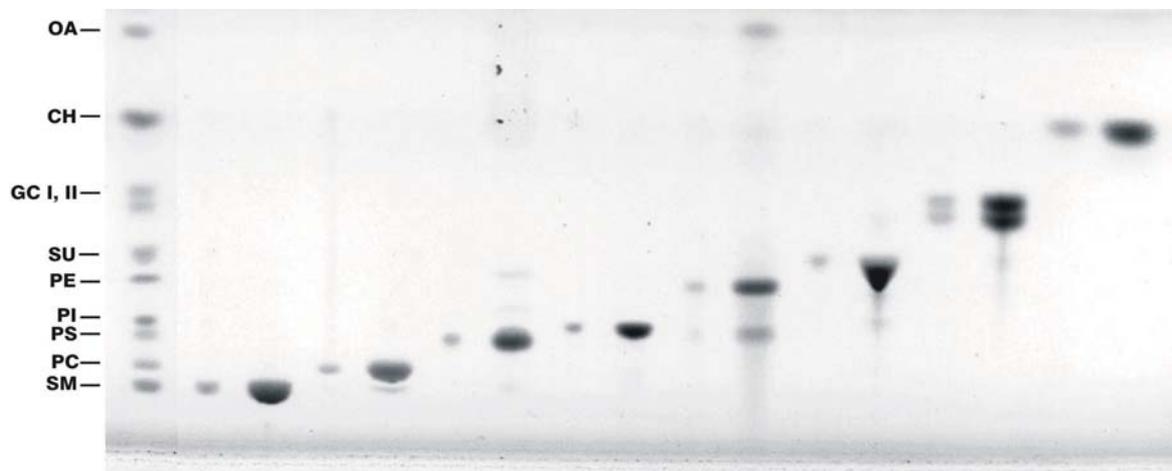


Abb. 3.12: Langzeitlagerung polarer Membranlipide.

Einzelstandards polare Membranlipide wurden jeweils 0,5 Jahre bei -20°C in C/M gelagert. Das Auftragsvolumen entspricht den vor 0,5 Jahren hergestellten Konzentrationen von jeweils 200 bzw. 2000 ng je Lipid. **SM**: Sphingomyelin, **PC**: Phosphatidylcholin, **PS**: Phosphatidylserin, **PI**: Phosphatidylinositol, **CA**: Cardiolipin, **PG**: Phosphatidylglycerol, **PE**: Phosphatidylethanolamin, **SU**: Sulfatid, **GC I, II**: Galactocerebrosid Typ 1 und Typ 2 hydroxyliert und nicht-hydroxyliert), **CH**: Cholesterol, **OA**: Oleyl-Säure, (modifiziert nach Raskatow, 2002).

Das bovine PC enthält nur sehr wenig Plasmalogen-PC und hier konnten kaum Abbauprodukte detektiert werden. Auch PS zeigte nach 0,5 Jahren leichte Abbaubanden (Abb. 3.12). Phospholipidstandards, die 1,5 Jahre gelagert wurden, erfuhren wenig weiteren Abbau und es zeigte sich, dass es bei PE nach Abspaltung einer Fettsäure zu keiner nennenswerten weiteren Degradation mehr kam (Daten nicht gezeigt). Auch beim Gesamtlipidextrakt aus Rattenhirn, welcher 3 Monate Oxidation ausgesetzt war, konnte eine Zersetzung von PE beobachtet werden (Abb. 3.9, 3.10 A, B). Lyso-PE zeigt ein ähnliches Laufverhalten bei der DC wie PS und kann deswegen nur schwer unterschieden werden. Der hohe Gehalt an PS und der niedrige PE-Wert im oxidierten Rattenhirnstandard, bei dem PS und Lyso-PE zusammen quantifiziert wurden, ist auf diesen Effekt zurückzuführen (Abb. 3.9, 3.10 A, B). Rattenhirn PC besteht zu 40 % aus Plasmalogen-PC (Freysz *et al.*, 1968) welches im oxidierten Rattenhirnlipidextrakt zu Lyso-PC

und freier Fettsäure abgebaut wurde. Plasmalogene scheinen generell anfälliger gegen Oxidation zu sein. Bei allen anderen frisch extrahierten physiologischen Lipidstandards konnte dieser Effekt nicht gefunden werden.

3.3.7 Die Ergebnisse werden durch Micro-HPLC und MALDI-MS bestätigt

Micro-HPLC mit anschließender MALDI-MS wurde für die zuvor dünnschichtchromatographisch analysierten Lipidextrakte durchgeführt, um die Identität der gefundenen Lipidklassen zu bestätigen und ihre molekularen Bestandteile zu identifizieren. Nur Spektren positiver Ionen wurden zur Lipidanalyse der Lipidextrakte aus den *ex vivo* Amyloid-Proben und PHF aufgenommen. Eine Bestimmung der molekularen Spezies wurde für 10 Proben durchgeführt: L1 (AA), L2 (A λ), L10 (A λ), L14 (A λ), L15 (A λ), P3 (AA), P6 (AA), P13 (A λ), P14 (A $\lambda\kappa$), PHF. In Abbildung 3.13 sind beispielhaft zwei micro-HPLC Elutionsprofile von Gesamtlipidextrakten aus *ex vivo* Amyloid-Proben gezeigt.

Die bei der micro-HPLC erhaltenen Peakfraktionen wurden mit MALDI-MS analysiert. Im Massenbereich der Quasimoleküle der untersuchten Lipidklassen ($m/z = 700$ bis 935 u) konnten protonierte Lipidspezies zusammen mit Natrium- und (wenig) Kaliumaddukten registriert werden. Alle Peaks wurden anhand ihrer m/z -Werte identifiziert und in eine Tabelle (Tabelle 3.6) aufgenommen. Die beobachteten polaren Lipide gehören den Lipidklassen an, die vorher schon per DC in den Proben gefunden wurden (Galactosylceramide, Sulfatide, Sphingomyelin, Phosphatidylserin, Phosphatidylcholin und in zwei Proben in kleiner Menge Phosphatidylethanolamin). Die Ergebnisse der beiden unabhängigen Methoden sind in sehr guter Übereinstimmung.

Die Lipidklassen geben im Massenspektrum nicht ein Signal wie in der DC, sondern werden in die für Fettsäuren charakteristischen Peakgruppen im Abstand von 28 Masseneinheiten aufgetrennt, deren Mikroheterogenität (2 m/z) für den Gehalt an Doppelbindungen in den Fettsäuren oder der Sphingosinkomponente typisch ist (Abb. 3.13, Tabelle 3.6). Die Periodizität von 28 Masseneinheiten ist durch das ausschließliche Vorkommen geradzahlgiger Fettsäuren in der Natur bedingt und zwischen den Peaks aller Lipidklassen festzustellen (Beispiel GC: Abb. 3.13 C, D und Tabelle 3.6).

Die hohe Auflösung der MALDI-Massenspektren ermöglicht es, die molekularen Spezies, d. h. die Fettsäureverteilung und den Gehalt an Doppelbindungen in den einzelnen Lipidklassen zu bestimmen. Beim Vergleich der erhaltenen Verteilung der molekularen Spezies mit parallel analysierten Lipidklassen aus physiologischen Lipidextrakten von Schweinehirn und Rinderleber konnten wenig Abweichungen in der Fettsäurekonstellation einzelner Lipidklassen zu den aus *ex vivo* Amyloid-Fibrillen extrahierten Lipiden detektiert werden.

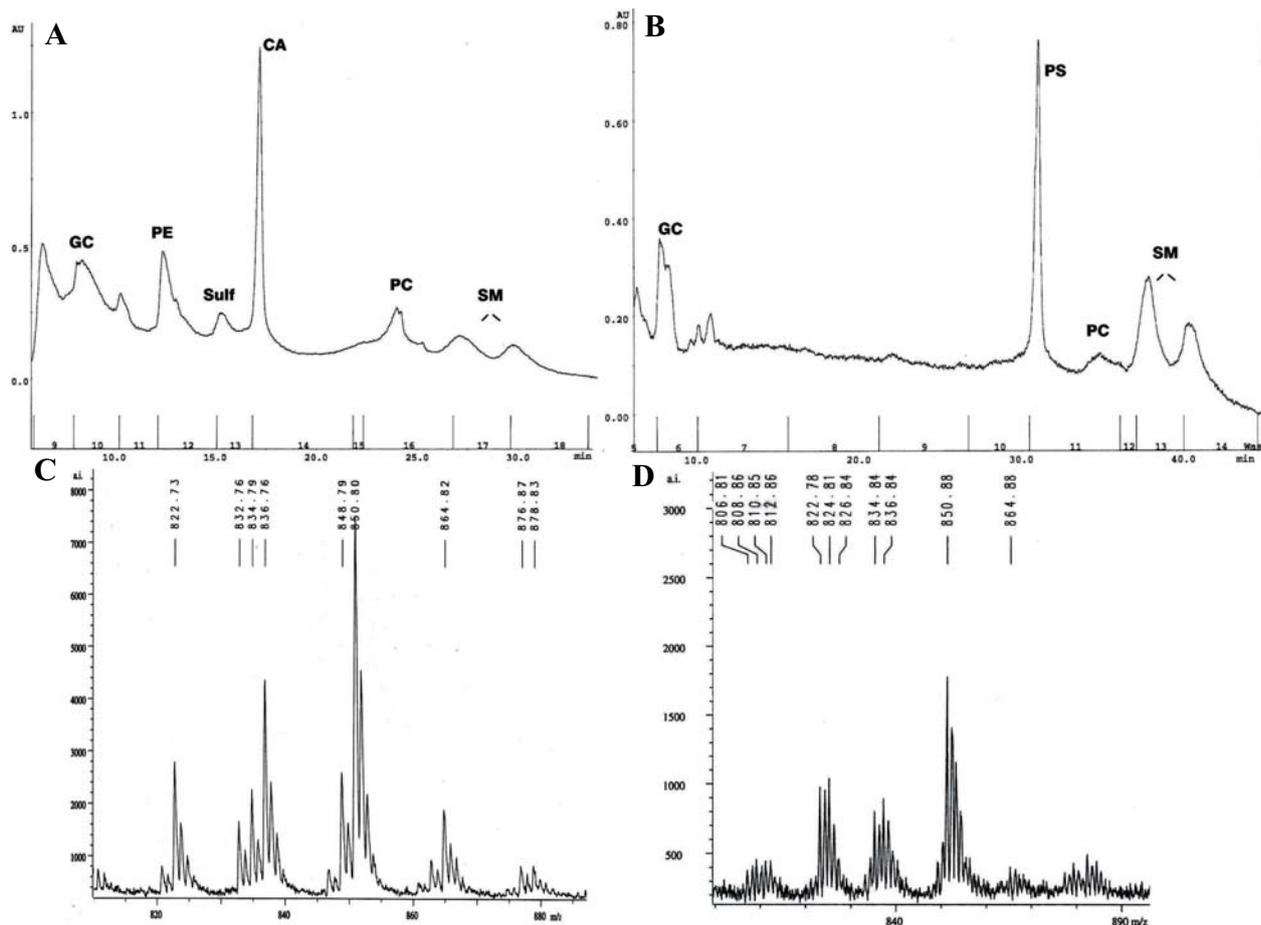


Abb. 3.13: Elutionsprofile polarer Membranlipide aus Lipidextrakten von *ex vivo* Amyloid-Proben. A und B: Y-Achse: UV-Detektion angegeben in AU = Absorptionseinheiten; X-Achse: Retentionszeiten in Minuten; A: L2 ($A\lambda$) und B: P6 (AA).. C und D: Y-Achse: Signalstärke angegeben in AI = „Artificial Intensity“; X-Achse: Masse in m/z. C: Massenspektrum von Galactocerebrosiden der gesammelten GC-Fraktion aus A. D: Massenspektrum von Galactocerebrosiden der gesammelten GC-Fraktion aus B.

Auffällig war jedoch das Vorkommen langer Fettsäuren (C26) in den Galactocerebrosid-Fraktionen, falls diese in den *ex vivo* Amyloid-Proben gefunden werden konnten (Abb. 3.13 C, D). Dies zeigte sich sowohl bei den Amyloid-Proben und den PHFs.

Diese Auffälligkeit kann durch einen Vergleich mit tierischen Lipidstandards, die leichte Unterschiede in der Fettsäurekonstellation der Phospho-, und Sphingo-Lipide zum Menschen aufweisen können, bedingt sein.

Nimmt man alle Literaturdaten zur Fettsäureverteilung des Menschen heran, so finden sich bei diesem Vergleich keine bestimmten Abweichungen. Interessant ist aber, dass in allen Sphingolipiden der analysierten Proben lange Fettsäuren vorkommen. Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese quantitativ häufiger in den Amyloid-Proben oder in „gesunden“ Geweben vorkommen. Tabelle 3.6 gibt einen Überblick über alle detektierten molekularen Spezies in den Amyloid-Proben. Zum Vergleich sind die analysierten Daten der Membranlipide der Lipidextrakte aus Schweinehirn und Rinderleber mit aufgeführt. Aufgrund

der heterogenen Signalintensität bei der Ionisierungsreaktion von MALDI-MS (siehe Kapitel 3.2.3) ist auf eine Angabe der relativen Intensitäten verzichtet worden.

Tabelle 3.6: MALDI-MS: Detektierte molekulare Spezies einzelner Lipidklassen

Detektierte molekulare Spezies einzelner Lipidklassen in den mit micro-HPLC und MALDI-MS analysierten Lipidextrakten von *ex vivo* Amyloid-Fibrillen und physiologischen Standards aus Schweinehirn und Rinderleber. Auf die Angabe relativer Intensitäten wurde verzichtet (siehe Kapitel 3.2.3).

	Porcines Hirn	Bovine Leber
Cholesterol	Chol-H ₂ O + H	Chol-H ₂ O + H
Galactocerebroside (GC)	C18:0 + Na C22:1 + Na C24:1 + Na C24:1-OH + Na C22:1-OH + Na	C18:0 + Na C18:0-OH + Na C18:1-OH + Na C24:1 + Na C24:2-OH + Na C22:1-OH + Na
Sulfatid (SU)	C24:3 + Na C26:6 + Na	C24:0-OH + Na
Phosphatidylethanolamin (PE)	C18:0/C18:2 Plasmalogen + H C18:0/C24:3 + Na C18:0/C22:4 + H C18:0/C20:4 + Na C18:0/C22:6 + Na	C18:0/C18:2 Plasmalogen + H C18:0/C20:4 Plasmalogen + H C18:0/C20:4 + Na C18:0/C22:6 + Na
Phosphatidylinositol (PI)	C18:0/C20:4 + H C16:0/C22:4 + Na C18:1/C22:6 + Na	C18:0/C20:4 + H C18:1/C20:4 + Na
Phosphatidylserin (PS)	C16:0/C20:2 + Na C18:0/C22:6 + H	C18:0/C20:4 + H C18:0/C22:4 + H C20:0/C22:2 Plasmalogen + H C18:0/C22:0 + H
Phosphatidylcholin (PC)	C16:0/C16:0 + Na C16:0/C16:0 + H C16:0/18:1 + H C16:0/20:4 + H C16:0/18:1 + Na	C16:0/C16:0 + H C16:0/C16:0 + Na C16:0/18:1 + H C16:0/20:4 + H C16:0/18:1 + Na
Sphingomyelin (SM)	C18:0 + Na C20:0 + Na C22:0 + Na C24:1 + Na C24:0 + K	C18:1 + Na C24:1 + Na

	L1 (AA)	L2 (AI)	L10 (Aλ)	L14 (Aλ)	L15 (AI)
GC		C22:0-OH + Na C24:0 + Na C24:0-OH + Na C26:0 + Na C26:1-OH + Na	C22:0-OH + Na C26:3-OH + H	C22:0-OH + Na C24:0 + Na C24:0-OH + Na C24:1 + Na C26:0 + Na C26:1-OH + Na	C18:0 + Na C18:0-OH + Na C22:0-OH + Na C24:1 + Na C26:4 + Na
SU		C24:0-OH + Na C24:3 + Na C26:6 + Na		C24:0-OH + Na C24:3 + Na C26:6 + Na	
PE		C18:0/C18:2 Plasmalogen + H C18:0/C20:4 Plasmalogen + H C18:0/C20:4 + Na			
PI	C18:0/C20:4 + H C18:1/C20:4 + Na C18:1/C22:6 + H		C18:0/C20:4 + H C16:0/C22:4 + Na C18:1/C22:6 + Na		
PS	C18:0/C20:4 + H C18:0/C22:4 + H C20:0/C22:2 Plasmalogen + H C20:0/C22:0 + H		C16:0/C16:0 + Na C18:0/C20:4 + H C18:0/18:1 + H + Na	C16:0/C16:1 + H C16:1/C18:2 + H C18:1/C18:2 + H	C16:1/C18:1 + H C16:0/C22:0 Plasmalogen + H C20:0/C22:1 Plasmalogen + H
PC	C16:0/C16:0 + H C16:0/C16:0 + Na C16:0/C18:1 + Na C18:1/C20:4 + H	C16:0/C16:0 + H C16:0/C16:0 + Na C16:0/18:1 + H C16:0/20:4 + H C16:0/18:1 + Na	C16:0/C16:0 + Na C16:0/18:1 + H C16:0/20:4 + H C16:0/18:1 + Na	C16:0/C16:0 + H C16:0/C18:2 + H C16:0/C18:1 + Na C18:1/C20:4 + H C18:0/C20:4 + H	C16:0/C16:0 + Na C16:0/C16:0 + H
SM	C18:0 + H C18:0 + Na C22:0 + Na C24:1 + H	DihydroSM C18 + Na C24:1 + H C24:0 + H C24:0 + Na	C18:0 + H C18:0 + Na C22:0 + Na C24:1 + H	C18:0 + Na C24:1 + H	C18:0 + Na C18:0 + K C24:1 + H

