

**Etablierung einer Methode zur Identifikation von
Carboxymethyllysin-Modifikation des Amyloid-beta-Peptids in Liquor
als Biomarker zur Früherkennung der Alzheimer-Erkrankung**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Maedeh Mirzadeh-Kruse

Betreuer*in: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Simm, Halle

Gutachter*innen: Prof. Dr. med. Ursula Müller-Werdan, Berlin
Prof. Dr. Dr. Maria Cristina Polidori, Köln

Datum der Verteidigung: 23.05.2023

Für meine Mutter Ingrid

Referat

Weltweit waren 2015 schätzungsweise 47 Millionen Menschen von Demenz betroffen. Aufgrund der demografischen Entwicklung wird eine starke Zunahme dieser Zahlen erwartet. Eine Top-Down-Berechnung der Demenzkosten durch das Statistische Bundesamt stellte fest, dass die jährliche Gesamtbelastung 2015 15 Mrd. € betrug. Alzheimer-Demenz (AD) ist mit ca. 70% die häufigste Demenzform. Von enormer Bedeutung ist somit eine zielgerichtete Früherkennung, da nur hierdurch bei frühen Formen der AD eine Behandlung effektiv zu einem verzögerten Krankheitsverlauf führt.

AD wird pathologisch u.a. durch die Anwesenheit seniler Plaques im Hirn charakterisiert, deren Hauptbestandteile aggregierte Amyloid Beta (A β)-Peptide sind. Die Aggregationen können durch Advanced Glycation Endproducts (AGEs) mitverursacht werden. Basierend auf der Krankheitspathologie sind zahlreiche Blut- und Liquortests für die Erkennung der AD in den letzten Jahren vorgeschlagen worden. Die Anwendung von Biomarkern ermöglicht sogar eine Vorhersage, welche Patienten mit einer milden Form einer kognitiven Dysfunktion AD entwickeln werden.

Wissenschaftliche Daten über mögliche AGE-Modifikationen des A β *in vivo* fehlen bisher. Wir etablierten eine Methode, wie AGE-modifiziertes A β mittels FACS detektiert werden kann. Anhand von Westernblot überprüften wir die Selektivität und Sensitivität von Antikörpern gegen Amyloid β in Abhängigkeit von einer AGE-Modifikation. Eine Bestätigung von *in vitro* AGE-modifiziertem A β erfolgte dann mithilfe alternativer immunologischer Methoden wie Slot-Blot und ELISA. Zum Schluss erprobten wir unseren Assay an Liquorproben. Es wurde deutlich, dass bei der AD-Gruppe fast doppelt so viel Carboxymethyllysin (CML)-modifiziertes A β vorhanden ist wie bei der Kontrollgruppe. Damit konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass in Liquor CML-modifiziertes A β vorhanden ist. CML-modifiziertes A β könnte somit als ein geeigneter Biomarker zur Frühdiagnostik der AD dienen und sollte in größeren Studien überprüft werden.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Demenz: Allgemeine Grundlagen.....	1
1.1.1	Definition und Formen.....	1
1.2	Epidemiologie der Demenz	1
1.2.1	Epidemiologie der Demenz in Deutschland.....	2
1.2.2	Gesellschaftliche Bedeutung.....	2
1.2.3	Pathophysiologie.....	4
1.2.3.1	Advanced Glycation Endproducts (AGEs)	5
1.2.3.2	Die Maillard-Reaktion	5
1.2.3.3	Hypothesen zur Entstehung einer AD.....	6
1.2.4	Diagnostik	7
1.2.4.1	Diagnosestellung.....	7
1.2.4.2	Biomarker.....	9
1.2.4.2.1	Probleme der verfügbaren Biomarker.....	11
1.3	Arbeitshypothese	12
1.3.1	Hintergrund	12
2	Zielstellung	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Material	16
3.1.1	Assay zum Nachweis fluoreszenz-markierter Anti-AGEs-Antikörper	21
3.1.2	Patientenkollektiv und Liquorproben	22
3.2	Methoden.....	23
3.2.1	Modifizierung von A β und Liquor in vitro.....	23
3.2.2	AGE-Fluoreszenzmessung	23
3.2.3	Tris-Tricin- und Tris-Glycin-Gele	23
3.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli	25
3.2.5	Western Blot und Slot-Blot	25
3.2.6	Immunodetektion.....	27
3.2.7	Silberfärbung der Polyacrylamidgele	28
3.2.8	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	28
3.2.9	Kopplung der Beads mit Anti-A β -Antikörper	29
3.2.10	Markierung der CML-Antikörper mit Lightning-Link™ B-Phycoerythrin Conjugation Kit.....	31

3.2.11	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Analysen	31
3.2.12	Statistik	32
4	Ergebnisse.....	33
4.1	AGE-Fluoreszenzmessung nach verschiedenen Zeitpunkten.....	33
4.2	Unmodifizierte und modifizierte A β -Detektion im Westernblot und Silberfärbung	35
4.3	Wahl der bindungsstärksten A β -Antikörper	38
4.3.1	Monoklonale Antikörper.....	38
4.3.2	Polyklonale Antikörper	41
4.4	Etablierung der Messung von AGE-modifiziertem A β -Peptid mittels Durchflusszytometrie	44
4.4.1	Etablierung einer CBA für die Analyse von AGE-modifiziertem A β -Peptid.	45
4.4.2	Optimierung des CBA-Assays für die CML-Detektion.....	47
4.4.3	Spiking-Experimente zur Detektion von in vitro modifiziertem A β -Peptid in Liquor	47
4.5	Etablierung des Messprotokolls für die Analyse von Kontroll-Proben und AD-Proben.....	51
4.6	Analyse von Kontroll- und AD-Patientenproben mittels CML-CBA Assay	52
5	Diskussion.....	53
5.1	Die Diagnostik-Methoden	53
5.1.1	Die CBA-Methode	53
5.1.2	Vergleich der Cytometric Bead Assay-Methode zu ELISA oder Westernblot.....	54
5.1.3	Hautautofluoreszenz und Korrelation mit MCI/AD	56
5.2	AGEs und Morbus Alzheimer	57
5.3	Limitationen der Methode.....	61
5.4	Perspektiven: Neuer Assay für die Diagnostik.....	61
6	Zusammenfassung.....	63
7	Literaturverzeichnis	65
8	Thesen der Dissertation.....	76
Anhang		

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
a.u.	arbitrary units
AB-3	Acrylamid-Bisacrylamid-3
AB-6	Acrylamid-Bisacrylamid-6
AD	Alzheimer-Demenz
AF	Autofluoreszenz
AGEs	Advanced Glycation Endproducts / fortgeschrittene Glykierungsendprodukte
AgNO ₃	Silbernitrat
Ak	Antikörper
APP	Amyloid Precursor Protein
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
A β	Amyloid β
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CBA	Cytometric Bead Array
CEF	collagenase-extractable fraction / Collagenase-lösliche Fraktion
CEL	N- ϵ -(carboxyethyl)lysin
CLF	Cholyl-Lys-Fluorescein
cm	Centimeter
CML	N- ϵ -(carboxymethyl)lysin
CSF	cerebro spinal fluid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DM	Diabetes mellitus
DMABA	Dimethylaminobenzaldehyd
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders / Diagnostischer und statistischer Leitfaden psychischer Störungen
DTT	1,4-Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay / Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EOAD	Early-Onset Alzheimer-Demenz
FACS	fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie

FDG-PET	Fluor-Desoxy-Glukose-Positronen-Emissions-Tomographie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GO	Glyoxal
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HAF	Hautautofluoreszenz
HbA1c	hemoglobin A 1 c, glykiertes Hämoglobin
HCHO	Formaldehyd
HCl	hydrochloric acid, Salzsäure
HFIP	Hexafluorisopropanol
HMGB1	High-Mobility Group Box 1
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	horseradish peroxidase
4-HyP	L-4-Hydroxyprolin
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, die 10. Revision der Klassifikation
IL	Interleukin
IWG	International Working Group
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	koronare Herzkrankheit
l	Liter
LOAD	Late-Onset Alzheimer-Demenz
M	molar [mol/l]
m	Milli
MCI	Mild Cognitive Impairment
MFI	Mean of fluorescence intensity / mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MGO	Methylglyoxal
min	Minuten
Mio	Million
Mrd	Milliarde
mM	Millimolar
MMST	Mini Mental Status Test

mod	Modifiziert
mRAGE	Membrangebundener Rezeptor für advanced glycation endproducts
MRT	Magnetresonanztomographie
μ	Mikro
n	Anzahl
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukloetid
NADPH	Nicotinamidadenindinukloetidphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NEM	N-Ethylmaleimide
NFT	Neurofibrilläre Tangles
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NIA-AA	National Institute of Aging-Alzheimer Association
NINCDS-ARDA	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet® P40 Substitute
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline / phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
pH	potential hydrogen
P-tau	phosphorylierte Tau-Protein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAGE	Rezeptor für advanced glycation endproducts
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay
ROS	Reaktive Oxygen Species (Sauerstoffspezies)
rpm	revolutions per minute / Umdrehungen pro Minute
s	Sekunden
SDS	sodium dodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
sRAGE	Soluble (löslicher) Rezeptor für advanced glycation endproducts
Sulfo-SMCC	Sulfosuccinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate]
TBS/TBS-T	Tris-Buffered Saline / Tris-Buffered Saline Tween® 20
TCA	Trichloressigsäure

TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
T-tau	Gesamttau-Protein
unmod	unmodifiziert
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VD	vaskuläre Demenz
w/v	Masse pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Demenz: Allgemeine Grundlagen

1.1.1 Definition und Formen

Demenz ist „ein Syndrom als Folge einer meist chronischen oder fortschreitenden Krankheit des Gehirns mit Störung vieler höherer kortikaler Funktionen, einschließlich Gedächtnis, Denken, Orientierung, Auffassung, Rechnen, Lernfähigkeit, Sprache und Urteilsvermögen. Das Bewusstsein ist nicht getrübt. Die kognitiven Beeinträchtigungen werden gewöhnlich von Veränderungen der emotionalen Kontrolle, des Sozialverhaltens oder der Motivation begleitet, gelegentlich treten diese auch eher auf“ (Hofmann 2012). Die meisten Demenzerkrankungen werden durch eine neurodegenerative Erkrankung verursacht, so dass zahlreiche Formen der Demenz unterschieden werden können. Die Alzheimer-Demenz ist mit ca. 60-70% der Krankheitsfälle die häufigste Form. Andere häufige neurodegenerativbedingte Formen sind die Frontotemporale Demenz (10%), die Parkinson-Demenz und die Lewy-Körperchen-Demenz. Weniger häufige neurodegenerative Erkrankungen wie die Progressive Supranukleäre Paralyse, die kortikobasale Degeneration, Multisystematrophie und die Huntington-Krankheit, können ebenfalls mit Demenz assoziiert sein. Nicht-neurodegenerative Demenzen können reversibel sein oder in ihrem Fortschreiten gestoppt werden, wenn deren Ursache identifiziert und angemessen behandelt wird. Hierbei ist die vaskuläre Demenz die häufigste Form (Khan et al. 2016).

