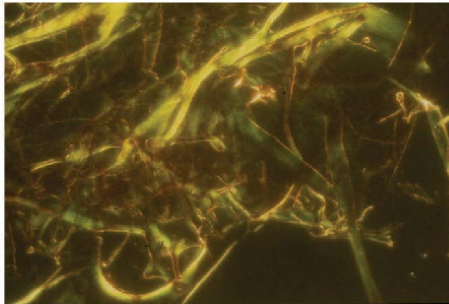




Gerald Gellermann (Autor)

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

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



Dissertation

von

Gerald Gellermann

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3245>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

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 Proteinefehlfaltung 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