	P3 (AA)	P6 (AA)	P13 (Aλ)	P14 (Aλκ)	PHF
GC		C22:2-OH + H C24:0 + Na C26:0 + Na C26:2-OH + H	C22:2-OH + H C24:0 + Na C26:0 + Na C26:2-OH + H	C20:1 + Na C22:4-OH + H C24:2-OH + Na	C24:0 + Na C26:6 + Na C26:0-OH + Na C24:1 + Na C24:0-OH + Na
SU	C24:0-OH + Na C26:6 + Na				C24:0-OH + Na C24: 3 + Na C26: 6 + Na
PE				C18:6/18:6 + H C16:0/18:1 + Na C18:0/C20:2 + Na	
PS		C16:1/C18:1 + H C16:0/C22:0 Plas- malogen + H C20:0/C22:1 Plas- malogen + H	C16:0/C16:1 + H C16:1/C18:2 + H C18:1/C18:2 + H	C16:1/C16:0 + H C16:0/C16:0 + Na	
PC	C16:0/C16:0 + H C16:0/C16:0 + Na C16:0/C18:1 + Na C18:1/C20:4 + H	C16:0/C16:0 + N a	C16:0/C16:0 + Na C16:0/C18:1 + Na C18:1/C20:4 + H	C16:0/C16:0 + H C16:0/C16:0 + Na	C16:0/C16:0 + H C16:0/C18:2 + H C16:0/C18:1 + Na C18:1/C20:4 + H C18:0/C20:4 + H
SM	C18:0 + Na C24:1 + H	C18:0 + Na C24:1 + H	C18:0 + Na C24:1 + H	C24:2 + H C24:1 + Na	C24:1 + K C24:0 + Na

3.3.8 Zusammenfassung: *ex vivo* Amyloid-Fibrillen haben ein selektives Lipidmuster

Bei der Analyse von Gesamtlipidextrakten aus *ex vivo* Amyloid-Fibrillen konnte im Vergleich zu physiologischen Gesamtlipidextrakten aus Kontroll-Geweben ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dabei waren besonders die geringen Mengen der Membranlipide PC, PI und PS, sowie das vollständige Fehlen von PE in fast allen Proben auffällig. Dagegen konnten hohe Anteile an Sphingomyelin, Cholesterol und Cholesterol-Estern gefunden werden. Dieses Lipidmuster war in fast allen Proben der Serumsproteine unabhängig vom Fibrillenprotein nachzuweisen. Die PHF zeigten ebenfalls ein selektives, allerdings zu dem der Serums-Amyloid-Proteine abweichendes, Lipidmuster. In Kontrollexperimenten mit nicht-amyloidem Gewebe konnte gezeigt werden, dass sich das selektive Lipidmuster nicht durch die „Wasseraufreinigungsmethode nach Pras“ zur Extraktion von Amyloid-Fibrillen anreichert. Die Ergebnisse konnten mit zwei unabhängigen Methoden, DC und micro-HPLC mit MALDI-MS, bestätigt werden. Bei einer Analyse der molekularen Spezies der gefundenen Lipidklassen zeigten sich wenig Abweichungen in der Fettsäurekonstellation der gefundenen Lipidklassen in Amyloid-Proben zu Kontroll-Geweben.

4. Diskussion

Der Hauptbestandteil der bei Amyloidosen auftretenden Ablagerungen besteht aus Polypeptiden, die den Kern einer reifen Fibrille bilden. Lipide konnten als Bestandteil dieses Kerns ausgeschlossen werden. Dennoch lassen sie sich mit dem Fibrillenkern assoziiert finden und bilden mit anderen chemisch diversen Komponenten eine Art Mantel um den Kern. Wie Lipide in die Pathogenese der Amyloidosen involviert sind, gilt in vielen Punkten als noch ungeklärt. Um Hinweise auf eine Beteiligung dieser amphiphilen Molekülklassen am Amyloid-Fibrillen-Bildungsprozess und dessen Toxizität zu erhalten, wurden quantitative chemische Analysen von Lipiden an humanen *ex vivo* Amyloid-Fibrillen durchgeführt.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten humanen *ex vivo* Amyloid-Proben wurden von kooperierenden Wissenschaftlern aufgereinigt. 30 Proben von 4 verschiedenen Amyloid-Proteinen wurden nach der „Wasseraufreinigungsmethode nach Pras“ aus von Amyloidosen betroffenem Gewebe aufgereinigt. Eine Probe von „paired helical filaments“ wurde mit Immunoaffinitätsreinigung extrahiert. Die Ergebnisse wurden in drei Bereiche: Proteinanalytik, Methodenentwicklung und Lipidanalytik der *ex vivo* Amyloid-Fibrillen untergliedert.

Im ersten Teil konnten das erhaltene Material als Amyloid klassifiziert werden, dessen Hauptbestandteil Amyloid-Fibrillen aus einem spezifischen Fibrillenprotein sind. Es zeigte sich, dass das aufgereinigte Material nicht nur aus Protein besteht, sondern noch weitere Komponenten mit aufgereinigt wurden.

Im zweiten Teil wurden Lipidanalysemethoden etabliert, die eine genaue und vollständige Bestimmung aller Lipidkomponenten in den *ex vivo* Amyloid-Fibrillen erlaubten.

Im dritten Teil, der Lipidanalyse des amyloiden Materials, konnte ein selektives Lipidmuster gefunden werden, das sich von Lipidkonstellationen „gesunder“ Kontroll-Gewebe unterscheidet. Auffällig waren der geringe Wert an PE und PC. Dahingegen konnten in den Proben der Serumsproteine (AA, AL, ATTR und A β _{2m}) hohe Werte an Cholesterol und Cholesterol-Estern sowie Sphingomyelin nachgewiesen werden. Die Analyse der „paired helical filaments“ (PHF) zeigte ebenfalls ein selektives, allerdings von dem der Serumsproteine abweichendes, Lipidmuster. Unterschiede gab es in Bezug auf das PC zu SM Verhältnis, das vergleichbar zu dem in physiologischen Gesamtlipidextrakten war. In den PHF konnten zudem keine Cholesterol-Ester gefunden werden.

Die Diskussion der vorliegenden Arbeit orientiert sich an der Untergliederung aus dem Ergebnisteil. Zudem wird die Frage nach der pathologischen Relevanz des gefundenen Lipidmusters gestellt.

4.1 Die *ex vivo* Amyloid-Fibrillen repräsentieren die nach heutigem Stand der Technik extrahierbaren fibrillären Bestandteile von Amyloid-Geweben

Bei der Erforschung der Amyloidosen wurden verschiedene Strategien zur Isolation von Amyloid-Fibrillen angewandt, um die eigentliche chemische Natur der Ablagerungen zu identifizieren. In der Klinik werden Isolationstechniken für Amyloid-Fibrillen nach Diagnose einer Amyloidose dann eingesetzt, wenn mittels immunologischer Techniken keine Aussage über das der Krankheit zugrunde liegende, pathogene Fibrillenprotein gemacht werden kann. In isolierten Fibrillen kann dann das Fibrillenprotein charakterisiert werden. Es lassen sich dabei grob drei Strategien abgrenzen:

1. Methoden, die sich die chemischen Eigenschaften der Amyloid-Fibrillen zu nutze machen und über Solubilisierungsverfahren und Dichtezentrifugation die Fibrillen von anderen Gewebebestandteilen trennen (Cohen und Calkins, 1964, Pras *et al.*, 1968).
2. Verfahren, die zusätzlich zu den Dichtezentrifugationsschritten Proteinrückstände mit Proteinasen, von proteinaseresistenten Fibrillen, verdauen (Prionenaufreinigung, Prusiner, 1982).
3. Immunoaffinitätsreinigungsmethoden, die abhängig davon sind, ob ein spezifischer monoklonaler oder polyklonaler Antikörper gegen die Proteinfibrillen generiert werden kann. Im Falle der PHF kann ein solcher Antikörper spezifisch die TAU-Fibrillen erkennen, da er zwischen der physiologischen Variante des TAU-Protein und der unlöslichen Fibrillenform, in der das Protein hyperphosphoryliert vorliegt, unterscheiden kann (Vincent und Davies, 1992).

Eine Methode, alle Arten von Amyloid-Fibrillen aufzureinigen, ist die „Wasseraufreinigungsmethode nach Pras“ (Pras *et al.*, 1968). Diese relativ einfache und elegante Prozedur wird auch heute noch in Klinik und Forschung angewandt. In dieser Arbeit konnten 30 Amyloid-Proben, die von der Arbeitsgruppe von Prof. Linke und von der Arbeitsgruppe von Prof. Pras nach dieser Methode aufgereinigt wurden, analysiert werden.

Die Proteinkomponente in diesen, und der immunoaffinitätsaufgereinigten PHF-Probe, wurde charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass sowohl durch die Wasseraufreinigungsmethode als auch die Immunoaffinitätsreinigung das kongorotbindende Agens der Ablagerungen extrahiert wurde. Die Wasseraufreinigungsmethode wird als Methode bezeichnet, die Amyloid-Fibrillen auch für elektronenmikroskopische Studien aus amyloidhaltigem Gewebe anreichert (Pras *et al.*, 1969). Dies konnte für einige der erhaltenen Proben nicht nachvollzogen werden. Der Grund dafür ist wahrscheinlich nicht die Abwesenheit fibrillärer Strukturen in diesen Proben, sondern dadurch bedingt, dass einige Proben nach Lyophilisation und langer Lagerung den elektronen-

mikroskopischen Visualisierungstechniken nicht mehr zugänglich gemacht werden konnten (Ergebnisse Tabelle 2.3).

In den aufgereinigten Amyloid-Proben der Serumsproteine beider Wissenschaftler (Linke und Pras) zeigten sich in einigen Proben noch sehr geringe Spuren anderer Proteinbestandteile neben dem Fibrillenprotein. Diese hätten sich eventuell mit anderen Aufreinigungsstrategien, wie z. B. einem Proteinaseverdau, entfernen lassen. Es ist jedoch durch solch einen Schritt nicht auszuschließen, dass auch das eigentliche amyloide Material bei einer Vielzahl von Fibrillenproteinen in Mitleidenschaft gezogen würde (Nelson *et al.*, 1991; Eulitz und Linke, 1985). Die Wasseraufreinigungsmethode lässt sich zur Extraktion aller Amyloid-Fibrillen verwenden. In einigen Fällen kann aber eine vergleichbar reine Präparation, wie sie bei „prion rods“ (Prion-Fibrillen) durch Proteinaseverdau (Prusiner *et al.*, 1982), erhalten wurde, mit der Wasseraufreinigungsmethode nicht immer erzielt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das humane *ex vivo* Amyloid-Material Amyloid-Fibrillen spezifischer Fibrillenproteine repräsentiert. Zum Teil wurden einige der erhaltenen Amyloid-Proben in Publikationen schon beschrieben (Tabelle 2.1). Auch nach langer Lagerung des amyloiden Materials konnten die meisten der beschriebenen Eigenschaften des Amyloids beobachtet werden.

4.2 In den *ex vivo* Amyloid-Proben sind neben der proteinösen Hauptkomponente Nebenkomponenten enthalten

Um die Pathogenese der Amyloidosen zu verstehen, ist es von Interesse, die chemische Zusammensetzung zu kennen. Die Proteinase-resistenten „prion rods“ sind die bis heute am genauesten auf ihre molekulare Zusammensetzung hin analysierten Amyloide. Lange stand bei den Prionen-Krankheiten zur Debatte, ob die Infektiosität alleine der Proteinkomponente zuzuschreiben ist. Es zeigte sich, dass nur wenige Nukleinsäuren als Bestandteil von Prionen in Frage kommen (Riesner, 1991; Kellings *et al.*, 1994). Jedoch beinhalten die aufgereinigten „prion rods“ 1 bis 2 % Sphingolipide und 10 % eines nicht kovalent gebundenen Kohlenhydratgerüst (Klein *et al.*, 1998; Appel *et al.*, 1999). Für die intrazellulären PHF konnte eine Assoziation mit Glycolipiden und Glycosaminoglycanen bei nur 20 bis 40 % Proteinanteil gezeigt werden (Goux, *et al.*, 2001). Auch AA und AL Amyloid-Fibrillen setzen sich aus mehr als nur Protein zusammen. (Snow und Kisilevsky, 1985). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *ex vivo* Amyloid-Fibrillen beinhalten neben dem Protein noch weitere Komponenten. So schwankte der Proteingehalt in den analysierten Proben zwischen 50 und 90 %. Dies deutet auf das Vorkommen nicht-proteinöser Komponenten, die mit den Amyloid-Fibrillen assoziiert vorliegen, hin.

4.3 Die etablierten Lipid-Analysemethoden werden den an sie gestellten Anforderungen für eine Analyse einzigartiger Proben gerecht

Das humane Probenmaterial war einzigartig und nur im Mikromaßstab vorhanden. Eine für diese Arbeit typische Probe zur Lipidanalyse bestand aus rund 1 mg Amyloid-Fibrillen. Es waren also Methoden zu entwickeln, die bei einem möglichem Lipidanteil von nur 1 % in der Lage sind, ein solches komplexes Lipidgemisch reproduzierbar quantitativ zu analysieren.

Beim Umgang mit kleinsten Lipidmengen, wie sie aus den Amyloid-Proben extrahiert wurden, sind eine Reihe von Vorsichtsmaßnahmen zu beachten, um Verluste durch Oberflächenadsorption und Kontaminationen zu vermeiden. Dies konnte durch die Verwendung von Glasgefäßen und speziell angefertigter Glaszentrifugenröhrchen sowie Hamiltonspritzen für die Pipetierschritte erreicht werden. Die Lipide konnten vom im Überschuss vorhandenem Protein mit zwei Methoden, 1. direkt mit Chloroform/Methanol oder 2. mit Chloroform/Methanol/KCL (Bligh und Dyer, 1959), empirisch vollständig extrahiert werden.

Natürliche Lipidgemische sind komplex. Säuger-Gewebe können in unterschiedlicher Zusammensetzung aus Lipidenklassen aller drei Lipidgruppen bestehen, d. h. aus Phospho-, Sphingo- und unpolaren Lipiden. Jede der Lipidklassen außer Cholesterol setzt sich aus bis zu 30 molekularen Spezies zusammen, die sich in den enthaltenen Fettsäuren unterscheiden. Natürlich vorkommende Fettsäuren besitzen eine gerade Anzahl von Kohlenstoffatomen (14 bis 26) und enthalten oft mehrere Doppelbindungen. Aus der Kombination dieser Merkmale resultiert eine hohe Variabilität, zumal bei den Phospholipiden, die zwei Fettsäuren je Molekül enthalten.

Dünnschichtchromatographie trennt alle Lipidklassen. Natürliche Lipidgemische lassen sich nach chromatographischer Trennung der Lipidklassen analysieren. Die hochauflösende Dünnschichtchromatographie auf SiO₂-beschichteten Glasplatten trennt alle Lipidklassen aus Hirngeweben (Macala *et al.*, 1983; Yao und Rastetter, 1985). Dieses Verfahren konnte so optimiert werden, dass es sich auf alle in natürlichen Geweben vorkommende Lipide anwenden lässt. In einem eindimensionalen chromatographischen Entwicklungslauf mit drei Laufmitteln konnten bis zu 17 Lipidklassen gleichzeitig getrennt werden. Dabei hilft eine 2,5 cm breite Vorkonzentrierungszone der industriell beschichteten Platten, die das Auftragen der Proben erleichtert und zur Fokussierung der Lipidbanden dient. Weitere Verfahrensverbesserungen, wie eine Auftragsschablone, Halterungen für die DC-Platten während der Entwicklung und ein neues Lösungsmittelgemisch aus 1,2-Dichlorpropan/1-Propanol im Verhältnis 2:1, sorgen für eine einfache standardisierte Durchführung der Methode.

Die mit DC getrennten Lipidklassen lassen sich quantifizieren. Die höchste Detektionsempfindlichkeit für die getrennten Lipidklassen wurde durch Tauchung der DC-Platten in ein Bad aus

Kupfersulfat und Phosphorsäure (Bitman und Wood, 1982) mit nachträglicher Erwärmung für ca. 8 Minuten auf 170°C erreicht. Die durchschnittliche Nachweisgrenze lag bei unter 30 ng pro Lipidklasse. Durch reflektionsdensitometrische Auswertung der gefärbten Banden können einzelne Lipidklassen eines Gesamtgemischs quantifiziert werden. Dazu wurden Lipidstandards aus bis zu 17 einzelnen Lipidklassen gleicher Konzentration verwendet. Die Auftragsschablone und die Verwendung von 10 cm x 20 cm DC-Platten ermöglichten eine standardisierte und quantitative Auswertung mittels sieben verschiedener Konzentrationen des gemischten Lipidklassenstandards.