1.2 Epidemiologie der Demenz

2015 waren weltweit schätzungsweise 47 Millionen Menschen von Demenz betroffen, wobei sich diese Zahl in Perioden von 20 Jahren verdoppelt. Demnach wären 2030 75 Millionen und 2050 131,5 Millionen Personen betroffen. Mit steigender Tendenz sind Demenzerkrankungen in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen zu registrieren (aktuell 58% registrierter Demenzfälle) (Prince et al. 2015). Weltweit gibt es jedes Jahr über 9,9 Millionen neue Fälle von Demenz, was bedeutet, dass alle 3,2 Sekunden ein neuer Fall auftritt (Prince et al. 2015). Die Alzheimer-Demenz (AD) tritt mit zunehmendem Alter auf. Die Prävalenzrate von Demenz steigt zwischen 65 und 90 Jahren annähernd exponentiell mit einer Verdoppelung nach jeweils fünf Altersjahren an (Bickel 2000). In den Vereinigten Staaten lebten 2010 schätzungsweise 4,7 Millionen Menschen über 65 Jahre mit klinisch manifester AD. Darunter waren 2,3 Millionen (51%) im Alter von 75 bis 84 Jahren und 1,8 Millionen (42%) Menschen ab 85 Jahren

(Hebert et al. 2013). AD ist auch bei < 65-Jährigen mit 34% die häufigste Demenzform, gefolgt von der vaskulären Demenz (18%), der frontotemporalen Demenz (12%) und alkoholbedingter Demenz (10%). Die genetische Form von AD mit autosomal dominanten Mutationen im A β -Vorläuferprotein, Presenilin 1 und 2, machen weniger als 5% aus (van der Flier und Scheltens 2005).

1.2.1 Epidemiologie der Demenz in Deutschland

Die Zahl der Erkrankten in Deutschland betrug Ende 2018 ca. 1,6 Millionen Menschen (Bickel 2020). Jedes Jahr werden ca. 300.000 neue Demenzfälle diagnostiziert (Michalowsky et al. 2019). Etwas mehr als 1% der 65- bis 69-Jährigen und rund 40% der über 90-Jährigen leiden an einer Demenz. Die durchschnittliche Gesamtprävalenz der Demenz bei den über 65-Jährigen liegt bei ca. 8,6% (Bickel 2020). Die Zahl der über 65-Jährigen Deutschlands hat sich im 20. Jahrhundert vervierfacht, während sich im gleichen Zeitraum die über 80-Jährige Bevölkerung verelfacht hat (Bickel 2000). Diese Zahlen werden aufgrund der demografischen Entwicklung noch stark zunehmen.

1.2.2 Gesellschaftliche Bedeutung

In den USA ist Demenz eine häufige Todesursache bei älteren Erwachsenen. In einer großen Studie bei ca. 23.000 Über-65-Jährigen verursachten 15 Krankheiten 70% aller Todesfälle. Dabei war Demenz die zweithäufigste Todesursache nach Herzinsuffizienz und machte 14% der Todesfälle aus (Tinetti et al. 2012). Die Sterblichkeit aufgrund von AD in den USA stieg zwischen 2000 und 2010 um 39% (Tejada-Vera 2013). Die Pflegekosten liegen zwischen 157 und 215 Milliarden Dollar und werden sich bis 2040 voraussichtlich mehr als verdoppeln (Hurd et al. 2013).

Das deutsche Gesundheitswesen hat insgesamt ca. 15 Milliarden € im Jahr 2015 für die Behandlung von Demenzen ausgegeben (Statistisches Bundesamt 2019). Eine deutsche Studie bei ca. 36.000 Alzheimer-Demenz Patienten ermittelte die direkten Kosten für 3 Patientengruppen. Bei Patienten, die mit Psychopharmaka und/oder Beruhigungsmitteln/Hypnotika behandelt werden, fallen im Durchschnitt direkte Kosten in Höhe von 7.948 bis 13.099 €/Jahr pro Patienten an. Nach 5 Jahren befinden sich 25% der Patienten in der stationären Versorgung, 1% in der stationären Teilversorgung, 5% in der ambulanten Behandlung, während ca. zwei Drittel sterben und 4% keine Pflege benötigen. Auch Patienten, die ohne Medikamente behandelt werden, verursachen Kosten, und zwar zwischen 6.760 € und 9.926 €. Patienten, die Memantine erhalten, kosten am wenigsten, zwischen 6.100 € und 8.376 € (Kiencke et al. 2011).

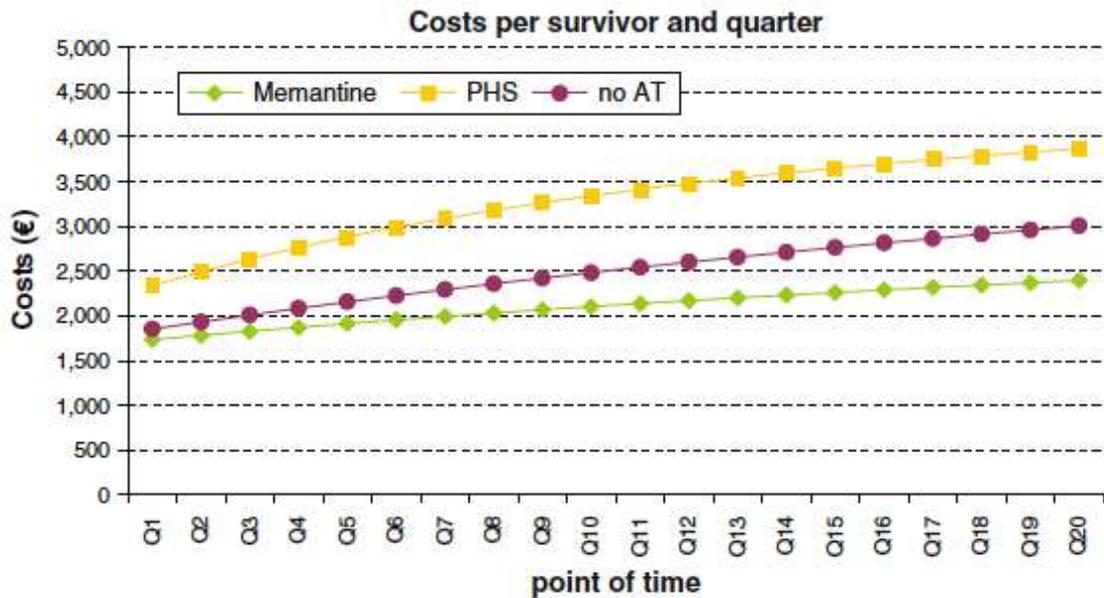


Abbildung 1: Verursachte Kosten pro überlebendem AD-Patienten pro Quartal in Deutschland. 3 Gruppen: Memantine-Gruppe, Psychopharmaka-Gruppe (PHS), Gruppe ohne medikamentöse Therapie (no AT) (Quelle: Kiencke et al. 2011)

Die jährlichen direkten und indirekten Gesamtkosten der AD belaufen sich auf etwa 13.080 € (Reese et al. 2011), obwohl eine andere Studie sie auf ca. 44.000 € beziffert (Hallauer et al. 2000). Aus der Perspektive der Kostenträger betragen die durchschnittlichen jährlichen Pro-Kopf-Kosten der Patienten mit Demenz 20.658 € und aus der gesamtgesellschaftlichen Sicht 44.659 € (Michalowsky et al. 2019). Erwartungsgemäß ist die schwere Demenz (MMSE-Wert 0-10) mit höheren Kosten verbunden (Abbildung 2).

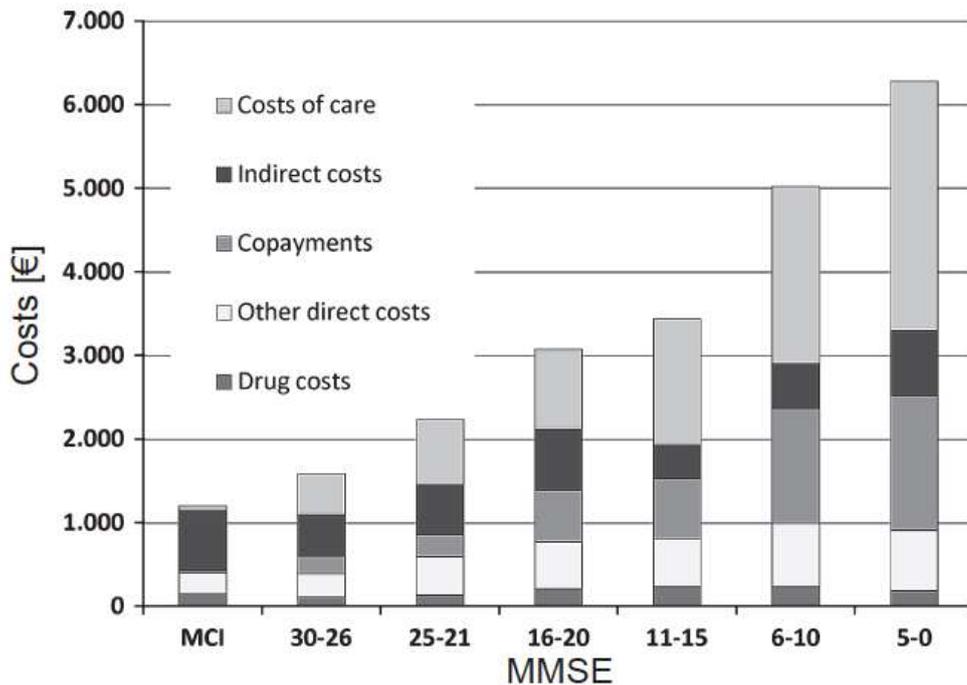


Abbildung 2: Gesamt- und Einzelkostendarstellung pro Patient nach Schweregrad der kognitiven Beeinträchtigung (Score auf der MMSE = Mini Mental State Examination, optimaler Wert: 30 Punkte. (Quelle: Reese et al. 2011))

1.2.3 Pathophysiologie

AD wird histopathologisch durch die Anwesenheit seniler Plaques und neurofibrillärer Ablagerungen im Gehirn (d.h. in Cortex, Hippocampus, Amygdala und anderen für die Gedächtnisfunktion wichtigen Bereichen), sowie in den zerebralen Blutgefäßen charakterisiert. Die extrazellulären Proteinablagerungen der Plaques bestehen aus Amyloid-Beta-Peptid (A β) und die intrazellulär gelegenen Neurofibrillenbündel aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein, welches akkumuliert und zu gepaarten helikalen Filamenten aggregiert. Dies führt zum Neuronenverlust, sodass es im Verlauf zu einer Hirnatrophie kommt. Das Amyloid-beta-Peptid besteht aus 39-42 Aminosäuren, wobei A β 40 und A β 42 die *in vivo* am häufigsten vorkommenden Formen sind. Das längere Peptid stellt die pathogenere Form dar, da es durch die C-terminalen Aminosäuren Alanin und Isoleucin hydrophober ist und schneller aggregiert. Aus diesem Grund ist A β 42 der Hauptbestandteil der senilen Plaques (Fukumoto et al. 1996). Auch bei anderen Krankheiten wie z.B. der Creutzfeld-Jakob-Erkrankung sind Akkumulation von Proteinen in Form einer Amyloidose zu finden (Namba et al. 1991).