Damit war eine Methode etabliert, um alle Lipidklassen in 200 ng bis 2 µg eines natürlichen Lipidgemisches quantitativ zu bestimmen. Die Verwendung des Lipidstandards aus 17 Lipidklassen erlaubt darüber hinaus auch Anwendungen auf Lipidgemische prokaryontischer Spezies. Auf Basis dieser Methode wurde eine Applikationsbroschüre für einen Lipidanalysekit ausgearbeitet (Appel *et al.*).

Mit MALDI-MS können molekulare Spezies einzelner Lipidklassen analysiert werden. Die Lipidklassen eines Lipidgemisches können mit hochauflösender DC analysiert werden, jedoch nicht ihre molekularen Spezies. Eine Methode, um diese zu analysieren, ist Matrix-assistierte Laserdesorption/Ionisierungs-Massenspektrometrie (MALDI-MS). Die Anwendung von MALDI zur direkten Analyse von komplexen Lipidgemischen ist schwierig, da die meisten der polaren Lipidklassen im Massenbereich von 750 bis 920 m/z liegen. In der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass verschiedene polare Lipidklassen Unterschiede in der MALDI-Ionenausbeute haben. So unterdrückt die Anwesenheit geringer Mengen Phosphatidylcholin einen Nachweis von Phosphatidylethanolamin. Deswegen ist eine vorherige chromatographische Trennung empfehlenswert. Die Anwendbarkeit von MALDI-MS auf vorher chromatographisch getrennte Lipidklassen im Mengenbereich von 10 bis 100 ng je Lipidklasse ist möglich (Harvey, 1995a, b).

Zur präparativen Trennung der Lipidklassen wurde HPLC im Mikromaßstab verwendet. Es wurde eine Normalphase (DIOL modifiziertes Kieselgel-100 mit 5 µm sphärischen Partikeln in einer 1,0 mm x 150 mm Säule) mit einem binären Elutionsgradienten verwendet (Olsson *et al.*, 1996). Die Verluste auf der HPLC-Säule bei kleinen Lipidmengen, wie sie in Amyloid-Proben zu finden sind, ist nicht zu vernachlässigen, konnte jedoch auf 10 bis maximal 20 % begrenzt werden. Problematisch ist die Detektion kleiner Lipidmengen nach HPLC. Die UV-Absorption der Lipide ist gering und hängt von der schwankenden Anzahl an Doppelbindungen in den Fettsäuren ab. Mit der verwendeten microHPLC konnten trotzdem auch Lipidgemische im Bereich der Nachweisgrenze präparativ fraktioniert werden, um sie mit MALDI-MS zu analysieren.

Die Nachweisgrenze für einzelne Lipidklassen konnte bei MALDI-MS gesenkt werden. Bei MALDI-MS von Lipiden ist die Präparationstechnik und Wahl der geeigneten Matrix entscheidend für die Nachweisgrenze und das Signal-Rauschverhältnis. Als geeignetste Matrix erwies sich 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Methanol mit 0,1 % Triofluoressigsäure (Schiller *et al.*, 1999) aufgetragen auf einen Platinprobenteller. Eine „add on“-Präparation, bei der die Analytensubstanz in 2:1 Chloroform/Methanol auf die getrocknete Matrix gegeben wird, bettet die Analyten in hoher Konzentration für die Ionisierungsreaktion an der Oberfläche der Auftragstelle in die Matrix ein. Da nur die Oberfläche bei der Ionisierungsreaktion durch den Laserimpuls abgetragen und analysiert wird, resultiert eine Verbesserung der Empfindlichkeit der Methode. Die Nachweisgrenze konnte mit diesem System bei einem Signal-Rauschverhältnis von 4:1 für einzelne Lipidklassen 10 bis 100fach zu Literaturangaben verbessert werden (Ergebnisse Tabelle 3.4).

Die Massenspektrometrie mit modernen, weichen Ionisierungsquellen eignet sich für eine hoch empfindliche Detektion der Analyten, jedoch ist eine quantitative Aussage, bedingt durch unterschiedliche Effizienz der Ionenbildungsprozesse, schwierig. Für ESI-MS konnte eine Quantifizierung einzelner Lipidklassen mittels mehrerer gesättigter und ungesättigter interner Standards gezeigt werden (Koivusalo *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass dies auch für MALDI-MS möglich ist, jedoch nur unter hohem experimentellem Aufwand und unter Verwendung mehrere synthetischer interner Standards, die zu jeder Probe gesättigt und ungesättigt hinzugegeben werden müssen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwei empfindliche Methoden zu Lipidanalyse von kleinsten Mengen natürlicher Lipidgemische etabliert werden konnten. DC erlaubt dabei eine quantitative Bestimmung einzelner Lipidklassen in Lipidgemischen, wie sie in *ex vivo* Amyloid-Fibrillen zu finden sind. Mit microHPLC und MALDI-MS können polare Lipidklassen präparativ getrennt und ihre molekularen Spezies analysiert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich diese Methode auch für quantitative Aussagen nutzen lässt.

4.4 Die in *ex vivo* Amyloid-Fibrillen gefundene Lipidkonstellation unterscheidet sich zu der von physiologischen Geweben

Natürlich vorkommende Gewebetypen der Säugetiere haben eine charakteristische Lipidkonstellation. Sie kann zwischen den Arten leicht unterschiedlich sein. Die Fettsäurekonstellation und in eingeschränkterem Maße auch die Lipidklassenverteilung kann durch die Art der Nahrung (z. B. Diäten, gesättigte oder ungesättigte Öle, vegetarische Lebensweise), aber auch durch Krankheiten beeinflusst werden (Gurr, 1992; Willett *et al.*, 1993). Trotzdem gibt es

gewebe- und membranspezifische Grundmuster bei der Lipidklassenverteilung. In Abbildung 4.1 sind aus der Literatur übernommene charakteristische Lipidverteilungen für die membranbildenden Phospholipide, in verschiedenen Geweben und subzellulären Fraktionen einzelner Membrantypen angegeben. Der Phospholipidgehalt der in dieser Arbeit untersuchten Probe der Rinderleber ist mit aufgeführt. Die gefundenen Werte sind in guter Übereinstimmung mit den Literaturdaten (Maximalabweichung weniger als 4 %), was die Genauigkeit der im vorherigen Kapitel diskutierten Analysemethoden belegt.

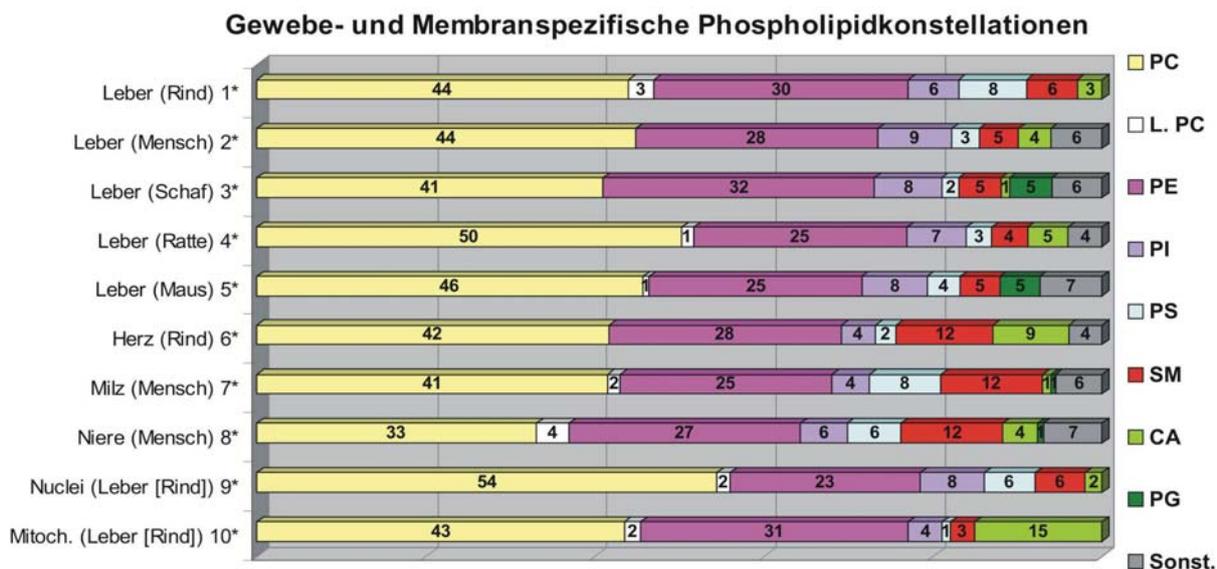


Abb. 4.1: Natürlich vorkommende Gewebetypen und Membranen haben eine charakteristische Phospholipidkonstellation.

Die Werte sind in Prozent des Gesamtphospholipidgehalts gerundet angegeben (in einigen Literaturangaben wurden die Werte auf eine oder zwei Dezimale angegeben). **Mitoch.:** Mitochondrien, **PC:** Phosphatidylcholin, **L. PC:** Lyso-Phosphatidylcholin, **PE:** Phosphatidylethanolamin, **PI:** Phosphatidylinositol, **PS:** Phosphatidylserin, **SM:** Sphingomyelin, **CA:** Cardiolipin, **PG:** Phosphatidylglycerol, **Sonst.:** Sonstige und nicht definierte, beinhaltet alle nicht identifizierten und angegebenen Werte unbestimmter Lipidklassen. (Plasmalogene sind nicht separiert mit aufgeführt, sondern in den Werten für PC und PE enthalten. Rechts angegeben sind die mit Sternchen versehenen Referenzen: 1* eigene Messung; 2*, 7*, 8* Rouser *et al.*, 1967; 3* Scott *et al.*, 1967; 4* Wuthier, 1966; 5* Simon und Rouser, 1969; 6* Dawsen *et al.*, 1962; Rouser *et al.*, 1967; 9* Keenan *et al.*, 1970; 10* Colbeau *et al.*, 1971.

Generell haben alle Säugetiergewebe qualitativ die gleichen Phospholipide. Auch wenn es quantitative Unterschiede gibt, so sind die verschiedenen Gewebe und Membranen bei den Säugern in ihrem Aufbau ähnlich, wobei PC und PE dominieren.

Vergleicht man dagegen die Phospholipidkonstellation in den *ex vivo* Amyloid-Proben, so fallen signifikante Unterschiede auf. Bemerkenswert ist dabei die prozentuale Verschiebung zugunsten von Sphingomyelin in den Proben der Serumsproteine. PE fehlt in fast allen Amyloid-Proben vollkommen. Auch die Werte an PC sind deutlich geringer im Vergleich zur Phospholipidkomposition der Gewebe. In Abbildung 4.2 sind die Lipide aus fünf Aufreinigungen der amyloiden Serumsproteine mit den PHF und physiologischen Lipidkompositionen aus dem Ursprungsgewebe verglichen.

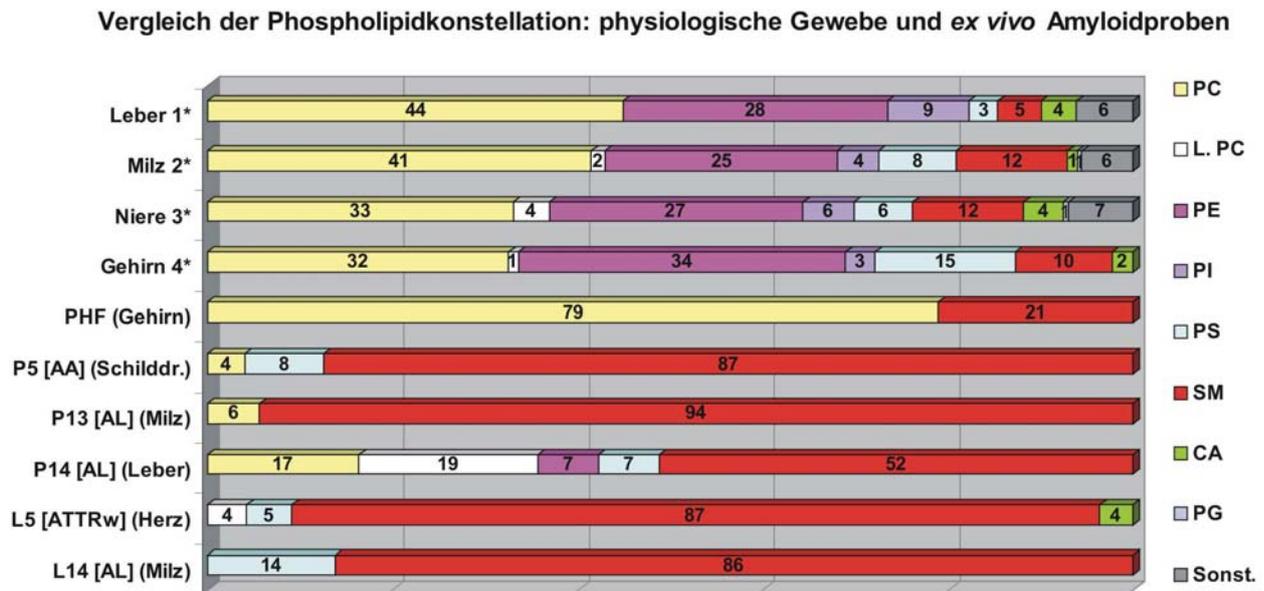


Abb. 4.2: Phospholipidkonstellation der ex vivo Amyloid-Proben und physiologischer Gewebe.

Die Werte sind in Prozent des Gesamtphospholipidgehalts gerundet angegeben. PC: Phosphatidylcholin, L. PC: Lyso-Phosphatidylcholin, PE: Phosphatidylethanolamin, PI: Phosphatidylinositol, PS: Phosphatidylserin, SM: Sphingomyelin, CA: Cardiolipin, PG: Phosphatidylglycerol, Sonst.: Nicht definierte Lipidklassen. Referenzen: 1*, 2*, 3*: Rouser *et al.*, 1967, 4*: O'Brien und Sampson, 1965.

4.5 Die Signifikanz der gefundenen Lipidmuster

Eine effektive Analyse der Lipide aus Geweben ist in erster Linie von einer quantitativen Extraktion und Beseitigung nicht lipider Komponenten sowie den Analysetechniken abhängig (Waite, 1987). Wie im Ergebnisteil und in der Diskussion aufgeführt, sind die in der vorliegenden Arbeit etablierten komplementären Lipidanalysemethoden ausreichend sensitiv, um vorhandene Lipide auch im unteren Nanogrammbereich zu analysieren. Vergleicht man die Lipidkonstellationen der untersuchten physiologischen Gewebe mit Literaturdaten, so sind die Abweichungen bei unter 5 %. Es ist also davon auszugehen, dass die Unterschiede im Lipidmuster der Amyloid-Proben keine Artefakte der Analysemethoden sind.

Bei Kontrollversuchen zur Wasseraufreinigungsmethode mit nicht von Amyloidosen befallenem Gewebe zeigte sich, dass durch die dabei verwendeten Homogenisierungs- und Zentrifugationsschritte das gewebespezifische Lipidmuster nicht angereichert wird. Das vollständige gewebespezifische Lipidmuster lässt sich während der Reinigungsschritte an „gesundem“ Gewebe in abnehmendem Maße detektieren, ist jedoch abwesend in den Fraktionen, die bei betroffenem Amyloid-Gewebe die Amyloid-Fibrillen enthalten würden. Dies spricht für eine selektive Assoziation der gefundenen Lipidklassen mit den ex vivo Amyloid-Fibrillen.

Die Möglichkeit einer selektiven Assoziation einzelner Lipidklassen mit Fibrillen wird zusätzlich durch das Vorkommen eines ebenfalls, jedoch von dem der Serumproteine abweichenden, selektiven Lipidmusters in den PHF untermauert.

4.5.1 Lipide sind anfällig gegen verschiedene Degradationsprozesse.

Vor allem die Phospholipide mit ihren ungesättigten Fettsäuren sind davon betroffen. Dabei gibt es verschiedene Mechanismen: 1. Hydrolyse, 2. Oxidation und 3. enzymatische Spaltungen durch z. B. Phospholipasen (Grit und Crommelin, 1993).

1. *Hydrolyse*: In Phospholipiden gibt es drei Arten von Bindungen: C-C-, Ester- und Phosphoesterbindungen. Die beiden Fettsäure-Esterbindungen sind am anfälligsten gegen Hydrolyse (Preobrazhenskii und Evstigneeva, 1976). Plasmalogene mit nur einer estergebundenen Fettsäure und einer Enoletherbindung sind gegen Hydrolyse etwas resistenter, dagegen anfälliger gegen Oxidation (Kensil und Dennis, 1981; Maeba und Ueta, 2003). Vor allem Temperatur und pH-Wert haben einen großen Einfluss auf die Kinetik der Hydrolyse (Grit *et al.*, 1993). In ihrer natürlichen Umgebung bei pH 7 sind Phospholipide am stabilsten und Hydrolyse der Esterbindung tritt in keinem signifikanten Maß auf (Evstigneeva *et al.*, 1983).

2. *Oxidation*: Lipide neigen zudem auch zur Oxidation. Phospholipide mit ungesättigten Fettsäuren sind vor allem betroffen und unter Einfluss von Luftsauerstoff können Autooxidationsprozesse ablaufen. Dabei bilden sich Hydroperoxide, in deren Begleiterscheinung Acylketten-Wanderung und Stereomutationen der Doppelbindungen auftreten. Die gebildeten Hydroperoxide unterlaufen weiter Transformationen, bei denen sich kleine Moleküle oder auch durch Dimerisation Komplexe höheren Molekulargewichts bilden können (Gunstone *et al.*, 1986). Esterbindungen können auch mit Superoxiden reagieren, was bei Phospholipidmembranen zur Freisetzung von Fettsäuren führt (McKersie *et al.*, 1990).

3. *enzymatischer Verdau*: Die dritte Möglichkeit einer Lipolyse ist der enzymatische Verdau. Unter physiologischen Bedingungen kann die Etherbindung der Phospholipide leicht mit entsprechenden Enzymen gespalten werden (Chapman, 1969). Es gibt vier Arten von Phospholipasen mit hoher Region- und Stereoselektivität: Phospholipase A₁, A₂, C und D. Phospholipase A₁ hydrolysiert die Esterbindung an C-1 und Phospholipase A₂ die Esterbindung an C-2 in allen natürlich vorkommenden Phospholipiden inklusive der Plasmalogene (Waite M. 1987). Die Struktur der hydrophilen und hydrophoben Hälften scheint dabei keinen Effekt auf die Enzymspezifität zu haben, bestimmt aber die Hydrolyserate (van Oort *et al.*, 1985).

Langzeitversuche zur Stabilität der Lipide: In Langzeitversuchen zur Stabilität der Lipide zeigte sich, dass besonders PE von Degradationsprozessen betroffen ist. Das untersuchte bovine PE (Sigma, Deisenhofen) besteht zu 60 % aus Plasmalogen. Dieses scheint anfällig gegen Oxidation zu sein, wobei die Enoletherbindung gespalten und eine Fettsäure freigesetzt wird (Ergebnisse Abb. 3.12). Gleichermäßen ist auch Lecitinplasmalogen betroffen, das aber in der untersuchten Probe (bovines Hirn-PC, Sigma Deisenhofen) nur in geringen Mengen vorkommt. Die

gebildeten Lyso-Formen, Lyso-PE und Lyso-PC, hatte in den Versuchen die gleiche Stabilität wie die anderen Phospholipide. Ob einzelne Phosphoesterlipide von Oxidationsprozessen und Hydrolyseprozessen stärker als andere betroffen sind, ist nicht ersichtlich. Sphingolipide zeigen dagegen mit den geringsten Abbau, da sie nur eine Fettsäure neben der Sphingosinbase haben. Bei der Analyse eines Rattenhirnlipidextrakts, der aus 5 Jahre gelagerten Hirnen extrahiert und 3 Monate Oxidationsprozessen zugänglich war, zeigte sich, dass hauptsächlich die Plasmalogene die in nennenswertem Maßstab nur in Hirngewebe vorkommen degradiert waren. Es ließen sich Lyso-PE und Lyso-PC nachweisen.

4.5.2 Der Einfluss von Degradationsprozesse auf die Amyloid-Proben

Die Amyloid-Fibrillen wurden ursprünglich für eine Charakterisierung der Proteinkomponenten aufgereinigt. Das Gewebe wurde innerhalb 24 Std. *post mortem* entnommen und bis zur Extraktion der Amyloid-Fibrillen eingefroren. Nach Extraktion der Fibrillen wurden die wasseraufgereinigten Proben der Serumsproteine lyophilisiert und bis zu 20 Jahre in Polyethylentubes gelagert. Die PHF wurden frisch nach Extraktion in Natriumphosphatpuffer eingefroren, versandt und sofort einer Lipidanalyse unterzogen. Die analytischen Arbeiten wurden für alle Proben unter entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen innerhalb von maximal drei Tagen durchgeführt.

Die lange gelagerten lyophilisierten Proben zeigten ein trockenes und kristallines Aussehen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Proben kleine Mengen Feuchtigkeit anzogen und es vereinzelt zu Oxidation oder Hydrolyse der Lipide in den Polyethylentubes kam. Das Vorkommen von Degradationsprodukten, wie freie Fettsäuren und in einigen Proben Lyso-PC, über die in natürlichen Geweben vorkommende Menge hinaus deutet auf diese Möglichkeit hin. Diese Stoffe können sich auch unter Einfluss von Phospholipasen bilden. Phospholipasen kommen in allen Geweben vor. Durch die Aufreinigung der Amyloid-Fibrillen sollten sie weitestgehend entfernt worden sein. Es ist aber nicht auszuschließen, dass sie in den Geweben vor der Fibrillenextraktion aktiv waren.

Die Oxidationsprodukte von Plasmalogen-PC sind Lyso-PC und freie Fettsäure. Diese konnten in einigen Proben verstärkt detektiert werden. Lyso-PC kann aber auch durch Hydrolyse, die vermutlich alle Phospholipide in gleichem Maß betrifft und somit keinen Einfluss auf das selektive Lipidmuster hat, entstanden sein.

Die Degradationsprodukte von Plasmalogen-PE und diacyl-PE sind Lyso-PE und freie Fettsäure. Lyso-PE läuft im verwendeten DC-System auf fast gleicher Höhe von PS und kann nur schwer unterschieden werden. Allerdings konnten in den Amyloid-Proben keine außergewöhnlich hohen Werte an PS, die PE-Abbau und Fehlinterpretation bei der qualitativen DC zur Grundlage gehabt

haben könnten, gefunden werden. Auch bei einer Überprüfung der PE und PS Fraktionen mit micro-HPLC und MALDI-MS konnte kein Lyso-PE detektiert werden.

Ein vollständiger selektiver Abbau einer einzelnen Lipidklassen in einem Lipidgemisch ist in der mir zugänglichen Literatur nicht beschrieben. Oxidative Prozesse, die vor allem ungesättigte Fettsäuren angreifen, scheinen den Lipiden in den Proben nicht übermäßig zugesetzt zu haben. Mit MALDI-MS konnten molekulare Spezies mit hoher Anzahl an Doppelbindungen und langen Fettsäuren nachgewiesen werden. Dies spricht für die Abwesenheit von PE in den *ex vivo* Amyloid-Proben, auch wenn vereinzelt Degradationsprozesse nicht ausgeschlossen werden können.

4.5.3 Bei dem gefundenen Lipidmuster handelt es sich um einen selektiven Effekt der mit den aufgereinigten ex vivo Amyloid-Fibrillen assoziiert ist

Der Nachweis des Lipidmusters in fast allen untersuchten Proben der amyloiden Serumsproteine zeigt, dass die selektive Vergesellschaftung der Lipide mit den Amyloid-Fibrillen vom Fibrillenprotein unabhängig ist. Zudem konnten auch in Prion-Fibrillen Sphingolipide angereichert gefunden werden (Klein *et al.*, 1998). Die Analyse von extrahierten Amyloid-Fibrillen mit AA und AL Amyloidosen aus Gelenken von Hühnern zeigte ebenfalls das beschriebene Lipidmuster reich an Sphingomyelin und Cholesterol (persönliche Mitteilung T. Appel). Zudem spricht der Nachweis der nicht gewebespezifischen Cholesterol-Ester in den Amyloid-Proben der Serumsproteine dafür, dass einzelne Lipidklassen selektiv mit Amyloid-Fibrillen assoziiert sein können. Es scheint sich hierbei um ein generelles Phänomen zu handeln.

Das gefundene selektive Lipidmuster, das in fortgeschrittenen Amyloidosen zum Zeitpunkt des Todes mit den Fibrillen vergesellschaftet war, deutet auf eine selektive Rolle dieser Lipidklassen in der Pathogenese der untersuchten Amyloidosen hin. Es gibt grundsätzlich zwei Prozesse, durch die Lipide an Amyloid-Fibrillen anhaften können: 1. Bei der Bildung einer Fibrille können Lipide nicht-kovalent gebunden und in die Ablagerung mit eingeschlossen werden oder 2. nach Bildung einer Fibrille, während der von ihr ausgelösten Pathogenese, an diese anhaften.

4.6 Das mit Amyloid-Fibrillen assoziierte Lipidmuster deutet auf eine Rolle von „lipid rafts“ bei der Pathogenese der Amyloidosen hin

Die in den Amyloid-Proben gefundenen Phospholipidkonstellationen sind nicht gewebe- oder membranspezifisch. Um Aussagen über den Ort der Pathogenese treffen zu können, müssen alle in Membranen vorkommenden Lipide betrachtet werden. Abbildung 4.3 zeigt die Verteilungen membranbildender Lipide (Cholesterol, Phospho- und Sphingolipide) der Amyloid-Proben und physiologischer Gewebe. Die nicht membranbildenden Cholesterol-Ester, die zusätzlich in den *ex vivo* Amyloid-Proben detektiert wurden, werden später gesondert behandelt.

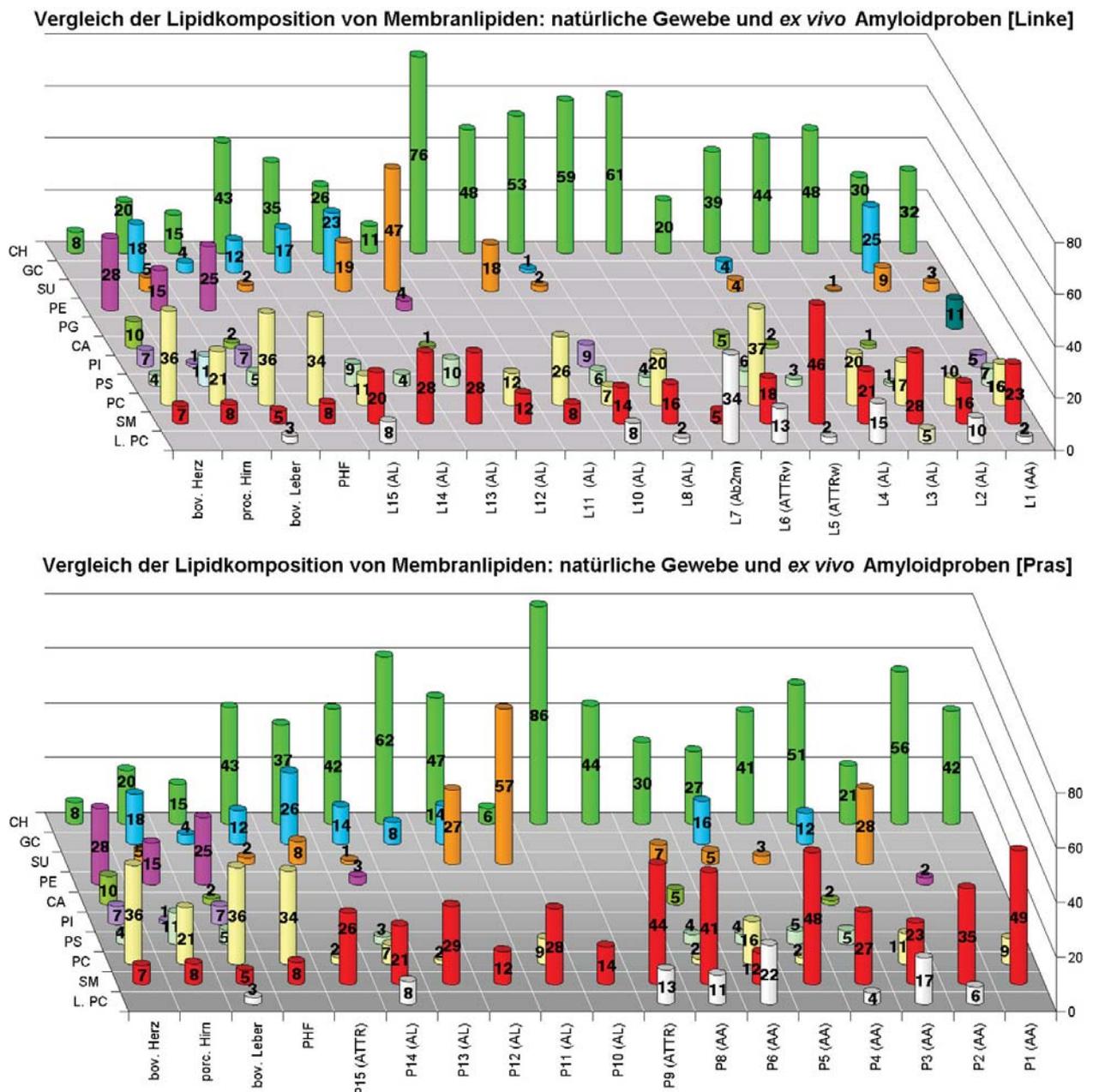


Abb. 4.3: In den Amyloid-Proben sind in überwiegenderem Maßstab „raft“-Lipide zu finden.

Die Lipidverteilungen sind in Prozent zum Gesamtanteil der Membranlipide angegeben. L. PC: Lyso-Phosphatidylcholin, SM: Sphingomyelin, PC: Phosphatidylcholin, PS: Phosphatidylserin, PI: Phosphatidylinositol, CA: Cardiolipin, PG: Phosphatidylglycerol, PE: Phosphatidylethanolamin, SU: Sulfatid, GC: Galactocerebrosid, CH: Cholesterol.

Die Lipidverteilung der membranbildenden Lipide in den *ex vivo* Amyloiden ist nicht typisch für bestimmte Gewebe, Zelltypen oder Plasma- und subzelluläre-Membranen. Sie ist jedoch ähnlich mit der von speziellen Lipid-Mikrodomänen: „lipid rafts“ und Caveolae.

„Rafts“ werden als dynamische Assemblierungen von Cholesterol und Sphingomyelin, die in einer phospholipidreichen Umgebung im extrazellulären Blatt von Lipiddoppelmembranen flotieren, angesehen (Simons und Ikonen, 1997; Brown und London; 1998, Ikonen 2001).

Die Prinzipien, die zu einer „raft“-Bildung führen, sind in den biophysikalischen Eigenschaften der Lipide begründet. So zeigen Sphingolipide stärkere seitliche Kohäsion, durch van der Waal-Interaktionen (Boggs, 1987). Im Vergleich zu Phospholipiden haben Sphingolipide lange Fettsäuren, die zusätzlich für Stabilität eines Sphingolipid-Komplexes sorgen können (Barenholz und Thompson, 1980 und 1999). Sphingolipide interagieren zudem in stärkerem Maße mit Cholesterol als ungesättigte Phospholipide (Smaby *et al.*, 1996; Ramstedt und Slotte, 2000). Zusätzlich kann sich eine mögliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 3- β -Hydroxylgruppe des Cholesterol und der Ceramidgruppe der Sphingolipide bilden (Bittman *et al.* 1994; Almeida *et al.*, 1992). Die Menge an Cholesterol in der Membran beeinflusst dabei in starkem Maße die „raft“-Bildung (Simons und Toomre, 2000).

4.6.1 Anhand des Lipidmusters kann keine endgültige Aussage über eine extra – oder intrazelluläre Anlagerung der Lipid getroffen werden

Wie in Abbildung 4.3 zu sehen, sind in allen Amyloid-Proben die „raft“-bildenden Lipide Sphingomyelin und Cholesterol stark angereichert. Zudem ist PE abwesend, welches hauptsächlich bei der Plasmamembran am innerseitigen Blatt der Doppelmembran lokalisiert ist. Auch ist das Vorkommen langer Fettsäureketten (z. B. C26 bei den Galactocerebroside) in den Sphingolipiden aus den untersuchten Amyloid-Proben ist für „lipid rafts“ typisch (Pike *et al.*, 2002).

Bei Endo-, oder Exozytoseprozessen an Mikrodomänen bleibt die Lipidzusammensetzung erhalten (Gruenberg, 2001). Die Endozytoseprodukte werden in Endosomen sortiert und in Lysosomen abgebaut (Mobius *et al.*, 2002; Gagescu *et al.*, 2000). Daher kann allein von der Lipidkomposition in den untersuchten Amyloid-Proben der Serumsproteine her keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Bildung von Aggregaten unter Einschluss von Lipidmolekülen schon in „lipid rafts“ der Plasmamembran oder bei Endozytose in Zellorganellen gleicher Membranzusammensetzung, abläuft.

Interessanterweise konnte bei der intrazellulären PHF-Ablagerung auch ein selektives Lipidmuster gefunden werden. Jedoch entsprach hier, auch wenn PE nicht vorhanden und der gefundene Cholesterol-Gehalt hoch war, das PC:SM Verhältnis dem von Plasma- oder

subzellulären Membranen. Autopsie-Studien zeigten eine Akkumulation von Cholesterol in Neuronen, die PHFs beinhalten und es wurde vermutet, dass der Cholesterol-Gehalt Einfluss auf die intrazelluläre Phosphorylierung des TAU-Proteins haben könnte, welches den PHF zugrunde liegt (Distl *et al.*, 2001).