1.2.3.1 Advanced Glycation Endproducts (AGEs)

AGEs sind Produkte der irreversiblen Glykierung von Proteinen. Gebildet werden sie durch die Reaktion der Keton- oder Aldehydgruppen eines Zuckers mit freien Aminogruppen von Aminosäuren. AGEs gehen aus Aminosäuren, Proteinen und Lipoproteinen hervor (Fournet et al. 2018). AGEs können über mehrere Pathomechanismen die Organfunktion einschränken. Sie können oxidativen Stress auslösen, der neurodegenerative Prozesse beschleunigt, und somit zur Entwicklung der Alzheimer-Krankheit auch indirekt beitragen. AGEs sind gegenüber proteolytischen Prozessen resistent und induzieren die Vernetzung (Cross-Linking) von Polypeptiden. Da durch AGE-Modifikationen der Abbau von Proteinen sowohl über das Proteasom wie auch über Metalloproteinasen gestört wird, ist eine Anreicherung der Modifikationen mit zunehmendem Alter zu beobachten. Langlebige Proteine sind davon besonders betroffen. Matrixproteine wie Kollagen oder Elastin sind ein bekanntes Ziel der Modifikationen. Diese führen in den meisten Fällen auch zum Cross-Linking wie z.B. beim Kollagen und über diesen Mechanismus zur Gewebsversteifung bzw. Plaquebildung (Fournet et al. 2018).

Es konnten hohe Konzentrationen an AGEs in den senilen Plaques und neurofibrillären Knäueln bei Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden (Guillozet et al. 2003). Im vaskulären System führt eine Anreicherung an AGEs in den Matrixproteinen zur Versteifung der Gefäßwände mit entsprechender Abnahme der Funktionalität. Auf molekularer Ebene wird die Wirkung von AGEs zum Teil auch durch die Bindung an deren Rezeptoren in den Endothelzellen (z.B. den Rezeptor für AGEs = RAGE) ausgelöst, was eine Kaskade von Signalen auslöst und zur endothelialen Dysfunktion beiträgt (Chen et al. 2016; Fournet et al. 2018).

1.2.3.2 Die Maillard-Reaktion

Die Reaktionen von Zuckern mit Aminogruppen (als Bestandteile von Aminosäuren, Aminen oder Proteinen) ergeben eine Vielzahl von Reaktionsprodukten unter Zwischenschaltung einer komplexen Reihe von Reaktionen, die zusammen als Maillard-Reaktion bekannt sind. Unter physiologischen Bedingungen ergeben die anfänglichen Reaktionen der Carbonylgruppen der reduzierenden Zucker mit den freien Aminogruppen der Proteine (insbesondere derjenigen Proteine, die Lysin-, Tryptophan-, Histidin- und Argininreste enthalten) Schiff-Basen, die Amadori-Umlagerungen unterliegen (Münch et al. 1999). Diese Reaktionsstufe wird üblicherweise als Glykierung bezeichnet. Weitere oxidative Zersetzungen der glykierten Proteine (Glykoxidationen) ergeben reaktive α -Dicarbonylverbindungen mit niedrigem Molekulargewicht, die weiter

mit Proteinen reagieren können, um vernetzte Proteine zu ergeben. Diese entstandenen Protein-Modifikationen sind als Advanced Glycation End Products (AGEs) bekannt.

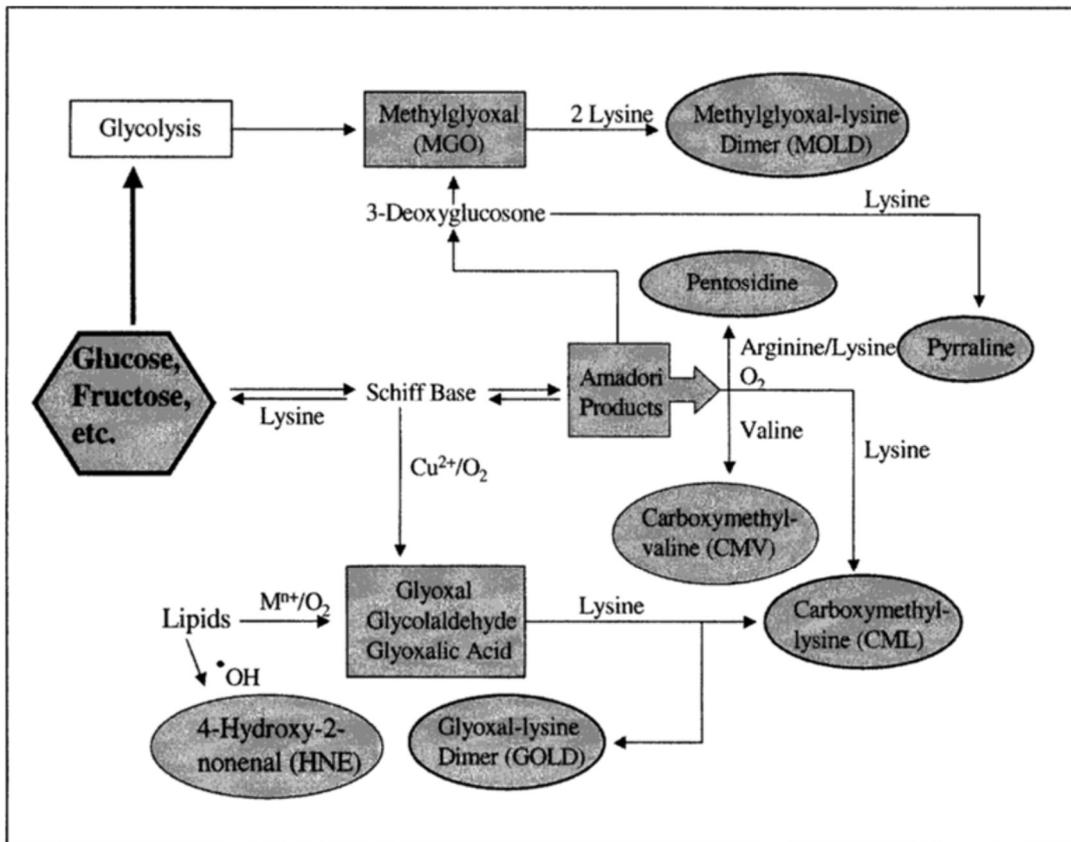


Abbildung 3: Die Maillard-Reaktion (Quelle: Reddy et al. 2002)

Viele AGEs sind fluoreszierende und intensiv gefärbte Verbindungen (typische Anregung bei 360 nm und Emission bei 440 nm) (Yanagisawa et al. 1998). Die Maillard-Reaktionen werden auch als "Bräunungsreaktionen" bezeichnet, da sie zu einer Vielzahl von "Bräunungsprodukten" führen, die den Geschmack und das Aroma gekochter Lebensmittel verbessern. Es ist bekannt, dass einige Maillard-Produkte in vitro starke antioxidative Eigenschaften aufweisen. In Gegenwart von redoxaktiven Übergangsmetallionen wirken die Maillard-Produkte jedoch als Prooxidationsmittel (Fournet et al. 2018).

1.2.3.3 Hypothesen zur Entstehung einer AD

1. Die Amyloid-Hypothese geht davon aus, dass bei unsachgemäßer proteolytischer Verarbeitung des Vorläuferproteins Amyloid Precursor Protein (APP) das A β -Peptid als Hauptbestandteil der senilen Plaques entsteht. Vor allem A β 42 ist die neurotoxische Form, die für die Bildung von senilen Plaques verantwortlich gemacht wird.

2. Die neurofibrilläre Tangles (NFT)-Hypothese macht die intrazelluläre Aggregation der hyperphosphorylierten Tau-Proteine und die dadurch verursachte Beeinträchtigung der Mikrotubuli-Funktion sowie den Zusammenbruch des Zytoskeletts der Nervenzelle für die Entstehung von NFT bei AD verantwortlich. Sie bestehen meist aus gepaarten helikalen Filamenten aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein.

3. Die Hypothese des glymphatischen Systems beinhaltet, dass die Clearance der Moleküle aus dem Gehirnparenchym zwischen der Zerebrospinalflüssigkeit, der interstitiellen Flüssigkeit, der intrazellulären Flüssigkeit und dem Blut von einem funktionierenden Druck und Fluss des Liquors abhängig sind. Mögliche gestörte Expression von Aquaporin 4 bei astrozytären Wasserkanälen kann für die Aggregation von A β im Gehirn verantwortlich sein. Die effektivste Funktion des glymphatischen Systems findet während des Schlafes statt.

4. Die Dopaminerge Hypothese besagt, dass verminderte Dopaminrezeptor 1- und Dopaminrezeptor 2-Konzentrationen bei AD-Patienten zu einer dopaminergen Dysregulation führt. Der Verlust von dopaminergen Neuronen im ventralen tegmentalen Areal reduziert die Gedächtnisfunktion (Rabbito et al. 2020).

1.2.4 Diagnostik

1.2.4.1 Diagnosestellung

Es gibt 2 Formen von AD: Die seltenere Form, auch präsenile oder Early-Onset AD (EOAD) genannt, mit einer stark genetischen Komponente, die häufig zwischen dem 40. und 65. Lebensjahr auftritt. Die häufigere sporadische senile AD, die nach dem 65. Lebensjahr auftritt, wird Late-Onset AD (LOAD) genannt. In beiden Fällen wird die Diagnose zu einem späteren Zeitpunkt als der Beginn der Alzheimerpathologie gestellt (Rabbito et al. 2020). Da die Demenz erst später auftritt, sollte zwischen Alzheimererkrankung und Alzheimer-Demenz unterschieden werden (Abbildung 4). Entscheidend für die Erstdiagnose ist die Entstehungsgeschichte der dementiellen Symptomatik mit Bezug zu bereits bestehenden somatischen und psychischen Krankheiten. Generell sollte AD bei jedem älteren Erwachsenen ab dem 65. Lebensjahr mit schleichendem Beginn, fortschreitendem Gedächtnisverlust und mindestens einer anderen kognitiven Domäne, die zu Funktionsstörungen führt, vermutet werden.