Die Abweichungen im Lipidmuster zwischen den intrazellulären PHF und den Ablagerungen der Serumsproteine sind jedoch ein Hinweis darauf, dass die Interaktion zwischen den amyloiden Serumsproteinen mit den „raft“-Lipiden und den hauptsächlich in Lipoproteinen vorkommenden Cholesterol-Estern, wahrscheinlich am äußeren Blatt der Plasmamembran ablaufen. Zudem ist in den untersuchten Proben PE abwesend, dass vorwiegend im inneren Blatt der Plasmamembran lokalisiert ist.

4.6.2 Lipid-Mikrodomänen sind in die Pathogenese auch anderer Amyloidosen involviert

Neue Studien zeigen, dass Lipid-Mikrodomänen auch bei Alzheimer- und Prion-Erkrankungen eine Rolle spielen. So wird postuliert, dass die Prozessierung von A β aus dem Vorläuferprotein APP (amyloid precursor protein) (Review: Selkoe, 2001) in „lipid rafts“ stattfindet und von deren Ausbildung abhängig ist (Eehalt *et al.*, 2003; Bouillot *et al.*, 1996). APP wird einer Serie von proteolytischen Spaltungen unterzogen, welche entweder zur Freisetzung des amyloiden Fragments A β oder einer nicht amyloiden sekretierten Form führen. Nach der β -Prozessierung durch die β -Sekretase (Esler und Wolfe, 2001) spaltet der γ -Sekretase-Enzymkomplex, zu dem Presenilin-1 und Presenilin-2 gehören (De Strooper und Annaert, 2000; Weihofen *et al.*, 2002), A β aus dem übrig gebliebenen transmembranalen APP ab. Weit häufiger wird APP allerdings durch die α -Sekretrase, die in der A β -Region von APP schneidet, gespalten. Dies führt dazu, dass nach γ -Sekretase Prozessierung kein A β entsteht. α - und β -Sekretase konkurrieren miteinander um APP und vermutlich hat Cholesterol einen regulierenden Einfluss (Simons *et al.*, 2001).

Das Prion-Protein ist an seinem GPI-Anker an Membranen angehaftet und vorzugsweise in Caveolae zu finden (Vey *et al.*, 1996; Harmey *et al.*, 1995). In Untersuchungen, die Anstoß zu der vorliegenden Arbeit gaben, konnte in aufgereinigten Prion-Fibrillen das charakteristische Lipidmuster der „lipid rafts“ gefunden werden (Klein *et al.*, 1998). Auch in diesem Fall scheinen Mikrodomänen am pathologischen Prozess einer Amyloidose beteiligt zu sein. Es wird postuliert, dass eine α -helikale Konformation des Prion-Proteins in „raft“-Regionen stabilisiert wird (Naslavsky *et al.*, 1999). Veränderungen durch z. B. Insertion des Proteinase-resistenten Prion-Protein kann zu Ausbildung von β -Strukturen und Membranzerstörung führen (Baron *et al.*, 2002; Sanghera und Pinheiro, 2002). Zudem konnten in Alzheimer- und Prion-Protein

jeweils ein Sphingolipid-Bindemotiv identifiziert werden und es wurde vermutet, dass eine Konformationsänderung von α -Helix zu β -Faltblatt in „lipid rafts“ unter der Kontrolle von Sphingolipiden stehen könnte (Mahfoud *et al.*, 2002).

Dass Lipide eine Konformationsumwandlung induzieren können wird auch durch Studien an A β belegt, bei denen eine Umwandlung des A β -Peptid von „random“ zu β -Struktur unter Einfluss von Lipiden gezeigt werden konnte (Arispe *et al.*, 1994; Choo-Smith and Surewicz, 1997; McLaurin *et al.*, 2000; Terzi *et al.*, 1994, 1995). Die dadurch verursachten Membranstörungen können zur Beeinträchtigung der Membran-Blattstruktur, Anstieg in der Membranbeugung oder Formierung von Kanälen in der Membran führen (Mason *et al.*, 1999; Mirzabekov *et al.*, 1994, Pillot *et al.*, 1996; McLaurin *et al.*, 2000). Die Inhibition elektrostatischer Kräfte verhindert die A β -Cytotoxizität auf Membranen (Hertel *et al.*, 1997).

4.6.3 Die Daten sprechen für eine generelle Rolle der „lipid rafts“ bei Amyloidosen

Die gefundenen Lipidkonstellationen in den isolierten AL-, AA- und ATTR-Amyloid-Fibrillen und die Untersuchungen zur Rolle von „lipid rafts“ bei Alzheimer- und Prion-Krankheiten sprechen für eine generelle Beteiligung dieser Strukturen bei der Pathogenese von Amyloidosen. Bei den Fibrillenproteinen der untersuchten Krankheiten wurden bisher noch keine spezifischen Interaktionen mit Lipid-Mikrodomänen beschrieben. Es sind Proteine, die normalerweise löslich im Plasma vorkommen. Allerdings konnte eine Assoziation von Transthyretin mit HDL und Apolipoprotein A-I gezeigt werden (Sousa *et al.*, 2000). Das AA-Vorläuferprotein SAA ist ein Apolipoprotein der LDL und HDL (Marhaug *et al.*, 1982; Ladu *et al.*, 2000). Für Leicht-Ketten-Amyloidosen wurde bisher noch keine spezifische Interaktion mit Lipiden beschrieben.

Eine Hypothese zur Erklärung des Vorkommens der „raft“-Lipide in den humanen *ex vivo* Amyloid-Proben ist, dass Mikrodomänen als Ort dienen, an denen sich die Vorläuferproteine oder Fibrillenproteine akkumulieren. Aufgrund der hohen Dichte der Proteine und elektrostatischer und hydrophober Wechselwirkungen mit der Lipidmembran könnten dort Protein-Konformationen stabilisiert vorliegen, die zur Fibrillenbildung führen. Dabei werden die charakteristischen „raft“-Lipide im Moment der Umwandlung und Aggregation anlagern.

4.7 Der Nachweis an Cholesterol-Estern in den *ex vivo* Amyloid-Fibrillen deuten auf eine Interaktion mit Lipoproteinen hin

Der Nachweis großer Mengen an Cholesterol-Estern in fast allen Amyloid-Fibrillen-Proben der Serumproteine ist ein besonderes, noch nicht vorher beschriebenes Phänomen.

Cholesterol-Ester bilden das Zentrum von Lipoproteinen die an der Steuerung des Lipidhaushalts beteiligt sind. Freies d. h. nicht von der Zelle synthetisierte Cholesterol wird nach Bindung von LDL an den LDL-Rezeptor durch Endozytose von der Zelle aufgenommen. Die Cholesterol-Ester im Kern des Lipoproteins werden in freie Fettsäure und Cholesterol zerlegt, welches in die Membranen eingebaut wird. HDLs dagegen nehmen aus der Plasmamembran freies Cholesterol auf, das über „lipid rafts“ oder Caveolae vom Trans-Golgi-Netzwerk an die Plasmamembran transportiert wird (Fielding und Fielding, 1997).

Das intrazelluläre Gleichgewicht zwischen nicht-verestertem und verestertem Cholesterol wird durch die Aktivität zweier Enzyme reguliert: 1. Die Cholesterol-Ester-Hydrolase, welche nicht verestertes Cholesterol bereitstellt und 2. die Cholesterol-Acyl-Transferase, die in die Gegenrichtung arbeitet (Fielding und Fielding, 1995, 1997). Ein intrazellulärer Cholesterolüberschuss hemmt die Neusynthese von LDL-Rezeptor und Cholesterol

Die Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase ist für die Anreicherung von Cholesterol-Estern im Plasma verantwortlich. Diese Reaktion findet hauptsächlich in den HDL statt (Dobiasova und Frohlich, 1999). Bei entzündlichen Prozessen kann es zu einer verringerten Cholesterolaufnahme durch Modulierung der HDL zu Akut-Phasen-HDL kommen. Dies wird in Zusammenhang mit Athereosklerose gebracht (Khovidhunkit *et al.*, 2001; Banka *et al.*, 1995). Zusätzlich kommt es bei entzündlichen Prozessen zu einer Rekrutierung von Makrophagen. Makrophagen haben wenig LDL-Rezeptoren und bilden einen Pool für Cholesterol-Ester infolge der Aufnahme von Zellmembranen als Cholesterol-Quelle.

Die hohen Werte an Cholesterol-Estern, die mit den Amyloidfibrillen vergesellschaftet nachgewiesen wurden, deuten auf ihre Rolle bei der Pathogenese der untersuchten Amyloidosen hin. Eine Anreicherung von Cholesterol-Estern könnte eine Folge des Umbaus von HDLs nach Entzündungen sein oder durch Rekrutierung von Makrophagen zu Stande kommen. Auch die Hemmung der Cholesterol-Ester-Hydrolase und eine Fehlregulierung der LDL-Rezeptor-Synthese kann zu solch einer Anreicherung führen.

Am Beispiel der Alzheimerkrankheit wurde die Rolle der Regulierung des Cholesterol-Gehalts an der Pathogenese einer Amyloidose schon mehrfach beschrieben (Kirsch *et al.*, 2002; Ji *et al.*, 2001; Yanagisawa 2002). Auch demographische Studien zeigen eine Korrelation des Auftretens der Alzheimer-Krankheit mit dem Cholesterolspiegel (Kivipelto *et al.*, 2001). Ein erhöhtes

Risiko, an familiärem und sporadischem Morbus Alzheimer zu erkranken, hängt mit dem homozygoten Vorliegen des Apolipoprotein E epsilon4 Allel (ApoE₄) zusammen (Tomiyama *et al.*, 1999). Die durch ApoE₄ induzierte Pathogenese ist noch nicht aufgeklärt. ApoE ist Bestandteil der HDL - die für den Abtransport von Cholesterolemolekülen verantwortlich sind - und konnte in allen Amyloidosen identifiziert werden (Gallo *et al.*, 1994). Es ist möglich, dass für die Alzheimer-Krankheit beschriebene pathogene Mechanismen auch eine Rolle bei anderen Amyloidosen spielen.

Wie schon für die gefundenen „raft“-Lipide diskutiert, kann allein vom Vorliegen der Cholesterolemoleküle in fast allen *ex vivo* Amyloid-Proben der Serumproteine nur spekuliert werden, ob sie aus intrazellulären Speichern oder aus dem Zentrum von Lipoproteinen bei extrazellulären Anlagerungen stammen. Desgleichen lässt sich nur schwer sagen, ob die Lipide beim Übergang des löslichen Proteins in seine amyloide Form oder während des cytotoxischen Effekts der Fibrillen anlagern. Jedoch deutet die von den intrazellulären PHF abweichende selektive Lipidkonstellation der amyloiden Serumproteine auf einen pathologischen Ablauf an der äußeren Plasmamembran hin.

4.8 Schlussfolgerung und Hypothesen

Die selektive Assoziation von „raft“-Lipiden und Cholesterolemolekülen mit den Amyloid-Fibrillen deutet auf ihre Rolle bei der Pathogenese der Amyloidosen hin. Die folgenden Hypothesen erklären sowohl die Präsenz von „raft“-Lipiden als auch von Cholesterolemolekülen in den Amyloidfibrillen:

1. *Eine gestörte Regulation des Cholesterolemoleküls ist eine Voraussetzung für die Ausbildung einer Amyloidose.*

Durch Verminderung des Cholesterolemolekül-Abtransport von den Zellen, durch zum Beispiel eine Veränderung des HDL-Aufbaus in Folge von Entzündungen oder Alter, kann es zur Anreicherung von Cholesterolemolekülen und Cholesterolemolekülen in HDLs und der Plasmamembran kommen. Viel Cholesterolemolekül in der Plasmamembran führt über Wechselwirkung mit Sphingolipiden zur erhöhten Ausbildung von „lipid rafts“. Diese wiederum könnten als Ort dienen, an dem sich Fibrillenproteine akkumulieren, die zum Beispiel infolge eines entzündlichen Prozess oder fehlerhafter Prozessierung in erhöhter Konzentration vorliegen. Durch die hohe Dichte an Protein und eventuellen Wechselwirkungen mit der Lipidmembran kommt es dann zur Ausbildung von β -Strukturen und Fibrillenbildung. Wegen des Ablaufs der Proteinaggregation

in „lipid rafts“ werden „raft“-Lipide zusammen mit den vermehrt vorliegenden Cholesterolestern an die Fibrillen angelagert und/oder in diese eingeschlossen.

2. Die Fibrillenbildung in oder bei „lipid rafts“ ist der initiierende Prozess der Amyloidose.

In Folge dessen kommt es zu entzündlichen Prozessen und zur Zerstörung der betroffenen Zellen. Aufgrund der Entzündung werden Lipoproteine zu Akut-Phasen-Lipoproteinen umgewandelt, die weniger Cholesterol abtransportieren, was zu einer kurzzeitigen Stabilisierung verletzter Zellmembranen führt. Makrophagen, die Cholesterol von Zelltrümmern, Lipoproteinen und atherosklerotischen Plaques aufnehmen und so einen Pool für verestertes Cholesterol darstellen, werden an den Ort der beginnenden Zerstörung der Zellmembran rekrutiert. Diese versuchen die entstehenden Fibrillen zu endozytieren und zu verdauen. Somit sind am Ort der Fibrillenbildung neben den „raft“-Lipiden auch Cholesterol-Ester vorhanden. Diese werden bei weiterer Fibrillenbildung zusätzlich zu den „raft“-Lipiden in die Fibrillen eingeschlossen.

Ob einer der beiden postulierten Abläufe zutrifft oder nur einzelne Teil davon, bleibt noch zu klären.

4.9 Ausblick

Zwischen den ca. 22 Fibrillenproteinen konnten bis heute keine Gemeinsamkeiten in ihrer Aminosäuresequenz gefunden werden. Jedoch sind eine Reihe von gemeinsamen NebenkompONENTEN identifiziert worden. In allen bis dato untersuchten *ex vivo* Amyloid-Fibrillen verschiedener Fibrillenproteine, wie Prion-Protein (Klein *et al.*, 1998), AL, ATTR, A β 2m, AA und PHF, konnte ein selektives Lipidmuster detektiert werden. In dieser Arbeit konnten unabhängig vom Fibrillenprotein in *ex vivo* Amyloid-Proben der Serumsproteine auffallend hohe Werte an „raft“-Lipiden, Cholesterol und Sphingomyelin sowie die in Lipoprotein vorkommenden Cholesterol-Ester detektiert werden. Damit kommt diesen Lipid-NebenkompONENTEN eine wichtige Bedeutung in der Pathologie der Amyloidosen zu.

Bis heute wurden die meisten Untersuchungen von Lipidinteraktionen an A β durchgeführt. Leider konnten in der vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen an aufgereinigten Fibrillen dieses Fibrillenproteins durchgeführt werden, da im Laufe dieser Dissertation keine A β -Ablagerungen erhalten werden konnten. Das für die Lipiduntersuchungen etablierte Analysesystem eignet sich für eine breite, routinemäßige Anwendung zur Untersuchung von Lipiden aus verschiedenen biologischen Systemen und kann für Lipiduntersuchungen an weiteren Amyloidosen verwendet werden.

Die Relevanz der gefundenen Lipidmuster ist zu erhärten, und zukünftige Untersuchungen sollten sich dem cytotoxischen Pathomechanismus zuwenden. Als erstes gilt es zu klären, wie die hohen Werte an „raft“-Lipiden und Cholesterol-Estern in den aufgereinigten Amyloid-Fibrillen zustande kommen.

Ein Weg sind Bindungsstudien zwischen Amyloid-Fibrillen und Lipiden. Hierzu wurden Liposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung präpariert, die zu entstehenden oder gebildeten Amyloid-Fibrillen hinzugegeben werden können. Amyloid-Fibrillen lassen sich mittels Zentrifugation fällen und der Überstand kann abgenommen werden. Mit dem etablierten DC-System kann der Lipidgehalt im Überstand und nach Lipidextraktion der Amyloid-Fibrillen gemessen werden.

Weiterhin gilt es, den Einfluss der gefundenen Lipide auf den Fibrillenbildungsprozess zu klären. Dafür eignen sich Fibrillenbildungsassays, mit deren Hilfe die Kinetik der Fibrillenbildung über die Anlagerung eines Fibrillenbindenden Farbstoffs (z. B. Thioflavin) gemessen werden kann (Cohlberg *et al.*, 2002).

Moderne Fluoreszenztechniken erlauben es, durch Markierung von „raft“-Lipiden und Fibrillenproteinen eine direkte Interaktion in der lebenden Zelle zu untersuchen. Solch ein System könnte sich darüber hinaus für die Suche nach Wirkstoffen nutzen lassen, die „lipid rafts“ und deren Bildung als generellen Angriffspunkt zur Therapierung einer Amyloidose zum Ziel haben.