Alzheimerdemenz

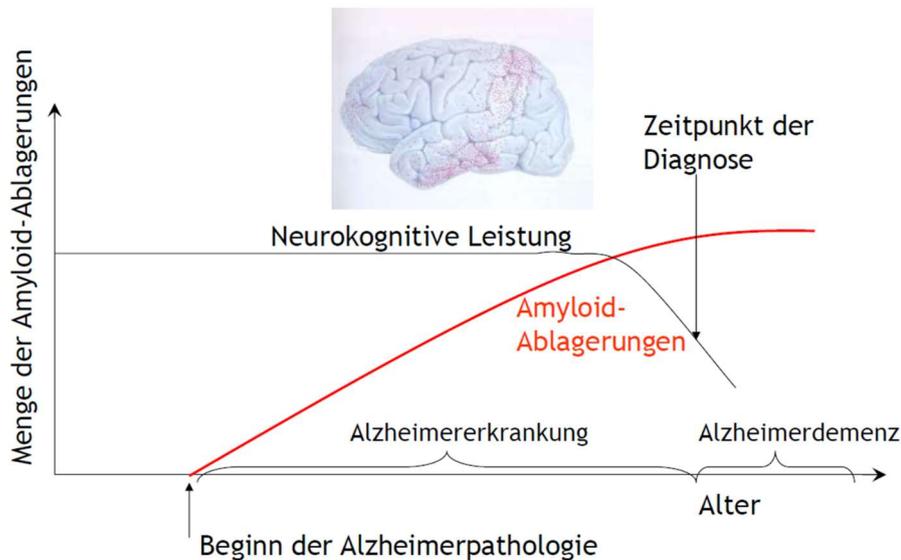


Abbildung 4: Zeitpunkt der Diagnose. Es wird zwischen Alzheimererkrankung (nach Beginn der Alzheimerpathologie und vor dem Auftreten der Demenz) und Alzheimer-Demenz unterschieden (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Thomas Duning 2016)

Die endgültige Diagnose einer AD erfordert eine histopathologische Untersuchung, die selten durchgeführt wird. In der Praxis werden für die Diagnose von AD klinische und kognitive Kriterien verwendet. Hier sind die Kriterien des National Institute of Aging-Alzheimer Association (NIA-AA) sowie die Kriterien der International Working Group (IWG) zu erwähnen. Die NIA-AA Kriterien beinhalten: (a) Beschwerden über nachlassende kognitive Leistung, (b) einen objektiven Nachweis einer Beeinträchtigung in einem oder mehreren kognitiven Bereichen unklarer Genese, (c) den Erhalt der Unabhängigkeit im täglichen Leben und (d) den Ausschluss relevanter körperlicher Ursachen (Albert et al. 2011). Falls die Kriterien erfüllt sind, können biologische Marker zur Bestätigung der Diagnose angewendet werden. Bei den IWG-Kriterien werden Biomarker und Bildgebungsmarker für die Diagnose der Alzheimer-Erkrankung berücksichtigt. Hauptunterschied ist, dass der Begriff der Demenz wegfällt, da man hier über Alzheimer-Krankheit spricht. Dies ist wichtig, weil es auch prodromale Stadien und milde Formen der Erkrankung wie die leichte kognitive Störung (MCI: mild cognitive impairment) umfasst. Der Begriff MCI ist strittig, da eine leichte Symptomatik der Alzheimer-Krankheit eine andere Krankheitsentität als die Demenz im fortgeschrittenen Stadium darstellt. Außerdem beinhaltet er keine ätiologische Zuordnung, obwohl die jährliche Konversionsrate zur Alzheimer-Demenz zwischen 20% und 38% geschätzt wird (Damian et al. 2013).

1.2.4.2 Biomarker

Biomarker stellen kennzeichnende biologische Merkmale dar, sie sind objektiv messbar und liefern Hinweise auf einen normalen biologischen oder krankhaften Prozess im Körper. Es kann sich um Zellen, Gene, Genprodukte, Enzyme oder Hormone handeln. Es gibt mehrere Biomarker, die auf den molekularen und degenerativen Prozess von AD hinweisen können und damit der Frühdiagnose dienen. In der Regel werden sie in Körperflüssigkeiten nachgewiesen und quantifiziert. In AD werden die Biomarker je nach Körperflüssigkeit zu Liquor-, Blut- und Saliva-Biomarker klassifiziert. Es wird auch zwischen Markern für Amyloid-Deposition und Markern für Neurodegeneration unterschieden. Die wichtigsten molekularen Biomarker der A β -Peptidablagerung sind niedriges A β 42 oder das niedrige Verhältnis von A β 42 zu A β 40 im Liquor. Zu den Biomarkern der Tau-Ablagerung (eine Schlüsselkomponente von neurofibrillären Verwicklungen) gehören das Gesamtau-Protein (T-tau) und das phosphorylierte Tau-Protein (P-tau).

Zusätzlich zu diesen molekularen Biomarkern gibt es mehrere topografische oder degenerative Biomarker, die zur Bewertung der nachgeschalteten Gehirnveränderungen verwendet werden und mit der regionalen Verteilung der neuronalen Dysfunktion sowie dem eventuellen Absterben der Neuronen im Zusammenhang mit AD korrelieren (Dubois et al. 2010). Dazu gehören eine mediale Atrophie des Temporallappens im MRT und ein verringerter Glukosestoffwechsel in den temporoparietalen Regionen im FDG-PET. Die PET-Diagnostik ist zwar zuverlässig, für eine Behandlung detektiert sie jedoch Krankheiten zu spät und ist zudem kostenintensiv. Im Allgemeinen sind die topografischen Biomarker weniger spezifisch als die molekularen Biomarker, korrelieren jedoch besser mit dem Auftreten klinischer Symptome. Die molekularen Biomarker sind besser zur Frühdiagnose. Es wurde gezeigt, dass der A β 42-Spiegel im Liquor 25 Jahre vor dem Auftreten der Symptomatik zu sinken beginnt, und mindestens 9 Jahre vor dem Auftreten der Demenz ein Plateau erreicht. Der Tau-Protein-Spiegel steigt etwa 15 Jahre vor dem erwarteten Auftreten von Symptomen (Bateman et al. 2012; Stomrud et al. 2015). Die wichtigsten Liquor- sowie Blut-Biomarker, deren Mechanismus, Effekt sowie Sensitivität und Spezifität werden in Tabelle 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 1: Liquor-Biomarker für AD und ihre Sensitivität/Spezifität (Quelle: Bălașa et al., 2020)

Mechanism of AD Pathology	CSF Biomarker	Change in AD Pathology	Sensitivity	Specificity
A β plaque deposition	A β ₄₂	↓	0.69–0.81	0.44–0.89
	A β ₄₀	-	0.72	0.39
	A β ₃₈	-	0.63	0.56
	A β ₄₂ /A β ₄₀	↑ [sic]	0.81–0.93	0.60–1
	A β ₄₂ /A β ₃₈	↑ [sic]	0.92	0.89
tau pathology	T-tau	↑↑	0.74–0.77	0.70–0.75
	P-tau	↑	0.66–0.73	0.63–0.82
neuronal injury	NFL	↑	0.81	0.79
synaptic dysfunction and/or loss	neurogranin	↑	0.73	0.84
	BACE1	↑	0.87	0.63
	synaptotagmin	↑	n.r.	n.r.
	SNAP-25	↑	n.r.	n.r.
	GAP-43	↑	n.r.	n.r.
	synaptophysin	↑	n.r.	n.r.
neuroinflammation	sTREM2	↑	n.r.	n.r.
	YKL-40	↑	0.77–0.85	0.81–0.84

n.r.—not reported; ↓—decrease; ↑—increase; ↑↑—high increase.

Tabelle 2: Blut-Biomarker für AD und ihre Sensitivität/Spezifität (Quelle: Bălașa et al., 2020)

Mechanism of AD Pathology	Blood Biomarker	Change in AD Pathology	Sensitivity	Specificity
A β plaque deposition	A β ₄₂	↓	0.82	0.77
	A β ₄₀	↓	n.r.	n.r.
	A β ₄₂ /A β ₄₀	↓	0.75	0.77
tau pathology	T-tau	↑	0.62	0.54
	P-tau	↑	n.r.	n.r.
	GSK-3 β	↑	n.r.	n.r.
	DYRK1A	↓	n.r.	n.r.
neuronal injury	NFL	↑	0.86	0.76
inflammation	IL-1, IL-4, IL-6, and IL-10	↑	n.r.	n.r.
	cytokine I-309	↑	n.r.	n.r.
	interferon- γ	↑	n.r.	n.r.
	TNF- α	↑	n.r.	n.r.
apoptosis	clusterin	↑	0.76	0.63

n.r.—not reported; ↓—decrease; ↑—increase.

Da es für die biomarkerbasierte Früherkennung der AD im MCI-Stadium in Deutschland bisher keine Leitlinienempfehlungen gibt, fassten Rostamzadeh und Jessen die Empfehlungen einer multidisziplinären europäischen Arbeitsgruppe zusammen. Nach der klinischen Untersuchung und neuropsychologischen Testung sollte bei Verdacht auf MCI weiterführende Diagnostik wie Blutuntersuchung, Bildgebung und Biomarkerdiagnostik erfolgen (s. Tabelle 3). Eine geringe Wahrscheinlichkeit für eine AD besteht bei unauffälligen Amyloid- und Tau-Biomarkern. Eine mittlere Wahrscheinlichkeit für AD, wenn entweder die Amyloid-Biomarker oder nur die Tau-Biomarker auffällig sind. Eine hohe Wahrscheinlichkeit für AD, wenn sowohl Amyloid- als auch Tau-Biomarker pathologisch sind (Rostamzadeh und Jessen 2020).

Tabelle 3: Einteilung der Biomarker für die AD (Quelle: Rostamzadeh und Jessen 2020)

A Marker für die Amyloid-Pathologie	β -Amyloid ₁₋₄₂ bzw. die β -Amyloid _{42/40} -Ratio im Liquor Amyloid-Deposition im Amyloid-PET
T Marker für die Tau-Pathologie	pTau-Protein im Liquor Tau-Deposition im PET (derzeit nur für Forschungszwecke)
N Marker für die Neurodegeneration	tTau-Protein in Liquor Mediale Temporallappen-/Hippokampusatrophie bzw. Reduktion der kortikalen Dicke (AD-Signatur) im MRT Hypometabolismus im medialen Parietallappen (Präkuneus), in den temporoparietalen bzw. den frontalen Hirnarealen im ¹⁸ F] FDG-PET

pTau phosphoryliertes Tau, *tTau* gesamtes Tau, *MRT* Magnetresonanztomographie, *PET* Positronenemissionstomographie, *FDG* Fluordesoxyglucose

1.2.4.2.1 Probleme der verfügbaren Biomarker

Laut dem Konsensus der Working Group on Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's sollten Biomarker von AD mindestens 80% Sensitivität und Spezifität beim Nachweis neuropathologisch bestätigter AD Fälle haben (Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group 1998). Der wichtigste Nachteil der verfügbaren Liquor-Biomarker ist die niedrige Sensitivität sowie Spezifität, was zum Risiko der Überdiagnose oder der verspäteten Diagnose führt. Überdies sind die Methoden kostenintensiv und relativ invasiv. Da spezifische Tests der Krankheitsstudien fehlen, werden im Allgemeinen die Patienten spät diagnostiziert, was eine große Belastung für die Gesundheitssysteme darstellt (Bălașa et al. 2020).

Die Anwendung vom Blut-Biomarker in der klinischen Praxis ist aufgrund einer Reihe von biologischen und technischen Gründen, neben der niedrigen Sensitivität und Spezifität, noch nicht zuverlässig. Das Zentralnervensystem ist eine isolierte Umgebung,

sodass die Konzentration der potenziellen Biomarker im Blut relativ niedrig sein könnte, da sie die Blut-Hirn-Schranke als intakte Moleküle überschreiten müssten (Hampel et al. 2018). Zusätzlich kann das Volumenverhältnis zwischen dem Blut und dem Liquor zu einer signifikanten Verdünnung der Biomarker führen (Zetterberg und Blennow 2018). Das ist wichtig, da die Blut-Hirn-Schranke bei präklinischen Stadien nicht betroffen ist. Da Blut eine hochkomplexe Flüssigkeit ist, die verschiedene Moleküle und Zellen umfasst, können unspezifische Biomarker, wie z.B. Akutphasenproteine, durch andere Quellen als das Zentralnervensystem exprimiert werden (Zetterberg und Blennow 2018). Darüber hinaus könnte die Vielzahl der im Blut vorhandenen Proteine und heterophilen Antikörper die Analyse verfälschen. Zusätzlich können Blut-Biomarker proteolytischem Abbau in der Leber oder im Plasma unterliegen, der ihre Konzentration weiterhin wesentlich senken würde (Zetterberg und Blennow 2018; Hampel et al. 2018). Die Entwicklung neuartiger Methoden zur Früherkennung und genauen Diagnose der Alzheimerkrankheit ist daher unerlässlich.

1.3 Arbeitshypothese

1.3.1 Hintergrund

Grundannahme der Forschung ist es, dass Früherkennung von Alzheimer der Schlüssel zur Verhütung, Verlangsamung und Beendigung der Krankheit sein wird. Basierend auf der Krankheitspathologie sind zahlreiche Blut- und Liquortests für die Erkennung der AD vorgeschlagen worden. In den letzten Jahren hat sich die biomarkerbasierte Diagnostik rasant weiterentwickelt. A β - und Tau-Protein spielen dabei eine zentrale Rolle. Allerdings finden sie noch keinen Einzug in die klinische Routinediagnostik (Häckel 2021). Deshalb ist es weiterhin erforderlich, kosteneffektivere und geeignetere Tests für die frühe Diagnose und die Verlaufskontrolle von AD zu entwickeln. Eine Verbindung zwischen AGEs und A β wurde durch die Entdeckung von RAGE (receptor for advanced glycation end products) als Rezeptor für A β bekräftigt (Du Yan et al. 2009). RAGE wurde erstmals 1994 als Rezeptor für AGE beschrieben (Wautier et al. 1994). Die Interaktion zwischen AGE und ihrem Zellrezeptor RAGE erzeugt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) durch Aktivierung von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid Phosphat (NADPH)-Oxidase, die wiederum den Nuklearfaktor-kappa B (NF-kB) aktiviert. NF-kB aktiviert zahlreiche Zytokin-Gene, wie den Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin (IL)-1, IL-6, und IL-8. Proinflammatorische Zytokine regulieren ihrerseits die NADPH-Oxidase hoch und erhöhen die ROS (Prasad 2019). A β bindet nicht nur an RAGE, sondern kann ihn auch gleichermaßen wie die AGEs aktivieren, was im Endothel zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt. In humanen arteriosklerotischen Läsionen wurden erstaunlicherweise erhebliche Mengen an A β festgestellt. Obwohl man in diesen

Läsionen sowohl größere Mengen an AGEs wie auch an A β gefunden hat und A β *in vitro* gut AGE-modifizierbar ist, wurde bisher noch kein Nachweis für *in vivo* modifiziertes A β in den Läsionen geführt. Es zeigte sich zudem ein signifikanter Anstieg der Spiegel von RAGE im Hippocampus und inferioren frontalen Kortex bei postmortalen AD-Patienten (Prasad 2019).

RAGE ist auf Neuronen und Mikrogliazellen nachweisbar. Das lässt einerseits eine mögliche Beteiligung von AGEs bei der Entstehung oder im Verlauf der AD und andererseits AGE-modifiziertes A β als pathophysiologische Verbindungskomponente im Gefäßsystem vermuten. Lipidoxidationsprodukte, aber auch Glykierungsmetabolite modifizieren A β . Entsprechende AGE-Modifikationen dieser Metabolite werden in den Alzheimer Plaques nachgewiesen (Fawver et al. 2012). Folgende Fakten lassen eine enge funktionelle Interaktion zwischen A β und AGEs vermuten: (a) Beide binden an den AGE-Rezeptor RAGE, (b) A β kann *in vitro* gut modifiziert werden, (c) AGE-Modifikationen erhöhen den Aggregationsgrad von A β und (d) das A β -Peptid verfügt in der Sequenz über mehrere Aminosäuren als mögliche „Targets“ der AGE-Modifikationen, wie zum Beispiel Arginin 5, Lysin 16 und Lysin 28. AGEs können mittels biochemischer Methoden quantifiziert werden. Allerdings benötigt man für diese Methoden Probenmaterial, das invasiv beschafft werden muss (Gewebe- oder Blutprobe). Sie sind aufgrund hoher Kosten, großem Arbeitsaufwand und ihrer Komplexität für den Einsatz im Rahmen klinischer Vorsorgeuntersuchungen nicht geeignet. Erst durch die Entwicklung von fluoreszenzbasierten Hautscans ist die nicht invasive Messung der AGEs im Gewebe über die Haut möglich, z.B. durch den AGE-Reader Diagn-Optics (Meerwaldt et al. 2004). Diese Messmethode wurde in unterschiedlichen Studien validiert. Eine deutliche Korrelation zwischen dem Alter der Probanden und der in der Haut enthaltenen AGE-Menge wurde deutlich (Simm et al. 2008). Weiterhin konnte eine positive Korrelation zwischen der Haut-AGE-Fluoreszenz und dem pathologischen Status der Patienten mit Diabetes mellitus festgestellt werden (Genevieve et al. 2013). Die allgemeine Akkumulation der AGEs in allen Geweben ist ein Biomarker des Alterns, der über die Hautfluoreszenz analysiert werden kann. Die Leichtigkeit des Messverfahrens ermöglicht auch den klinischen Einsatz.

Patienten mit Diabetes haben ein höheres Risiko, an AD zu erkranken. Diabetes zeigt einige pathologische Merkmale wie AD, z. B. beeinträchtigte Insulin-Signalübertragung, erhöhten oxidativen Stress, erhöhte A β -Produktion, Tauopathie und zerebrovaskuläre Komplikationen. AGEs und RAGE können der Zusammenhang zwischen Diabetes und AD sein. Störung der AGE-RAGE-Interaktion kann die Entwicklung von AD effektiv verhindern. AGEs sind prooxidative Faktoren, die oxidativen Stress und neuronale

Dysfunktion induzieren, der genaue Mechanismus bleibt unklar. Glykogensynthasekinase-3 beta (GSK-3 β) ist eine potenzielle Verbindung zwischen Diabetes und AD, seine übermäßige Aktivierung kann eine Hyperphosphorylierung von Tau verursachen (Kong et al. 2020).

Carboxymethyllysin (CML) wurde vermehrt im Hippocampus, frontalen und temporalen Kortex von Menschen mit AD und Diabetes mellitus Typ II gefunden. Eine Änderung der Nahrungsaufnahme von AGEs kann ggf. die Anhäufung von AD-Pathologien sowohl bei AD als auch bei Diabetes mellitus Typ II beeinflussen (Uribarri et al. 2020).

2 Zielstellung

Die vorliegende Arbeit dient der Etablierung einer Methode zur möglichen Früherkennung und Verlaufskontrolle von Alzheimer-Demenz. Wir stellen folgende Hypothese auf: AGE-modifiziertes A β kommt *in vivo* vor, trägt signifikant zur Aggregation des Peptides und deren pathologischen Effekten auf Neuronen und Endothelzellen bei.

Wissenschaftliche Daten über mögliche AGE-Modifikationen des A β *in vivo* fehlen bisher. Ein Problem des Nachweises von modifiziertem A β *in vivo* könnte sein, dass viele der verwendeten kommerziellen Antikörper das N-terminale Ende des Peptides erkennen. In der dort vorhandenen Aminosäuresequenz sind die beiden Lysine und das Arginin die primären Targets einer potenziellen Glykierung. So könnte eine Modifikation das Epitop für die monoklonalen Antikörper maskieren. Wir möchten eine Methode etablieren, wie *in vivo* CML-modifiziertes A β mittels FACS detektiert werden kann. Da wir eine höhere A β -Konzentration im Liquor als im Blut erwarten, werden wir unseren Assay zunächst in Liquorproben etablieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

In den Tabellen 4 bis 9 werden die verwendeten Chemikalien, Größenstandards und Kits, Puffer und Lösungen, Geräte, Verbrauchsmaterialien, und Datenverarbeitungsprogramme aufgelistet.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Aceton	Siegma-Aldrich®, (Steinheim)
Acrylamid 2K standard grade extrapure	AppliChem GmbH, (Darmstadt)
Acrylamid Lösung 40% (w/v)	Serva Electrophoresis GmbH, (Heidelberg)
Amidoschwarz	Bio-Rad Laboratories, (Hercules, USA)
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva Electrophoresis GmbH, (Heidelberg)
6-amino-n-caproic-acid	Merck KGaA, (Darmstadt, Germany)
BD™ CBA Functional Bead A4	BD Biosciences, (Heidelberg)
Beta-Amyloid (1-42), Ultra pure, HFIP	AnaSpec, (Fremont, USA)
Bisacrylamid 2K standard grade extrapure	AppliChem GmbH, (Darmstadt)
Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories, (Hercules, USA)
BSA (Rinderserumalbumin Fraction V, pH 7.0)	AppliChem GmbH, (Darmstadt)
Cumarsäure	Siegma-Aldrich®, (Steinheim)
D (-) Ribose	Siegma-Aldrich®, (Steinheim)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	SERVA Electrophoresis GmbH, (Heidelberg)
1,4-Dithiothreitol (1M DTT)	Siegma-Aldrich®, (Steinheim)
Essigsäure	Carl Roth GmbH+ Co (KG, Karlsruhe)
Ethanol	Siegma-Aldrich®, (Steinheim)
Formaldehyd (36,5%)	Calbiochem®, (Darmstadt)
Glycerin	Merck KGaA, (Darmstadt)
Glyoxal Solution	Fluka Analytical, Siegma-Aldrich®, (Steinheim)
Luminol	Siegma-Aldrich®, (Steinheim)
2-Mercaptoethanol	Siegma-Aldrich®, (Steinheim)
Methanol	Siegma-Aldrich®, (Steinheim)
Methylglyoxal Solution 40%	Siegma-Aldrich®, (Steinheim)
Milchpulver	Carl Roth GmbH, (Karlsruhe)
N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin (Temed)	Siegma-Aldrich®, (Steinheim)