5. Literaturverzeichnis

- Abidi SL.** Separation procedures for phosphatidylserines. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **717**: 279-93 (1998).
- Almeida PF, Vaz WL, Thompson TE.** Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis. *Biochemistry* **31**: 6739-47 (1992).
- Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC.** Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**: 764-6 (1967).
- Alvarez JG, Ludmir J.** Semiautomated multisample analysis of amniotic fluid lipids by high performance thin-layer chromatography reflectance spectrodensitometry. *J. Chromatogr.* **615**: 142-7 (1993).
- Appel TR, Dumpitak C, Matthiesen U, Riesner D.** Prion rods contain an inert polysaccharide scaffold. *Biol. Chem.* **380**: 1295-306 (1999).
- Arispe N, Pollard HB, Rojas E.** Review: beta-Amyloid Ca(2+)-channel hypothesis for neuronal death in Alzheimer disease. *Mol. Cell. Biochem.* **140**: 119-25 (1994).
- Astbury WT, Street A.** X-ray studies of the structure of hair, wool, and related fibres. I-General. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A.* **230**, 75-101 (1930).
- Astbury WT, Woods HJ.** The X-ray interpretation of the structure and elastic properties of hair keratin. *Nature* **126**, 913-914 (1930).
- Banka CL, Yuan T, de Beer MC, Kindy M, Curtiss LK, de Beer FC.** Serum amyloid A (SAA): influence on HDL-mediated cellular cholesterol efflux. *J Lipid Res.* **36**: 1058-65 (1995).
- Barenholz Y, Thompson TE.** Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **604**: 129-58 (1980).
- Barenholz Y, Thompson TE.** Sphingomyelin: biophysical aspects. *Chem. Phys. Lipids.* **102**: 29-34 (1999).
- Barenholz Y.** Review: Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to "rafts". *Prog. Lipid Res.* **41**: 1-5 (2002).
- Baron GS, Wehrly K, Dorward DW, Chesebro B, Caughey B.** Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes. *EMBO J.* **21**: 1031-40 (2002).
- Bauer HH, Aebi U, Häner M, Hermann R, Müller M, Arvinte T, Merkle HP.** Architectures and polymorphism of fibrillar supramolecular assemblies produced by *in vitro* aggregation of human calcitonin. *J. Struct. Biol.* **115**, 1-15 (1995).
- Bellotti V, Mangione P, Merlini G.** Review: immunoglobulin light chain amyloidosis the archetype of structural and pathogenic variability. *J. Struct. Biol.* **130**: 280-9 (2000).
- Benditt EP, Eriksen N.** Amyloid protein SAA is associated with high density lipoprotein from human serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 4025-8 (1977).
- Bergethon PR, Sabin TD, Lewis D, Simms RW, Cohen AS, Skinner M.** Improvement in the polyneuropathy associated with familial amyloid polyneuropathy after liver transplantation. *Neurology* **47**: 944-51 (1996).
- Bitman J, Wood DL.** An improved copper reagent for quantitative densitometric thin-layer chromatography of lipids. *J. Liq. Chromatogr.* **5**: 1155-62. (1982).
- Bittman R, Kasireddy CR, Mattjus P, Slotte JP.** Interaction of cholesterol with sphingomyelin in monolayers and vesicles. *Biochemistry* **33**: 11776-81 (1994).
- Blake CC, Geisow MJ, Swan ID, Rerat C, Rerat B.** Structure of human plasma prealbumin at 2-5 Å resolution. A preliminary report on the polypeptide chain conformation, quaternary structure and thyroxine binding. *J. Mol. Biol.* **88**: 1-12 (1974).

- Bligh EG, Dyer WJ.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-7 (1959).
- Boggs JM.** Review: Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. *Biochim. Biophys. Acta* **906**: 353-404 (1987).
- Booth DR, Sunde M, Bellotti V, Robinson CV, Hutchinson WL, Fraser PE, Hawkins PN, Dobson CM, Radford SE, Blake CC, Pepys MB.** Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature* **385**: 787-93 (1997).
- Bouillot C, Prochiantz A, Rougon G, Allinquant B.** Axonal Amyloid precursor protein expressed by neurons in vitro is present in a membrane fraction with caveolae-like properties. *J. Biol. Chem.* **271**: 7640-7644 (1996).
- Bradford, MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254 (1976).
- Braun HJ.** Properties of the amyloid and views on the pathogenesis of amyloidosis. *Med. Klin.* **67**: 1267-70 (1972).
- Brown DA, London E.** Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**: 111-36 (1998).
- Bryant DK, Orlando RC, Fenselau C, Sowder RC, Henderson LE.** Four-sector tandem mass spectrometric analysis of complex mixtures of phosphatidylcholines present in a human immunodeficiency virus preparation. *Anal. Chem.* **63**: 1110-4 (1991).
- Bukau B.** *edt.* Molecular chaperones and folding catalysts. Regulation, cellular function and mechanisms. *Harwood Academic Publishers, Amsterdam* (1999).
- Caughey B, Baron GS.** Factors affecting interactions between prion protein isoforms. *Biochem. Soc Trans.* **30**: 565-9 (2002).
- Caughey B.** Interactions between prion protein isoforms: the kiss of death? *Trends Biochem. Sci.* **26**: 235-42 (2001).
- Caughey B.** Review: Formation of protease-resistant prion protein in cell-free systems. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2**: 95-101 (2000).
- Chapman D.** Physical studies of lipid-lipid and lipid-protein interactions. *Lipids* **4**: 251-60 (1969)
- Choo-Smith LP, Surewicz WK.** The interaction between Alzheimer amyloid beta(1-40) peptide and ganglioside GM1-containing membranes. *FEBS Lett.* **402**: 95-8 (1997).
- Cinek T, Horejsi V.** The nature of large noncovalent complexes containing glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases. *J. Immunol.* **149**: 2262-70 (1992).
- Cohen AS, Calkins E.** The isolation of Amyloid fibrils and a study of the effect of collagenase and hyaluronidase. *J. Cell Biol.* **21**: 481-486 (1964).
- Cohlberg JA, Li J, Uversky VN, Fink AL.** Heparin and other glycosaminoglycans stimulate the formation of amyloid fibrils from alpha-synuclein in vitro. *Biochemistry* **41**: 1502-11 (2002).
- Colbeau A, Nachbaur J, Vignais PM.** Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **249**: 462-92 (1971).
- Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson, RE, Lansbury PT Jr.** Accelerated oligomerisation, not fibrillization, is a shared property of both α -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 571-576 (2000).
- Corne JH, Fraser PE, Lansbury PT.** A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5959-63 (1993).
- Crowther RA, Goedert M.** Review: Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases. *J. Struct. Biol.* **130**: 271-9 (2000).

- Damas A, Sebastiao MP, Domingues FS, Costa PP, Saraiva MJ.** Structural studies on FAP fibrils: removal of contaminants is essential for the interpretation of X-ray data. *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* **2**: 173-178 (1995).
- Damerval C, le Guilloux M, Blaisonneau J, de Vienne D.** A simplification of Heukeshoven and Dernick's silver staining of proteins. *Electrophoresis* **8**: 158-9 (1987).
- Dawsen RMC, Hemington N Davenport JB.** Lipid content of bovine Heart. *Biochem J.* **84**: 497 (1962).
- De Strooper B, Annaert W.** Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell Sci.* **113**: 1857-1870 (2000).
- DeArmond SJ, McKinley MP, Barry RA, Braunfeld MB, McColloch JR, Prusiner SB.** Identification of prion amyloid filaments in scrapie-infected brain. *Cell* **41**: 221-35 (1985).
- Devaux, P.F.** Lipid transmembrane asymmetry and flip-flop in biological membranes and lipid bilayers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**: 489-494 (1993).
- Distl R, Meske V, Ohm TG.** Tangle-bearing neurons contain more free cholesterol than adjacent tangle-free neurons. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **101**, 547-554. (2001)
- Dobiasova M, Frohlich JJ.** Review: Advances in understanding of the role of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) in cholesterol transport. *Clin. Chim. Acta* **286**: 257-71 (1999).
- Dobson CM.** Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 329-332 (1999).
- Eanes, E.D. & Glenner, G.G.** Xray diffraction studies on amyloid filaments. *J. Histochem. Cytochem.* **16**, 673-677 (1968).
- Edwards P, Cooper DA, Turner J, O'Connor TJ, Byrnes DJ.** Resolution of amyloidosis (AA type) complicating chronic ulcerative colitis. *Gastroenterology.* **95**: 810-5 (1988).
- Eehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K.** Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* **160**: 113-23 (2003).
- Eigen M.** Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys. Chem.* **63**: A1-18 (1996).
- Esler WP, Wolfe MS.** A portrait of Alzheimer secretases - new features and familiar faces. *Science* **293**: 1449-1454 (2001).
- Eulitz M, Linke R.** Amyloid fibrils derived from V-region together with C-region fragments from a lambda II-immunoglobulin light chain (HAR). *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **66**: 907-15 (1985).
- Eulitz M, Linke RP.** Primary structure of the variable part of an amyloidogenic Bence-Jones Protein (Mev.). An unusual insertion in the third hypervariable region of a human kappa-immunoglobulin light chain. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **363**: 1347-58 (1982).
- Evsigneeva RP, Zvonkova EN, Serebrennikova GA, Schvets IA.** Lipid chemistry. *Khimiya Moscow* (1983).
- Fandrich M, Fletcher MA, Dobson CM.** Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature* **410**: 165-6 (2001).
- Fielding CJ, Fielding PE.** Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* **36**: 211 - 28 (1995)
- Fielding CJ, Fielding PE.** Review: Intracellular cholesterol transport. *J. Lipid Res.* **38**: 1503-21 (1997).
- Fink AL.** Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding & Design* **3**: R9-R23 (1998).
- Freysz L, Bieth R, Judes C, Sensenbrenner J, Jacob M, Mandel P.** Quantitative distribution of phospholipids in neurons and glial cells isolated from rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* **15**: 307-13 (1968).
- Friedreich N. Kekulé A.** Zur Amyloidfrage. *Virchows Archiv* **16**: 50-65 (1859).
- Gagescu R, Demaurex N, Parton RG, Hunziker W, Huber LA, Gruenberg J.** The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *Mol. Biol. Cell* **11**: 2775-91 (2000).

- Gal R, Korzets A, Schwartz A, Rath-Wolfson L, Gafter U.** Systemic distribution of beta 2-microglobulin-derived amyloidosis in patients who undergo long-term hemodialysis. Report of seven cases and review of the literature. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **7**: 718-21. (1994).
- Gal R, Shtrasburg S, Luria M, Mercer BL, Viskin S, Yakar S, Pras M.** Amyloid goiter: report of the clinical, histological and biochemical features of five cases. *Amyloid* **2**: 119-25: (1995).
- Gallo G, Wisniewski T, Choi-Miura NH, Ghiso J, Frangione B.** Potential role of apolipoprotein-E in fibrillogenesis. *Am. J. Pathol.* **145**: 526-30 (1994).
- Goedert M.** Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **777**: 121-31 (1996).
- Goldsbury CS, Wirtz, S, Müller, SA, Sunderji, S, Wicki, P, Aebi U, Frey P.** Studies on the *in vitro* assembly of A β 1-40: implications for the search for A β fibril formation inhibitors. *J. Struct. Biol.* **130**, 217-231 (2000).
- Gorevic PD, Greenwald M, Frangione B, Pras M, Franklin EC.** The amino acid sequence of duck amyloid A (AA) protein. *J. Immunol.* **118**: 1113-8 (1977).
- Goux WJ, Liu B, Shumburo AM, Parikh S, Sparkman DR.** A quantitative assessment of glycolipid and protein associated with paired helical filament preparations from Alzheimer's diseased brain. *J. Alzheimers Dis.* **3**: 455-466 (2001).
- Goux WJ, Rodriguez S, Sparkman DR.** Analysis of the core components of Alzheimer paired helical filaments. A gas chromatography/mass spectrometry characterization of fatty acids, carbohydrates and long-chain bases. *FEBS Lett.* **366**: 81-5 (1995).
- Griffith JS.** Self-replication and scrapie. *Nature* **215**: 1043-4 (1967).
- Grit M, Crommelin DJ.** Review: Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chem. Phys. Lipids.* **64**: 3-18 (1993).
- Grit M, Underberg WJ, Crommelin DJ.** Hydrolysis of saturated soybean phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *J. Pharm. Sci.* **82**: 362-6 (1993).
- Gruenberg J.** The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**: 721-30 (2001).
- Gunstone FD, Harwood, Padley FB, eds.** The Lipid Handbook. *Chapman and Hall, New York* (1986).
- Gurr MI.** The Role of Fat in Food and Nutrition. *Elsevier London.* (1992).
- Häggqvist B, Näslund J, Sletten K, Westermark GT, Mucchiano G, Tjernberg LO, Nordstedt C, Engström U, Westermark P.** Medin: an integral fragment of aortic smooth muscle cell-produced lactadherin forms the most common human amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 8669-8674 (1999).
- Hamilton RJ editor.** Lipid analysis in oils and fats. *London: Blackie Academic and Professional.* ISBN 0-75140-414-4. (1998).
- Han X, Gross RW.** Electrospray ionization mass spectroscopic analysis of human erythrocyte plasma membrane phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10635-9 (1994).
- Harder T, Simons K.** Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 534-542 (1997)
- Harmey JH, Doyle D, Brown V, Rogers MS.** The cellular isoform of the prion protein, PrP^c, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **210**: 753-9 8 (1995).
- Harvey DJ.** Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of Sphingo- and Glycosphingolipids. *J. Mass. Spectrom.* **30**: 1311-24 (1995a).
- Harvey DJ.** Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of phospholipids. *J. Mass. Spectrom.* **30**: 1333-46 (1995b).
- Hawkins PN.** Studies with radiolabelled serum amyloid P component provide evidence for turnover and regression of amyloid deposits *in vivo*. *Clin. Sci. (Lond).* **87**: 289-95 (1994).

- Hertel C, Terzi E, Hauser N, Jakob-Rotne R, Seelig J, Kemp JA.** Inhibition of the electrostatic interaction between beta-amyloid peptide and membranes prevents beta-amyloid-induced toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 9412-6 (1997).
- Heukeshoven J, Dernick R.** Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **6**: 103-12. (1986).
- Hill E, Olusanya O, van der Kaay J, Downes CP, Andrews PD, Swedlow JR, Smythe E.** Regulation of clathrin-coated vesicle formation. *Biochem. Soc. Trans.* **4**, 375-7 (2001).
- Holmgren G, Steen L, Ekstedt J, Groth CG, Ericzon BG, Eriksson S, Andersen O, Karlberg I, Norden G, Nakazato M.** Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met30). *Clin. Genet.* **40**: 242-6 (1991).
- Hunter GD.** Scrapie: a prototype slow infection. *J. Infect. Dis.* **125**: 427-40 (1972).
- Ikonen E.** Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 470-7 (2001).
- Inoue S, Kisilevsky R.** In situ electron microscopy of amyloid deposits in tissues. *Methods Enzymol.* **309**: 496-509 (1999).
- Ionescu-Zanetti C, Khurana R, Gillespie JR, Petrick JR, Trabachino LC, Minert LJ, Carter SA, Fink AL.** Monitoring the assembly of Ig light-chain amyloid fibrils by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13175-13179 (1999).
- Isobe T, Osserman EF.** Plasma cell dyscrasia associated with the production of incomplete (?deleted) IgG lambda molecules, gamma heavy chains, and free lambda chains containing carbohydrate: description of the first case. *Blood* **43**: 505-26 (1974).
- Jackson GS, Hosszu LLP, Power A, Hill AF, Kenny J, Saibil H, Craven CJ, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J.** Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science* **283**, 1935-1937 (1999).
- Jarrett JT, Lansbury PT.** Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimers disease and scrapie? *Cell* **73**: 1055-8 (1993).
- Ji SR, Wu Y, Sui SF.** Cholesterol is an important factor affecting the membrane insertion of beta-amyloid peptide (A beta 1-40), which may potentially inhibit the fibril formation. *J. Biol. Chem.* **277**: 6273-9 (2002).
- Jiménez JL, Guijarro JI, Orlova E, Zurdo J, Dobson CM, Sunde M, Saibil H.** Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *EMBO J.* **18**, 815 – 821 (1999).
- Kakio A, Nishimoto S, Yanagisawa K, Kozutsumi Y, Matsuzaki K.** Interactions of amyloid beta-protein with various gangliosides in raft-like membranes: importance of GM1 ganglioside-bound form as an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *Biochemistry* **41**: 7385-90 (2002).
- Kanda Y, Goodman DS, Canfield RE, Morgan FJ.** The amino acid sequence of human plasma prealbumin. *J Biol Chem.* **249**: 6796-805 (1974).
- Karas M, Hillenkamp F.** Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 Daltons. *Anal. Chem.* **60**: 2299-2301 (1988).
- Kaufmann R.** Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology. *J. Biotechnol.* **41**: 155-75 (1995).
- Kazatchkine MD, Husby G, Araki S, Benditt EP, Benson MD, Cohen AS, Fangione B, Glenner GG, Natvig JB, Westermark P.** Nomenclature of Amyloid and amyloidosis-WHO-IUIS nomenclature sub-committee. *Bull. Who* **71**: 105-108 (1993).
- Keenan TW, Berezney R, Funk LK, Crane FL.** Lipid composition of nuclear membranes isolated from bovine liver. *Biochim. Biophys. Acta* **203**: 547-54 (1970).
- Kellings K, Prusiner SB, Riesner D.** Nucleic acids in prion preparations: unspecific background or essential component? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **343**: 425-30 (1994).