Fortsetzung Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Natriumazid	Sigma-Aldrich®, (Steinheim)
Natriumcarbonat (wasserfrei)	Merck KGaA, (Darmstadt, Germany)
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, (Darmstadt)
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich®, (Steinheim)
Natriumdodecylsulfat <i>/sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, (Heidelberg)
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich®, (Steinheim)
Natriumthiosulfat (wasserfrei)	AppliChem GmbH, (Darmstadt)
N-Ethylmaleimide (NEM)	Sigma-Aldrich®, (Steinheim)
Nonidet® P40 Substitute (NP-40), Ultrapure	Thermo Fisher (Kandel) GmbH, (Karlsruhe)
Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4	Invitrogen GIBCO, (Auckland, NZ)
2-Propanol	Sigma-Aldrich®, (Steinheim)
Silbernitrat	AppliChem GmbH, (Darmstadt)
1-Step™ Ultra TMB-ELISA	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Sulfosuccinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate (Sulfo-SMCC)	Thermo Scientific (Rockford, USA)
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Trichloressigsäure 100% (TCA)	Fluka BioChemika (Buchs, CHE)
Tricin	Carl Roth GmbH, (Karlsruhe)
Tris ultrapure	AppliChem GmbH, (Darmstadt)
Tween® 20	Sigma-Aldrich®, (Steinheim)
Urea	Calbiochem®, (Darmstadt)
Wasserstoffperoxid, 30%	Universitätsapotheke, (Halle/Saale)

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Größenstandards und Kits

Lightning-Link™ B-Phycoerythrin Conjugation Kit	Innova Biosciences (Cambridge, UK)
Marker: ProSieve® QuadColor™ Protein Marker 4.6-300kDa	Lonza, (Rockland, ME)
MultiMark®	Invitrogen™, (Carlsbad, USA)
Page Ruler™ Prestained Ladder	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, USA)

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen. Alle Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit Reinstwasser aus einer MilliQ® Reinstwasseranlage hergestellt.

Acrylamid-Bisacrylamid-3 (AB-3) 49,5% T, 3% C 9,6 g Acrylamid 0,3 g Bisacrylamid In 20 ml H ₂ O	Acrylamid-Bisacrylamid-6 (AB-6) 49,5% T, 6% C 9,3 g Acrylamid 0,6 g Bisacrylamid In 20 ml H ₂ O
Amidoschwarz 0,1% (w/v) Amidoschwarz 25% (v/v) 2-Propanol 10% (v/v) Essigsäure	Arbeitspuffer FACS 1x PBS 0,1% (v/v) Tween® 20
BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Functional Bead Conjugation Buffer Set BD Biosciences (San Diego, USA)	BSA-Lösung 1% (w/v) BSA Ad TBS-T
Coating Buffer für ELISA, pH 9,6 15 mM Na ₂ CO ₃ 35 mM NaHCO ₃ 0,1% Natriumazid	Gelpuffer (3x), pH 8,45 3M Tris 1M HCl 0,3% SDS
Luminol-Substrat 2,5 mM Luminol 400 µM Cumarsäure 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5 1% DMSO (v/v) 1:1 gemischt mit: 5,4 mM H ₂ O ₂ 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5	5x RIPA (Radio-Immunoprecipitation-Assay), pH 8.0 0.25 M Tris 0.75 M NaCl 5% NP40 2.5% Natriumdesoxycholat 0.5% SDS
Sammelgelpuffer, pH 6,8 1 M Tris/HCl	5x SDS-Ladepuffer, pH 6,8 1 M Tris/HCl 25% (v/v) 2-Mercaptoethanol 50% (v/v) Glycerol 10% (w/v) SDS 1 mg Bromphenolblau

Fortsetzung Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen. Alle Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit Reinstwasser aus einer MilliQ® Reinstwasseranlage hergestellt.

<p><u>Silberfärbung-Stock-Lösungen:</u></p> <p>50% TCA-Stock 1,1 ml TCA 0,4 ml ddH₂O</p> <p>10% Na₂S₂O₃-Stock 0,055 g Na₂S₂O₃ 0,5 ml ddH₂O</p> <p>20% AgNO₃-Stock 0,57 g AgNO₃ 0,66 ml ddH₂O</p>	<p><u>Silberfärbung-Lösungen:</u></p> <p>Fixierungslösung (Lösung 1) 25 ml Aceton 1,25 ml TCA-Stock</p> <p>Vorbehandlung (Lösung 2) 25 ml Aceton 25 ml ddH₂O</p> <p>Vorbehandlung (Lösung 3) 83,33 µl Na₂S₂O₃-Stock 50 ml ddH₂O</p> <p>Imprägnierung (Lösung 4) 0,66 ml AgNO₃-Stock 50 ml ddH₂O 0,5 ml HCHO</p> <p>Entwicklung (Lösung 5) 1 g Na₂CO₃ 20,8 µl HCHO 20,8 µl Na₂S₂O₃-Stock 50 ml ddH₂O</p> <p>Stopp-Lösung (Lösung 6) 0,5 ml Eisessig 50 ml ddH₂O</p>
<p>1x TBS, pH 7,6 10 mM Tris/HCl 150 mM NaCl</p>	<p>1x TBS-T, pH 7,6 10 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween® 20</p>
<p>Transferpuffer 1, pH 10,4 0,3 M Tris (150 ml 1M Tris pH 10,4) 10% Methanol (50 ml) ddH₂O (300 ml)</p>	<p>Transferpuffer 2, pH 10,4 25 mM Tris (12,5 ml 1M Tris pH 10,4) 10% Methanol (50 ml) ddH₂O (437,5 ml)</p>
<p>Transferpuffer 3, pH 9,4 25 mM Tris (12,5 ml 1M Tris pH 9,4) 10% Methanol (50 ml) 40 mM 6-amino-n-caproic-acid (2,3 g) ddH₂O (437,5 ml)</p>	<p>Trenngelbuffer, pH 8,8 1,5 M Tris/HCl</p>

Fortsetzung Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen. Alle Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit Reinstwasser aus einer MilliQ® Reinstwasseranlage hergestellt.

1x Tris-Glycin-Laufpuffer , pH 8,3 25 mM Tris 192mM Glycin 0,1% SDS	1x Tris-Tricin-Laufpuffer , pH 8,3 100mM Tris 100mM Tricin 0,1% SDS
---	---

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Geräte

Biofuge fresco	Heraeus Instruments GmbH, (Gera)
Blotkammer (SemiDry)	Bio-Rad, (München)
Feinwaage Sartorius BP210S Feinwaage Sartorius TE1502S Feinwaage Sartorius portable	Sartorius AG, (Göttingen)
Flow Cytometer C6 accuri®	BD Biosciences, (Heidelberg)
FLUOstar Optima	BMG Labortechnologies, (Offenburg)
Forschungspipetten 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl	Eppendorf AG (Hamburg)
Gelkammer (SDS-PAGE)	Bio-Rad, (München)
Image Reader LAS-3000	Fujifilm, Raytest GmbH, (Straubenhardt)
Microprocessor pH-Meter	WTW, (Weilheim)
Mini Fold® Spot-Blotteinheit	Schleicher & Schuell, (Dassel)
Mini Protean 3 System Glas Plates	Bio-Rad, (München)
Reinstwasseranlage Milli-Q® Biocel	Millipore GmbH, (Schwalbach)
Roller mixer SRT9D	Stuart®, (Staffordshire, UK)
Rührer	IKA RH® basic 2, (Staufen)
Sonorex Digital 10 P (Ultraschallgerät)	Bandelin electronic, (Berlin)
Spannungsquelle	Bio-Rad, (München)
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, (Hamburg)
Titramax 1000	Heidolph Instruments, (Schwabach)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, (Bohemia,USA)
Wärmeschrank Function Line	Heraeus Instruments GmbH, (Gera)
Zentrifugen	SORVALL® Heraeus (Göttingen) Biofuge Stratos BGR 500/BGR 261

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bio-Rad-Spin Column	Bio-Rad Laboratories, (Hercules, USA)
ELISA-Platte, Microlon, 96 K F-Form, Bindungskap.: mittel	Greiner bio-one, (Neuburg)
Extra Thick Blot Paper	Bio-Rad Laboratories, (Hercules, USA)
Gel Blotting Papier	Whatman® Protran® (Dassel)
Immobilien®-P-Transfer membrane (0,45 µm)	Millipore GmbH, (Schwalbach)
Mikrotiterplatte 96/U-PP, black wells	Eppendorf AG, (Hamburg)
Pipettierspitzen 1-1000 µl 0,5-10 µl 10 µl 1000 µl und 5000 µl	Alpha Laboratories, (Leipzig) Biozym Scientific GmbH, (Hess. Oldendorf) Eppendorf ep T.I.P.S, (Hamburg)
Polystyrene Round-Bottom Tube (5 ml, FACS-Tube)	Falcon®, (Heidelberg)
Tubes 0,5-2 ml	Eppendorf AG, (Hamburg)
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Techno Plastic Products AG, (Trasadingen, Schweiz)

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Datenverarbeitungsprogramme

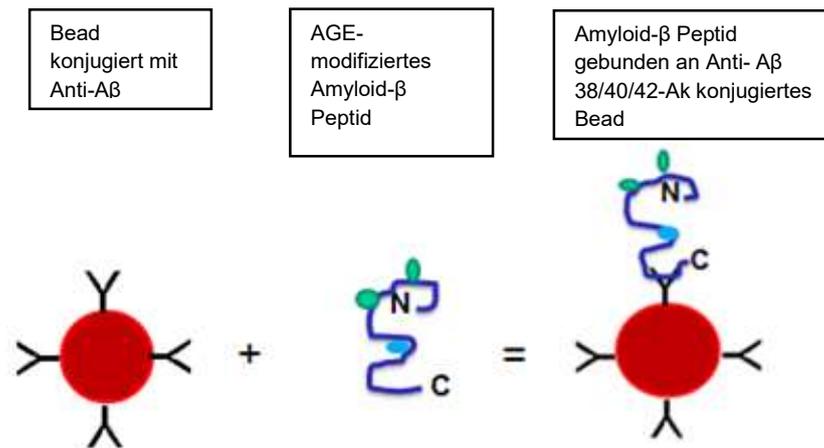
AIDA Image Analyzer v.3.51	Raytest, (Straubenhardt)
Microsoft Office 2010	Microsoft Deutschland GmbH, (Unterschleißheim)

3.1.1 Assay zum Nachweis fluoreszenz-markierter Anti-AGEs-Antikörper

In der vorliegenden Arbeitsreihe soll ein neuer selbst entwickelter Alzheimer-Test, der möglicherweise auch milde Formen der kognitiven Dysfunktion erkennt, etabliert werden.