- Kensil CR, Dennis EA.** Alkaline hydrolysis of phospholipids in model membranes and the dependence on their state of aggregation. *Biochemistry* **20**: 6079 - 6085 (1981).
- Kenworthy AK, Petranova N, Edidin M.** High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol. Biol. Cell.* **11**: 1645-55 (2000).
- Kerwin JL, Tuninga AR, Ericsson LH.** Identification of molecular species of glycerophospholipids and sphingomyelin using electrospray mass spectrometry. *J. Lipid Res.* **35**: 1102-14 (1994).
- Kessler M, Netter P, Azoulay E, Mayeux D, Pere P, Gaucher A.** Dialysis-associated arthropathy: a multicentre survey of 171 patients receiving haemodialysis for over 10 years. The Co-operative Group on Dialysis-associated Arthropathy. *Br. J. Rheumatol.* **3**: 157-62 (1992).
- Kim IC, Shirahama T, Cohen AS.** The lipid content of amyloid fibrils purified by a variety of methods. *Am. J. Pathol.* **50**: 869-86 (1967).
- Kirsch C, Eckert GP, Mueller WE.** Cholesterol attenuates the membrane perturbing properties of beta-amyloid peptides. *Amyloid* **9**: 149-59 (2002).
- Kirschner DA, Inouye H, Duffy L, Sinclair A, Lind M, Selkoe DA.** Synthetic peptide homologous to β -protein from Alzheimer's disease forms amyloid-like fibrils *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 6953-6957 (1987).
- Kisilevsky R.** Proteoglycans and other basement membrane proteins in amyloidoses. *Mol. Neurobiol.* **9**: 23-4 (1994).
- Kisilevsky R.** Review. The relation of proteoglycans, serum amyloid P and apo E to amyloidosis current status. *Amyloid* **7**: 23-5 (2000b).
- Kisilevsky R.** Review: amyloidogenesis-unquestioned answers and unanswered questions. *J. Struct. Biol.* **130**: 99-108 (2000).
- Kisilevsky R.** Review: Can deposition of amyloid be prevented in Alzheimer's disease? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **826**: 117-27 (1997).
- Kivipelto M, Helkala EL, Hanninen T, Laakso MP, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A.** Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: A population-based study. *Neurology* **56**: 1683-9 (2001).
- Klein TR, Kirsch D, Kaufmann R, Riesner D.** Prion rods contain small amounts of two host sphingolipids as revealed by thin-layer chromatography and mass spectrometry. *Biol. Chem.* **379**: 655-66 (1998).
- Glunk WE, Pettegrew JW, Abraham DJ.** Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *J. Histochem. Cytochem.* **37**: 1273-81 (1989).
- Khovidhunkit W, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C.** Cholesterol efflux by acute-phase high density lipoprotein: role of lecithin: cholesterol acyltransferase. *J. Lipid Res.* **42**: 967-75 (2001).
- Koivusalo M, Haimi P, Heikinheimo L, Kostianen R, Somerharju P.** Quantitative determination of phospholipid compositions by ESI-MS: effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response. *J. Lipid Res.* **42**: 663-72 (2001).
- Kremer JJ, Sklansky DJ, Murphy RM.** Profile of changes in lipid bilayer structure caused by beta-amyloid peptide. *Biochemistry* **40**: 8563-71 (2001).
- Kensil CR, Dennis E A.** Alkaline hydrolysis of phospholipids in model membranes and the dependence on their state of aggregation. *Biochemistry* **20**: 6079-6085 (1981).
- Kurzchalia T, Hartmann E, Dupree P.** Guilty by insolubility: does a protein's detergent insolubility reflect caveolar location. *Trends Cell Biol.* **5**: 187-189 (1995)
- Ladu MJ, Reardon C, Van Eldik L, Fagan AM, Bu G, Holtzman D, Getz GS.** Review: Lipoproteins in the central nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **903**: 167-75 (2000).
- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5 (1970).

- Lansbury, PT Jr.** Evolution of amyloid: What normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3342-3344 (1999).
- Letter WS.** Preparative isolation of vitamin D2 from previtamin D2 by recycle high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **590**: 169-73 (1992).
- Linke RP, Gerhard L, Lottspeich F.** Brain-restricted amyloidoma of immunoglobulin lambda-light chain origin clinically resembling multiple sclerosis. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **373**: 1201-9 (1992).
- Linke RP, Hus R.** Hydrophobic properties of an amyloidogenic kappa I-Bence Jones protein fragment in charge shift electrophoresis. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **373**: 635-40 (1992).
- Linke RP.** *Sympos "Amyloid and Amyloidosis"* (1988).
- Lins L, Piron S, Conrath K, Vanloo B, Brasseur R, Rosseneu M, Baert M, Ruyschaert JM.** Enzymatic hydrolysis of reconstituted dimyristoylphosphatidylcholine-apoA-I complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1151**: 137-42 (1993).
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **192**: 265-275 (1951).
- Lundmark K, Westermark GT, Nystrom S, Murphy CL, Solomon A, Westermark P.** Transmissibility of systemic amyloidosis by a prion-like mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 6979-84 (2002).
- Macala LJ Yu RK, Ando S.** Analysis of brain lipids by high performance thin-layer chromatography and densitometry. *J. Lipid Res.* **24**: 1243-1250 (1983).
- Maeba R, Ueta N.** Ethalonamine plasmalogens prevent the oxidation of cholesterol by reducing the oxidizability of cholesterol in phospholipid bilayers. *J. Lipid Res.* **44**: 164-71 (2003).
- Mahfoud R, Garmy N, Maresca M, Yahi N, Puigserver A, Fantini J.** Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins. *J. Biol. Chem.* **277**: 11292-6 (2002).
- Marhaug G, Sletten K, Husby G.** Characterization of amyloid related protein SAA complexed with serum lipoproteins (apoSAA). *Clin. Exp. Immunol.* **50**: 382-9 (1982).
- Mason RP, Jacob RF, Walter MF, Mason PE, Avdulov NA, Chochina SV, Igbavboa U, Wood WG.** Distribution and fluidizing action of soluble and aggregated amyloid beta-peptide in rat synaptic plasma membranes. *J. Biol. Chem.* **274**: 18801-7 (1999).
- McDonald RE, Mossoba MM editors.** New techniques and applications in lipid analysis. *Chicago, Ill.: AOCS Press.* ISBN 0-93531-580-0. (1997).
- McKersie BD, Hoekstra FA, Krieg LC.** Differences in the susceptibility of plant membrane lipids to peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **1030**: 119-26 (1990).
- McLaurin J, Golomb R, Jurewicz A, Antel JP, Fraser PE.** Inositol stereoisomers stabilize an oligomeric aggregate of Alzheimer amyloid beta peptide and inhibit abeta-induced toxicity. *J. Biol. Chem.* **75**: 18495-502 (2000).
- McLaurin J, Yang D, Yip CM, Fraser PE.** Review: modulating factors in amyloid-beta fibril formation. *J. Struct. Biol.* **130**: 259-70 (2000).
- McParland VJ, Kad NM, Kalverda AP, Brown A, Kirwin-Jones P, Hunter MG, Sunde M Radford SE.** Partially unfolded states of β_2 -microglobulin and amyloid formation *in vitro*. *Biochemistry* **39**, 8735-8746 (2000).
- Meyer N, Rosenbaum V, Schmidt B, Gilles K, Mirenda C, Groth D, Prusiner SB, Riesner D.** Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids. *J. Gen. Virol.* **72**: 37-49 (1991).
- Mirzabekov T, Lin MC, Yuan WL, Marshall PJ, Carman M, Tomaselli K, Lieberburg I, Kagan BL.** Channel formation in planar lipid bilayers by a neurotoxic fragment of the beta-amyloid peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**: 1142-8 (1994)

- Mobius W, Ohno-Iwashita Y, van Donselaar EG, Oorschot VM, Shimada Y, Fujimoto T, Heijnen HF, Geuze HJ, Slot JW.** Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin. *J. Histochem. Cytochem.* **50**: 43-55 (2002).
- Mollova NN, Moore IM, Hutter J, Schram KH.** Fast atom bombardment mass spectrometry of phospholipids in human cerebrospinal fluid. *J. Mass. Spectrom.* **30**: 1405-20 (1995).
- Moss DJ, White CA.** Solubility and posttranslational regulation of GP130/F11--a neuronal GPI-linked cell adhesion molecule enriched in the neuronal membrane skeleton. *Eur. J. Cell Biol.* **57**: 59-65 (1992).
- Mudher A, Lovestone S.** Review: Alzheimer's disease--do tauists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosci.* **25**: 22-6 (2002).
- Murphy RC, Harrison KA.** Fast atom bombardment mass spectrometry of phospholipids. *Mass. Spectrom. Reviews* **13**: 57-75 (1994).
- Myher JJ, Kuksis A.** General strategies in chromatographic analysis of lipids. *J. Chromatogr. B* **671**: 3-33 (1995).
- Naslavsky N, Shmeeda H, Friedlander G, Yanai A, Futerman AH, Barenholz Y, Taraboulos A.** Sphingolipid depletion increases formation of the scrapie prion protein in neuroblastoma cells infected with prions. *J. Biol. Chem.* **274**: 20763-71 (1999).
- Naslavsky N, Stein R, Yanai A, Friedlander G, Taraboulos A.** Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J. Biol. Chem.* **272**: 6324-31 (1997).
- Nelson SR, Lyon M, Gallagher JT, Johnson EA, Pepys MB.** Isolation and characterization of the integral glycosaminoglycan constituents of human amyloid A and monoclonal light-chain amyloid fibrils. *Anal. Biochem.* **275**: 67-73 (1991).
- O'Brien JS, Sampson EL.** Fatty acid and fatty aldehyde composition of the major brain lipids in normal human gray matter, white matter, and myelin. *J. Lipid Res.* **6**: 545-51 (1965).
- Olive S, Dubois C, Schachner M, Rougon G.** The F3 neuronal glycosylphosphatidylinositol-linked molecule is localized to glycolipid-enriched membrane subdomains and interacts with L1 and fyn kinase in cerebellum. *J. Neurochem.* **65**: 2307-17 (1995).
- Olsson NU, Harding AJ, Harper C, Salem N Jr.** High-performance liquid chromatography method with light-scattering detection for measurements of lipid class composition: analysis of brains from alcoholics. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **681**: 213-8 (1996).
- Olsson NU, Salem Jr. N.** Molecular species analysis of phospholipids. *J. Chromatogr. B* **692**: 245-56. (1997).
- Palade GE.** The fine structure of blood capillaries. *J. Appl. Phys.* **24**: 1424 (1953).
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB.** Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 10962-6 (1993).
- Parton RG.** Caveolae and caveolins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**: 542-548 (1996).
- Patton GM, Fasulo JM, Robins SJ.** Separation of phospholipids and individual molecular species of phospholipids by high-performance liquid chromatography. *J. Lipid Res.* **23**: 190-6 (1982).
- Pauling L, Corey RB.** Configuration of polypeptide chains with favoured orientations around single bonds: two new pleated sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **37**: 729-740 (1951).
- Pauling L, Corey RB.** The structure of hair, muscle, and related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **37**: 261-271 (1951b).
- Pepys MB, Baltz ML.** Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv. Immunol.* **34**: 141-212 (1983).
- Petkovic M, Schiller J, Muller J, Muller M, Arnold K, Arnhold J.** The signal-to-noise ratio as the measure for the quantification of lysophospholipids by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Analyst.* **126**: 1042-50 (2001).

- Pike LJ, Han X, Chung KN, Gross RW.** Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. *Biochemistry* **41**: 2075-88 (2002).
- Pillot T, Goethals M, Vanloo B, Talusot C, Brasseur R, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Lins L.** Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* **271**: 28757-65 (1996).
- Pralle A, Keller P, Florin EL, Simons K, Horber JK.** Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* **148**: 997-1008 (2000).
- Pras M, Prelli F, Franklin EC, Frangione B.** Primary structure of an amyloid prealbumin variant in familial polyneuropathy of Jewish origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 539-42 (1983).
- Pras M, Schubert M, Zucker-Franklin D, Rimon A, Franklin EC.** The characterization of soluble amyloid prepared in water. *J. Clin. Invest.* **47**: 924-33 (1968).
- Pras M, Zaretzky J, Frangione B, Franklin EC.** AA protein in a case of "primary" or "idiopathic" amyloidosis. *Am. J. Med.* **68**: 291-4 (1980).
- Pras M, Zucker-Franklin D, Rimon A, Franklin EC.** Physical, chemical, and ultrastructural studies of water-soluble human amyloid fibrils. Comparative analyses of nine amyloid preparations. *J. Exp. Med.* **130**: 777-96 (1969).
- Prelli F, Pras M, Frangione B.** Degradation and deposition of amyloid AA fibrils are tissue specific. *Biochemistry* **26**: 8251-6 (1987).
- Preobrazhenskii RP, Evstigneeva RP.** The chemistry of biologically active natural compounds. *Khimiya Moscow* (1976).
- Prusiner SB.** Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**: 136-44 (1982)
- Prusiner SB, Bolton DC, Groth DF, Bowman KA, Cochran SP, McKinley MP.** Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* **21**: 6942-50 (1982a)
- Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan, KM, Groth D, Mirenda C, Torchia M, Yang SK, Serban D, Carlson GA.** Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* **63**: 673-86 (1990).
- Ramstedt b, Slotte JP.** Membran properties of sphingomyelins. *FEBS Lett* **30**: 531: 33-7 (2002).
- Raz A, Shiratori T, Goodman DS.** Studies on the protein-protein and protein-ligand interactions involved in retinol transport in plasma. *J. Biol. Chem.* **245**: 1903-12 (1970).
- Rehm H.** Der Experimentator: Proteinbiochemie, 2. Aufl., Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: G. Fischer. ISBN 3-437-25750-1 (1997).
- Riesner D.** Prionen-Krankheiten. *Chemie in unserer Zeit* **30**: 66-74 (1996).
- Riesner D.** The search for a nucleic acid component to scrapie infectivity. *Seminars Virol.* **2**: 215-26 (1991).
- Rochet JC, Lansbury PT Jr.** Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 60-68 (2000).
- Rokitansky K.** Handbuch der pathologischen Anatomie. *Wien: Braumüller & Seidel* **3**: 311 (1842).
- Romhányi G.** Selective differentiation between amyloid and connective tissue structures based on the collagen-specific topo-optical staining reaction with Congo red. *Virchows Arch. Abt. A. Path. Anat.* **354**: 209 (1971).
- Roth TF, Porter KR.** Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito. *Aedes aegypti.* *J. Cell Biol.* **20**: 313-330 (1964).
- Rouser G, Galli G, Kritchevsky G.** Lipid composition of the normal human brain and its variations during various diseases. *Pathol. Biol.* **15**: 195-200 (1967).
- Rouser G, Simon G, Kritchevsky G.** Species variations in phospholipid class distribution of organs. I. Kidney, liver and spleen. *Lipids* **4**: 599-606 (1969).

- Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ.** Scrapie amyloid (prion) protein has the conformational characteristics of an aggregated molten globule folding intermediate. *Biochemistry* **33**: 8375-83 (1994).
- Säger W, Röcken Ch.** Amyloid: Mikroskopischer Nachweis, Klassifikation und klinischer Bezug. *Pathologie* **19**: 345-354 (1998).
- Sanghera N, Pinheiro TJ.** Binding of prion protein to lipid membranes and implications for prion conversion. *J. Mol. Biol.* **315**: 1241-56 (2002).
- Saraiva MJ, Birken S, Costa PP, Goodman DS.** Amyloid fibril protein in familial amyloidotic polyneuropathy, Portuguese type. Definition of molecular abnormality in transthyretin (prealbumin). *J. Clin. Invest.* **74**: 104-19 (1984).
- Saraiva MJ.** Transthyretin mutations in hyperthyroxinemia and amyloid diseases. *Hum. Mutat.* **17**: 493-503 (2001).
- Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kubler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP.** Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 9407-11 (1995).
- Scherzinger E, Lurz R, Turmaine M, Mangiarini L, Hollenbach B, Hasenbank R, Bates GP, Davies SW, Lehrach H, Wanker EE.** Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates *in vitro* and *in vivo*. *Cell* **90**, 549-558 (1997).
- Schiller J, Arnhold J, Benard S, Muller M, Reichl S, Arnold K.** Lipid analysis by matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry: A methodological approach. *Anal. Biochem.* **267**: 46-56 (1999).
- Schiller J, Suss R, Petkovic M, Zschornig O, Arnold K.** Negative-ion matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectra of complex phospholipid mixtures in the presence of phosphatidylcholine: a cautionary note on peak assignment. *Anal. Biochem.* **309**: 311-4 (2002).
- Schleiden MJ.** Einige Bemerkungen über den vegetabilischen Fasertstoff und sein Verhältnis zum Stärkemehl. *Ann. Physiks und Chemie* **43**: 391 (1838)
- Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J.** Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell Biol.* **127**: 1217-1232 (1994).
- Schwartz P.** Amyloidosis: Cause and Manifestation of Senile Deterioration. *Springfield Illinois: Charles C Thomas* (1970).
- Scott TW, Voglmayr JK, Setchell BP.** Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. *Biochem. J.* **102**: 456-61 (1967).
- Selkoe DJ.** Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* **81**: 741-766 (2001).
- Serpell LC, Sunde M, Benson MD, Tennent GA, Pepys MB, Fraser PE.** The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* **200**, 1033-1039 (2000).
- Serpell LC, Sunde M, Fraser PE, Luther PK, Morris EP, Sandgren O, Lundgren E, Blake CC.** Examination of the structure of transthyretin amyloid fibrils by image reconstruction from electron micrographs. *J. Mol. Biol.* **254**, 113-118 (1995).
- Sheets ED, Lee GM, Simson R, Jacobson K.** Transient confinement of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in the plasma membrane. *Biochemistry* **36**: 12449-12458 (1997).
- Shibamoto M.** Lipid Chromatographic Analysis. *Marcel Dekker*, ISBN 0-8247-8941-5 (1994).
- Shirahama T, Cohen AS.** High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril. *J. Cell Biol.* **33**: 679-708 (1967).
- Shtrasburg S, Pras M, Langevitch P, Gal R.** Demonstration of AA-protein in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Am. J. Pathol.* **106**: 141-4 (1982).
- Sigurdsson EM, Wisniewski T, Frangione B.** Infectivity of amyloid diseases. *Trends Mol. Med.* **8**: 411-3 (2002).