Um dieses Vorhaben zu erreichen, wird ein Anti-A β -Antikörper an kommerziell zur Verfügung stehende Beads konjugiert. CML-spezifische Antikörper werden fluoreszenzmarkiert und sind über den Nachweis der CML- Modifikation von den an Beads gebundenem A β mittels Durchflusszytometrie zu quantifizieren (s. Abbildung 5). Zur Eintestung der Methode wird käufliches A β verwendet, das von uns durch eine Behandlung mit Dicarbonylen bzw. verschiedenen Zuckern AGE modifiziert wird. Mittels Westernblot und ELISA wird die Selektivität und Sensitivität von Antikörpern gegen Amyloid-beta in Abhängigkeit von der AGE-Modifikation überprüft.

1. Schritt



2. Schritt

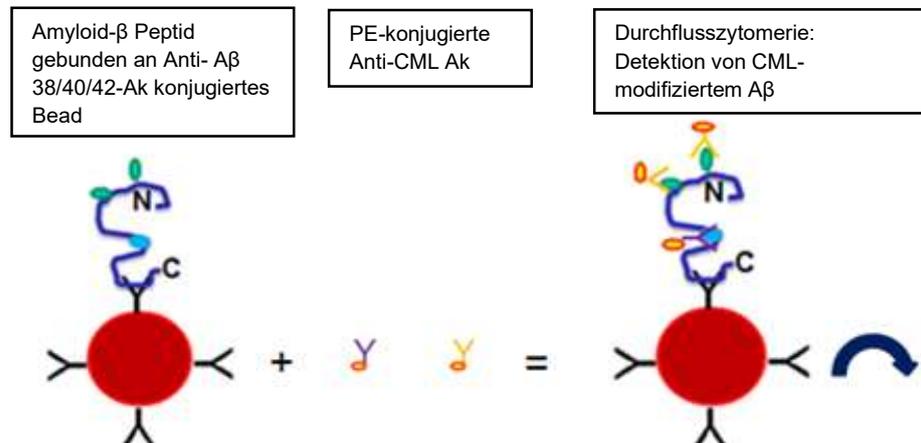


Abbildung 5: Detektion von CML-modifiziertem Aβ mittels der CBA-Methode.

3.1.2 Patientenkollektiv und Liquorproben

Die vorliegende Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt (2013-78, Schreiben der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Halle (Saale) vom 8.1.2014). Für die Studie wurden 30 Liquorproben als Gelegenheitsstichprobe von der Klinik für Neurologie der BG Kliniken Bergmannstrost bzw. von der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt. Nach der Durchführung erforderlicher Diagnostikuntersuchungen der Liquorproben der Patienten im Labor sind die eingefrorenen Reste dieser Proben im Labor der Herz- und Thoraxchirurgie der Martin-Luther-Universität zwecks dieser Studie weiter untersucht worden. Es wurden 2 Patientengruppen definiert: Eine Patientengruppe mit klinisch bestätigter Diagnose Alzheimer-Demenz nach den Kriterien von ICD-10, DSM-IV und NINCDS-ADRD und eine Kontrollgruppe ohne ausgeprägte kognitive Einschränkungen.

3.2 Methoden

3.2.1 Modifizierung von A β und Liquor in vitro

1 mg A β 1-42 (zur Vereinfachung wird folgend A β 1-42 als A β bezeichnet) wurde in 1 ml PBS gelöst. Damit A β als Monomer vorliegt, wurde die so gelöste A β -Lösung 1 min lang mittels Ultraschall behandelt. Anschließend wurden jeweils 150 μ l Aliquots von A β mit 10 mM Glyoxal und 10 mM Methylglyoxal bei 37°C auf dem Thermoblock inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 min, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 32 h, 40 h, 72 h und 96 h wurden jeweils 1 μ l von modifiziertem und unmodifiziertem A β zu 9 μ l PBS gegeben und bei -80°C eingefroren. Für die Modifizierung von Liquor wurden 200 μ l Liquor mit 10 μ M Glyoxal für 24 h bei 37°C auf dem Thermoblock inkubiert, anschließend zu 50 μ l aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.2.2 AGE-Fluoreszenzmessung

Vor dem Einfrieren der Proben für weitere Untersuchungen bei -80°C wurden die AGE-Modifikationen am A β zu den oben genannten Zeitpunkten mittels Fluoreszenzanalytik gemessen. Die Analysen der Proben in einem Endvolumen von 150 μ l erfolgten in schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatten am FluoStar Optima. Zur Bestimmung der totalen AGE-Fluoreszenz erfolgte eine Messung bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 440 nm (Schmitt et al. 2005; Sell und Monnier 1989).

3.2.3 Tris-Tricin- und Tris-Glycin-Gele

Wir verwendeten für die Trennung von A β und seiner Modifikationen Tris-Tricingele (Schägger und Jagow 1987), die sich für die Auftrennung der Proteine mit einem Molekulargewicht <30 kDa besser als ein Tris-Glycin-Gel eignen. Um hochmolekulare Aggregate des A β -Peptides mittels PAGE zu trennen, benutzten wir Tris-Glycin-Gele (s. Tabelle 11). Die Tris-Tricin-Gele wurden nach dem Schema in Tabelle 10 pipettiert.

Tabelle 10: Tris-Tricin-Polyacrylamidgel-Zusammensetzung

	Trenngel: 5 ml	Spacergel: 2 ml	Sammelgel: 2 ml
Urea	1,08 g	-	-
AB Acrylamid/Bisacrylamid	1,7 ml (49,5% T, 6% C)	-	-
AB Acrylamid/Bisacrylamid	-	400 µl (49,5% T, 3%C)	-
Gelpuffer 3x	1,7 ml	667 µl	-
ddH₂O	0,75 ml	933 µl	1,4 ml
APS 10% (w/v)	16,7 µl	10 µl	0,02 ml
Temed	1,7 µl	1 µl	0,002 ml
30% Acrylamid	-	-	0,33 ml
1 M Tris/HCl, pH 6,8	-	-	0,25 ml
SDS 10% (w/v)	-	-	0,02 ml

Tabelle 11: Tris-Glycin-Polyacrylamidgel-Zusammensetzung

	Trenngel 10%	Sammelgel 5%
ddH₂O	4 ml	2,1 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1%	3,3 ml	0,5 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	2,5 ml	-
1 M Tris/HCl, pH 6,8	-	0,38 ml
SDS 10% (w/v)	0,1 ml	0,03 ml
APS 10% (w/v)	0,1 ml	0,03 ml
TEMED	0,004 ml	0,003 ml

Tris-Tricin-Gele bzw. Tris-Glycin-Gele liefen mit dem entsprechenden Puffer (s. Tabelle 6: Puffer und Lösungen).

3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

Die unmodifizierten und modifizierten A β -Proben wurden in einer diskontinuierlichen SDS-PAGE (Laemmli 1970) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Auf die Proben (je 1,25 μ g der unmodifizierten und modifizierten A β) sind 2 μ l 5x SDS-Ladepuffer / Verhältnis 1:5 (v/v) und 3 μ l H₂O zu einem Endvolumen von 10 μ l gegeben worden. Der Denaturierungsvorgang erfolgte auf einem Thermomixer bei 95°C und 350 rpm für 5 min. Die Proben wurden für kurze Zeit auf Eis zwischengelagert und vor dem Auftragen im Schüttelgerät durchmischt. Die A β -Proben wurden einmal nach einer 10-minütigen Ultraschallbehandlung (5 cycle, 10% Power) und einmal ohne Ultraschallbehandlung auf ein 10%-iges Gel (Tabelle 11) aufgetragen. Auf dem Gel wurden zusätzlich 2 μ l Page Ruler Marker aufgetragen. Die Proben sind beim Tris-Tricin-Gel mit einer Spannung von 25 V und einer Stromstärke von 60 mA nach 45 min aufgetrennt worden. Beim Tris-Glycin-Gel sind sie bei einer Spannung von 60 V und einer Stromstärke von 75 mA in das Sammelgel eingelaufen und bei einer konstanten Spannung von 130 V aufgetrennt worden.

3.2.5 Western Blot und Slot-Blot

Auf die elektrophoretische Trennung der Proben folgte der Transfer dieser auf eine PVDF-Membran (Towbin et al. 1979). Das Semidry-Blot-System wurde „wie ein Sandwich“ anodenseitig folgendermaßen zusammengebaut (Abbildung 6): Ein dickes Filterpapier getränkt in Transferpuffer I, ein dickes Filterpapier getränkt in Transferpuffer II, PVDF-Membran aktiviert in Methanol, gespült mit H₂O und getränkt in Transferpuffer II, Gel, ein dickes Filterpapier getränkt in Transferpuffer III. Beim Elektrotransfer wurde ein elektrischer Strom von 1,2 mA/cm² für 60-90 min verwendet.



Abbildung 6: Aufbau des Semidry-Blot-Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH Deutschland 2010)

Für den Transfer der Proben mittels Slot-Blot auf die Membran benutzten wir eine Slot-Blot-Apparatur. Diese ist aus zwei Modulen mit einer dazwischenliegenden Transfermembran aufgebaut. Im oberen Modul befinden sich längliche (Slot-Blot) Probentaschen, die eine einfache Übertragung der Proben ohne ihr Vermischen ermöglichen. Das untere Modul liegt auf einer Auffangschale und ist mit einer Vakuumpumpe verbunden. Durch Erzeugen eines Unterdrucks werden die Proben durch die Membran gesaugt und fixiert (Abbildung 7).