- Simons K, Ikonen E.** Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-72 (1997).
- Simons K, Toomre D.** Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**: 31-9 (2000).
- Simons M, Keller P, Dichgans J, Schulz J.** Cholesterol and Alzheimer's disease: is there a link? *Neurology* **57**: 1089-1093 (2001).
- Singer SJ, Nicolson GL.** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731 (1972).
- Sipe JD, Cohen AS.** Review: history of the amyloid fibril. *J. Struct. Biol.* **130**: 88-98 (2000).
- Smaby JM, Momsen M, Kulkarni VS, Brown RE.** Cholesterol-induced interfacial area condensations of galactosylceramides and sphingomyelins with identical acyl chains. *Biochemistry* **35**: 5696-704 (1996).
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP.** Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell Biol.* **19**: 7289-304 (1999).
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85 (1985).
- Snow AD, Kisilevsky R.** Temporal relationship between glycosaminoglycan accumulation and amyloid deposition during experimental amyloidosis. A histochemical study. *Lab. Invest.* **53**: 37-44 (1985).
- Solomon A, Weiss DT, Pepys, MB.** Induction in mice of human light-chain associated amyloidosis. *Am. J. Pathology* **140**: 629-637 (1992).
- Soprano DR, Herbert J, Soprano KJ, Schon EA, Goodman DS.** Demonstration of transthyretin mRNA in the brain and other extrahepatic tissues in the rat. *J. Biol. Chem.* **260**: 11793-8 (1985).
- Sousa MM, Berglund L, Saraiva MJ.** Transthyretin in high density lipoproteins: association with apolipoprotein A-I. *J Lipid Res.* **41**: 58-65 (2000).
- Spira G, Bargellesi A, Teillaud JL, Scharff MD.** The identification of monoclonal class switch variants by sib selection and an ELISA assay *J Immunol Methods.* **74**: 307-15 (1984).
- Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, Prusiner SB.** Structural analysis of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* **32**: 1991-2002 (1993).
- Starcher B.** A ninhydrin-based assay to quantitate the total protein content of tissue samples. *Anal. Biochem.* **292**: 125-9 (2001).
- Sunde M, Blake CCF.** From the globular to the fibrous state: protein structure and structural conversion in amyloid formation. *Quart. Rev. of Biophys.* **31**: 1-39 (1999).
- Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake CCF.** Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* **273**: 729-739 (1997).
- Tan SY, Pepys MB.** Amyloidosis. *Histopathology* **25**: 403 - 414 (1994).
- Tennent GA.** Isolation and characterization of amyloid fibrils from tissue. *Methods Enzymol.* **309**: 26-47 (1999).
- Terzi E, Holzemann G, Seelig J.** Alzheimer beta-amyloid peptide 25-35: electrostatic interactions with phospholipid membranes. *Biochemistry* **33**: 7434-41 (1994).
- Terzi E, Holzemann G, Seelig J.** Self-association of beta-amyloid peptide (1-40) in solution and binding to lipid membranes. *J. Mol. Biol.* **252**: 633-42 (1995).
- Thompson D, Pepys MB, Tickle I, Wood S.** The structures of crystalline complexes of human serum amyloid P component with its carbohydrate ligand, the cyclic pyruvate acetal of galactose. *J. Mol. Biol.* **320**: 1081-6 (2002).
- Tomiyama T, Corder EH, Mori H.** Molecular pathogenesis of apolipoprotein E-mediated amyloidosis in late-onset Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci.* **56**: 268-79 (1999).

- Touchstone JC.** Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation. *J. Chromatogr. B* **671**: 169-95 (1995).
- van Buren M, Hene RJ, Verdonck LF, Verzijlbergen FJ, Lokhorst HM.** Clinical remission after syngeneic bone marrow transplantation in a patient with AL amyloidosis. *Ann Intern Med.* **122**: 508-10 (1995).
- van Oort MG, Dijkman R, Hille JD, de Haas GH.** Kinetic behavior of porcine pancreatic phospholipase A2 on zwitterionic and negatively charged single-chain substrates. *Biochemistry* **24**: 7987-93 (1985).
- Varma R, Mayor S.** GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* **394**: 798–801 (1998).
- Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, Anderson RG, Taraboulos A, Prusiner SB.** Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 14945-9 (1996).
- Vincent IJ, Davies PA.** protein kinase associated with paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **7**: 2878-82 (1992).
- Virchow R.** Über eine im Gehirn und Rückenmark aufgefundenene Substanz mit der chemischen Reaktion der Cellulose. *Virchows Arch.* **6**: 135 – 38 (1854).
- Virchow R.** Zur Cellulose-Frage. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* **6**: 416-426 (1854).
- Voet D, Voet JG.** Biochemie. 1. korrigierter Nachdruck der 1. Auflage 1992, Seiten 457-481. Weinheim: VCH. ISBN 3-572-29249-7 (1994).
- Vorm O, Roepstorff P.** Peptide sequence information derived by partial acid hydrolysis and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.* **12**: 734-40 (1994).
- Waite M.** Handbook of lipid research, vol 5, ed. D.J. Hanahan. New York: Plenum Press (1987).
- Waschuk SA, Elton EA, Darabie AA, Fraser PE, McLaurin JA.** Cellular membrane composition defines A beta-lipid interactions. *J Biol Chem.* **276**: 33561-8 (2001).
- Weihofen A, Binns K, Lemberg MK, Ashman K, Martoglio B.** Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science* **296**: 2215–2218 (2002).
- Werdelin O, Ranlov P.** Amyloidosis in mice produced by transplantation of spleen cells from casein-treated mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **68**: 1-18 (1966).
- Westermarck P, Sletten K, Johansson B, Cornwell GG 3rd.** Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **7**: 2843-5 (1990).
- Westermarck, P, Araki S, Benson M.D, Cohen AS, Frangione B, Masters CD, Saraiva MJ, Sipe JD, Husby G, Kyle RA, Selkoe D.** Nomenclature of amyloid fibril proteins. Report from the meeting of the International Nomenclature Committee on Amyloidosis, August 8-9, 1998. *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* **6**: 63-66 (1999).
- Willett WC, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Speizer FE, Rosner BA, Sampson LA, Hennekens CH.** Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *Lancet.* **341**: 581-5 (1993).
- Wuthier RE.** Two-dimensional chromatography on silica gel-loaded paper for the microanalysis of polar lipids. *J. Lipid Res.* **7**: 544-50 (1966).
- Yamada E.** The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**: 445–458 (1955).
- Yanagisawa K.** Cholesterol and pathological processes in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* **70**: 36-6 (2002).
- Yandrasitz JR, Berry G, Segal S.** High-performance liquid chromatography of phospholipids with UV detection: optimization of separations on silica. *J. Chromatogr.* **225**: 319-28 (1981)
- Yao JK, Rastetter GM.** Microanalysis of complex tissue lipids by high-performance thin-layer chromatography. *Anal. Biochem.* **150**: 111-6 (1985).

6. Anhang

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Tabelle 1: Überblick über Vorläufer und Fibrillenprotein und die mit ihnen assoziierten Krankheitenern.	3
Abb. 1.1: Röntgenbeugungsmuster und „cross β -structur“ der Amyloid-Fibrille.	5
Abb. 1.2: Strukturmodell einer Amyloidfibrille.	6
Abb. 1.3 „speckige“ Plaques bestehen überwiegend aus fibrillären Strukturen; Schematische Darstellung des Fibrillenaufbaus.	7
Abb. 1.4 Theoretische Modelle für die Prionreplikation.	9
Abb. 1.5: Überblick über die Lipidklassen und Kopfgruppen.	12
Abb. 1.6 Schematische Darstellung einer Plasmamembran und ihrer Phospholipidzusammensetzung.	13
Abb. 1.7 Hypothetisches Modell der Lipidorganisation in „raft“-Mikrodomänen.	15
Tabelle 2.1 Übersicht über die analysierten wasseraufgereinigten <i>ex vivo</i> Amyloid-Proben	19
Abb. 3.6: Micro-HPLC-Trennung von Lipidgemischen.	51
Abb. 3.3: 15 % Gelelektrophorese von <i>ex vivo</i> Amyloid-Proben mit Silberfärbung.	40
Tabelle 3.3: Übersicht über die Proteinkomponente der <i>ex vivo</i> Amyloide	44
Abb. 3.4 Schema der Lipidextraktion von Amyloidfibrillen nach Bligh und Dyer.	46
Abb. 3.5. Hochauflösende DC von Standards und physiologischen Lipidextrakten	48
Abb. 3.6: Micro-HPLC-Trennung von Lipidgemischen.	51
Abb. 3.7: Micro-HPLC: Einfluss der Salzkonzentration.	52
Abb. 3.8: MALDI-MS von Lipiden.	54
Tabelle 3.4: Detektionslimit von MALDI-MS einzelner Lipidklassen	55
Abb. 3.9: Hochauflösende DC von physiologischen Standards und Gesamtlipidextrakten aus <i>ex vivo</i> Amyloid-Fibrillen.	57
Abb. 3.10: Lipidklassenverteilung in 2 μ g Gesamtlipidextrakt aus <i>ex vivo</i> Amyloid-Proben und physiologischen Säuger-Gewebe.	59
Tabelle 3.5: Lipidklassenverteilung in Mol %: Proben: von Linke, Pras, PHF und physiologische Lipidstandards	61
Tabelle 3.6: Lipidgehalt der <i>ex vivo</i> Amyloid-Fibrillen in Prozent zur Einwaage.	62
Abb. 3.12: Langzeitlagerung polarer Membranlipide.	65

Abb. 3.13: Elutionsprofile polarer Membranlipide aus Lipidextrakten von <i>ex vivo</i> Amyloid-Proben.....	67
Tabelle 3.6: MALDI-MS: Detektierte molekulare Spezies einzelner Lipidklassen.....	68
Abb. 4.1: Natürlich vorkommende Gewebetypen und Membranen haben eine charakteristische Phospholipidkonstellation.	76
Abb. 4.2: Phospholipidkonstellation der <i>ex vivo</i> Amyloid-Proben und physiologischer Gewebe.	77
Abb. 4.3: In den Amyloid-Proben sind in überwiegendem Maßstab „raft“-Lipide zu finden.	81

Abkürzungsverzeichnis

Apo E	A polipoprotein E
BSE	B ovine S pongiforme E ncephalopathie
CD	C ircular d ichroismus
C/M	C hloroform/ M ethanol
Cryo-EM	C ryo- E lektronen m ikroskopie
DC	D ünnschicht c hromatographie
dest.	d estilliert (H ₂ O dest. = destilliertes Wasser)
DNA	„ d eoxyribonucleic a cid“ Desoxyribonukleinsäure
DHB	2, 5 D ihydroxy b enzoessäure, Matrix für MALDI-Massenspektrometrie
ESI	„ e lectrospray i onisation“, Ionisierungsverfahren der Massenspektrometrie
FAB	„ f ast a tom b ombardment“, Ionisierungsverfahren der Massenspektrometrie
GPI	G lycophosphatidyl i nositol
HPLC	„ h igh- p erformance l iquid c hromatography“, Hochdruckflüssigchromatography
HpTLC	„ h igh- p erformance t hin- l ayer c hromatography“, hochauflösende Dünnschichtchromatographie
IR	I nfrarot-Spekrometrie
kDa	k ilo D alton
L	Probenbezeichnung für die in der Arbeit untersuchten Proben von Prof. Linke steht immer vor der Abkürzung des jeweiligen Fibrillenproteins
LDL	L ow D ensity L ipoprotein
HDL	H igh D ensity L ipoprotein
LM	L auf m ittel bei der Dünnschichtchromatographie
m/m	Anteile M asse zu oder von M asse
m/z	Verhältnis von M asse zu Ladungszahl, nach dem Verhältnis werden bei der Massenspektrometrie die Ionen getrennt
MS	M assenspektrometrie
MALDI	M atrix- a ssistierte L aserdesorptions/ I onierungs, Ionisierungsverfahren der Massenspektrometrie
P	Probenbezeichnung für die in der Arbeit untersuchten Proben von Prof. Pras. steht immer vor der Abkürzung des jeweiligen Fibrillenproteins
PBS	„ p hosphate b uffered s aline“, Phosphatpuffer
PHF	„ p aired h elical f ilaments“ hyperphosphorylierte fibrillen des TAU-Protein
PK	P roteinkinase K

PrP	Prionprotein
R _f	„ retention factor “, Rückhaltefaktor einer bestimmten Substanz in chromatographischen Verfahren; Quotient aus Laufzeit der Substanz und Gesamtlaufzeit
SDS	„ sodium dodecyl sulfat “, Natriumlaurylsulfat
systeme	systemisch
TBS	„ tris-buffered saline “, Trispuffer (Tris = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien
u	„ unit “, Einheit der molaren Masse, in der Massenspektrometrie gebräuchlich 1u = 1 Dalton
v	variant
v/v	Anteile V olumen zu oder von V olumen
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
w	Wildtyp

POSTER:

Gellermann GP, Gührs K-H, Diekmann S, Appel TR. Separation of sub-microgram quantities of polar lipid classes by micro-HPLC. *42 International Conference on the Bioscience of Lipids, Bergen Norway* (2001).

Gellermann GP, Makovitzky J, Gührs K-H, Linke RP, Diekmann S, Appel TR. "Technical improvements for the analysis of lipids in amyloid. *IXth International Symposium on Amyloidosis, Budapest Ungarn* (2001).

Gellermann GP, Appel TR, Gührs K-H, Diekmann S. MALDI-MS: Steps towards quantitative molecular species analysis. *Summer Course on Mass Spectrometry in Biotechnology, Dubrovnik Kroatien* (2001).

PUBLIKATIONEN

Gellermann GP, Makovitzky J, Gührs K-H, Linke RP, Diekmann S, Appel TR. Technical improvements for the analysis of lipids in amyloid. *Proceedings of the IX. International Symposium on Amyloidosis, Budapest July 15-21, 1: 45-48* (2001).

Curriculum Vitae

Gerald Peter Gellermann

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum / -ort: 08.07.72 in Ettlingen

Familienstand: ledig

SCHULBILDUNG

1979 – 1983	Eichendorff-Grundschule in Rottweil
1983 – 1992	Albertus Magnus-Gymnasium in Rottweil (altsprachlich, humanistisch)

STUDIUM

1994 – 1996	Biologie an der Johannes-Gutenberg Universität Mainz
1996 – 1999	Hauptstudium an der Universität Konstanz Schwerpunkte im Hauptstudium: Neuro-, Entwicklungs-, und Molekular-Biologie
1999 – 2000	Diplomarbeit am Biochemischen Institut der Universität Zürich, Schweiz: „Expression von Calsyntenin-1 während der Entwicklung und in der adulten Maus“ unter der Leitung von Prof. P. Sonderegger
2000 – 2003	Anfertigung der Doktorarbeit am Institut für molekulare Biotechnologie, Abteilung Molekularbiologie, in Jena: „Raft“-Lipide und Cholesterol-Ester als Bestandteile von humanen <i>ex vivo</i> Amyloid-Fibrillen“ unter der Leitung von Prof. S. Diekmann. Stipendiat bei EXIST HighTEPP (EXIST High Technology Entrepreneurship Postgraduate Program)

Selbstständigkeitserklärung

- Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist, ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt habe und alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und benutzten Quellen angegeben habe.
- Alle Personen, die mich bei Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben, habe ich benannt.
- Ich habe nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen.
- Dritte Personen haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
- Die vorliegende Arbeit wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Sie wurde ebenso auch nicht als Dissertation bei einer anderen Hochschule eingereicht.

Jena, 6. Februar 2003

Gerald Gellermann