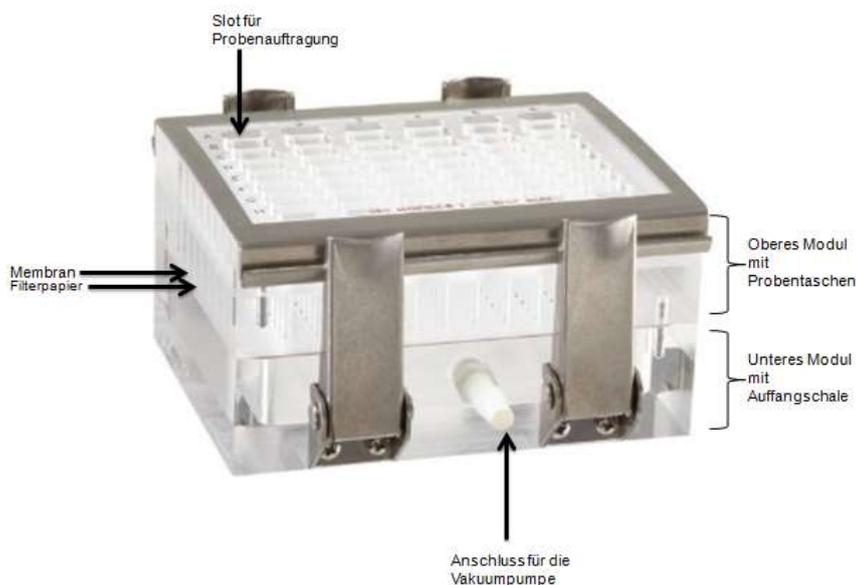


Abbildung 7: Aufbau des Slot-Blots (Eigenaufnahme, 2016)

Die PVDF-Transfermembran (Porengröße $0,45 \mu\text{m}$) wurde vor dem Versuchsstart in Methanol aktiviert, danach in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in PBS

getränkt. Ein in PBS eingeweichtes Filterpapier wurde unter die Membran gebracht. Die Probenaschen wurden zunächst mit 200 µl PBS gespült, danach wurden die Proben (Aβ ohne Inkubation: 1 µg mit 150 µl PBS, unmodifiziertes und modifiziertes Aβ nach 24 h-Inkubation: je 1,25 µg mit 150 µl PBS) in die Taschen aufgetragen.

3.2.6 Immunodetektion

Nach einem Westernblot bzw. Slot-Blot wurden die Proteine auf der Membran mit Hilfe von Antikörpern immunologisch detektiert. Eine Färbung der Membran mit Amidoschwarz diente der Prüfung der Beladung der Membran. Danach wurde die gefärbte Membran mit TBS-T 0,1% Tween vollständig entfärbt. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit 1%iger BSA-Lösung für 60 min bei Raumtemperatur bzw. mit 5%igem Milchpulver (gelöst in TBS-T) für 2h blockiert. Anschließend wurde die Membran mit primären Antikörpern (Tabelle 12) für 60 min bei Raumtemperatur bzw. über Nacht im Kühlraum inkubiert. Der Waschvorgang wurde 5 x für 5 min mit TBS-T vollzogen. Hierauf folgte die Inkubation mit Peroxidase-gebundenen sekundären Antikörpern (Tabelle 13) für 1 h bei Raumtemperatur. Danach ist der Waschvorgang wieder 5 x für 5 min mit TBS-T und 1 x für 5 min mit TBS durchgeführt worden. Die Immunodetektion erfolgte per Chemilumineszenz mit einem selbsthergestellten Luminol-Substrat am Image Reader LAS 3000. Mit Hilfe der Software AIDA V.3.51 wurden die Chemilumineszenz-Signale ausgewertet.

Tabelle 12: Primäre Antikörper für die Immunodetektion

Primäre Antikörper	Spezies	Epitop	Verdünnung	Firma
C-terminale-Ak Klon: 8G7	Maus	Aβ (C-terminus)	1:500	Nanotools (Teningen)
N-terminale-Ak Klon: 6E10	Maus	Aβ (3-8)	1:500	Hiss Diagnostics GmbH (Freiburg)
Anti-Abeta 38/40/42	Kaninchen	Aβ (4-16)	1:1000	SYSY (Göttingen)
CML 2868	Kaninchen	CML	1:1000	Herz- und Thoraxchirurgie, Universitätsklinik Halle (Saale)
Argpyrimidin/6B-Ak	Maus	Argpyrimidin	1:1000	BioLogo (Kronshagen)

Tabelle 13: Sekundäre Antikörper für die Immunodetektion

Sekundäre Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
Anti-Maus, HRP*-konjugiert	Ziege	1:10000	Jackson ImmunoResearch, USA
Anti-Kaninchen, HRP*-konjugiert	Ziege	1:10000	Jackson ImmunoResearch, USA
FITC Goat Anti-Rabbit IgG	Ziege	1:100	BD Biosciences, (Heidelberg)

*HRP: horseradish peroxidase

3.2.7 Silberfärbung der Polyacrylamidgele

Für die Silberfärbung wurde nach der modifizierten Blums Silberfärbung (Nesterenko et al. 1994) vorgegangen. Alle Schritte wurden nach der Tabelle 14 in sauberen Plastikbehältern auf einem Shaker bei Raumtemperatur durchgeführt.

Tabelle 14: Ablauf der Silberfärbung

Schritt	Ablauf	Lösungen	Zeit
1	Fixierung	Lösung 1	5 min
2	Spülen	ddH ₂ O	3 x 5 s
3	Waschen	ddH ₂ O	5 min
4	Spülen	ddH ₂ O	3 x 5 s
5	Vorbehandlung	Lösung 2	5 min
6	Vorbehandlung	Lösung 3	1 min
7	Spülen	ddH ₂ O	3 x 5 s
8	Imprägnierung	Lösung 4	8 min
9	Spülen	ddH ₂ O	2 x 5 s
10	Entwicklung	Lösung 5	10 – 20 s oder länger
11	Stopp	Lösung 6	30 s
12	Spülen	ddH ₂ O	10 s

3.2.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Um zu erfahren, mit welchem Antikörper die Beads konjugiert werden sollten, wurde zusätzlich zum Slot- und Western-Blot ein ELISA-Verfahren (Engvall und Perlmann 1971) hinzugezogen. In Tabelle 15 sind die Ak mit jeweiligen Verdünnungen aufgelistet.

Es wurden 1,25 µg Aβ nach 24 h- und 96 h-Inkubationszeit bei 37°C auf eine ELISA-Mikrotiterplatte mit 96 Wells gegeben. Auf alle Proben wurden 50 µl coating buffer hinzugefügt. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C und 750 rpm auf dem Schüttler gelagert. Am nächsten Tag folgte das Waschen der Platte jeweils viermal kurz mit 200 µl PBS. Anschließend wurden die Proben mit 200 µl 5%-igem Milchpulver gelöst in PBS (Blockingpuffer) für 2 h blockiert. Der C-terminale- bzw. der N-terminale-Ak wurden (s. Tabelle 15) für 2 h auf die Wells gegeben. Die Proben wurden wieder viermal mit je 200 µl PBS gewaschen. Der Sekundär-Ak mit einer Verdünnung von 1:10000 (s. Tabelle 13) in Blockingpuffer wurde für 1 h auf die Proben gegeben. Im Anschluss erfolgte wieder ein viermaliger Waschgang mit je 200 µl PBS. Die Proben wurden mit je 50 µl 1-Step™ Ultra TMB-ELISA bis zu 30 min detektiert, danach wurde die Reaktion mit 50 µl 1M H₂SO₄ gestoppt. Die Absorption wurde am FLUOstar Optima bei 450 nm gemessen.

Tabelle 15: Primäre Antikörper für ELISA

Primäre Antikörper	Spezies	Epitop	Verdünnung	Firma
C-terminale-Ak Klon:CA9 10C11	Maus	Aβ (C-terminus)	1:500	Antibodies online GmbH (Aachen)
N-terminale-Ak 6E10	Maus	Aβ (3-8)	1:500	Hiss Diagnostics GmbH (Freiburg)
N-terminale-Ak 4G8	Maus	Aβ (18-22)	1:500	Hiss Diagnostics GmbH (Freiburg)
Aβ NT78	Kaninchen		1:75	SYSY (Göttingen)
Aβ NT244	Kaninchen		1:75	SYSY (Göttingen)
Aβ 88B12	Kaninchen		1:75	SYSY (Göttingen)
Anti-Abeta 38/40/42	Kaninchen	Aβ (4-16)	1:75	SYSY (Göttingen)
CML 2868	Kaninchen	CML	1:75	Herz- und Thoraxchirurgie, Universitätsklinikum Halle (Saale)
Argpyrimidin/6B -Ak	Maus	Argpyrimidin	1:100	BioLogo (Kronshagen)

3.2.9 Kopplung der Beads mit Anti-Aβ-Antikörper

Die folgenden Schritte dienen der Vorbereitung für die Durchflusszytometrie-Tests. Zur Vorbereitung der Beads wurden die gekauften Funktionsbeads für 30 s gevortext. 75 µl

der Beads wurden in ein Mikrozentrifugen-Tube gegeben und durch eine Alufolie vor Licht geschützt. Die Beads wurden für eine Minute mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde 1,9 µl 1M DTT zu den Beads hinzugefügt, für 5 s gevortext und für 1 h im Thermomixer bei 500 rpm und Raumtemperatur geschüttelt. 1 ml Kopplungspuffer wurde zu den Beads hinzugegeben und für 5 s gevortext. Die Beads wurden insgesamt 3 x für 3 Min bei 900xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbliebene Pellet wurde mit 20 µl Kopplungspuffer resuspendiert.

90 µl Anti-A β -Antikörper (1mg/ml) wurden nach Herstellerangaben in PBS vorbereitet. Im nächsten Schritt wurde 2 mg Sulfo-SMCC Stocklösung frisch in 1 ml HPLC-H₂O gelöst. 2 µl von dem Sulfo-SMCC wurden zum A β -Ak hinzugefügt und für 5 Min gevortext. Die hergestellte Lösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt im Thermomixer bei 500 rpm geschüttelt. Nach einstündiger Inkubation wurden die Komponenten, die nicht reagiert hatten, wie folgt entfernt: Eine Bio-Rad Spin Säule wurde zweimal mit Kopplungspuffer gespült. Danach wurde die Säule in ein Röhrchen gestellt und für 2 Min bei 1000xg zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein neues Röhrchen gestellt und die Mischung von Anti-A β -Ak und Sulfo-SMCC auf die Säule gegeben. Damit der Anti-A β -Ak in den Kopplungspuffer transferiert wird, wurde für 2 min bei 1000xg zentrifugiert und zum Schluss die Säule verworfen. Danach wurde der Anti-A β -Antikörper zu den funktionalen Beads hinzugegeben, für 5 s gevortext und für 1 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur im Thermomixer bei 500 rpm geschüttelt. Anschließend wurde 2 mg NEM in 1 ml DMSO gelöst, 2 µl NEM zu den Beads und Anti-A β -Ak hinzugefügt, für 5 s gevortext und für 15 Min auf dem Schüttler inkubiert. 1 ml Aufbewahrungspuffer wurde zu der Lösung gegeben, für 3 Min bei 900xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der letzte Schritt wurde 3 x wiederholt. Das Bead Pellet wurde in 0,5 ml Aufbewahrungspuffer resuspendiert. Die Konzentration der Beads beträgt 6×10^6 Beads/ml. Die Beads können lichtgeschützt im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden und können für 1 Jahr benutzt werden. Um zu überprüfen, ob der A β -Ak an die Beads gekoppelt war, wurde wie in Abbildung 8 dargestellt vorgegangen. Eine mittlere Fluoreszenzintensitätsdifferenz zwischen den Proben ohne und mit FITC-konjugierten Akn von über 500 zeigt, dass die Beads gut gekoppelt sind.

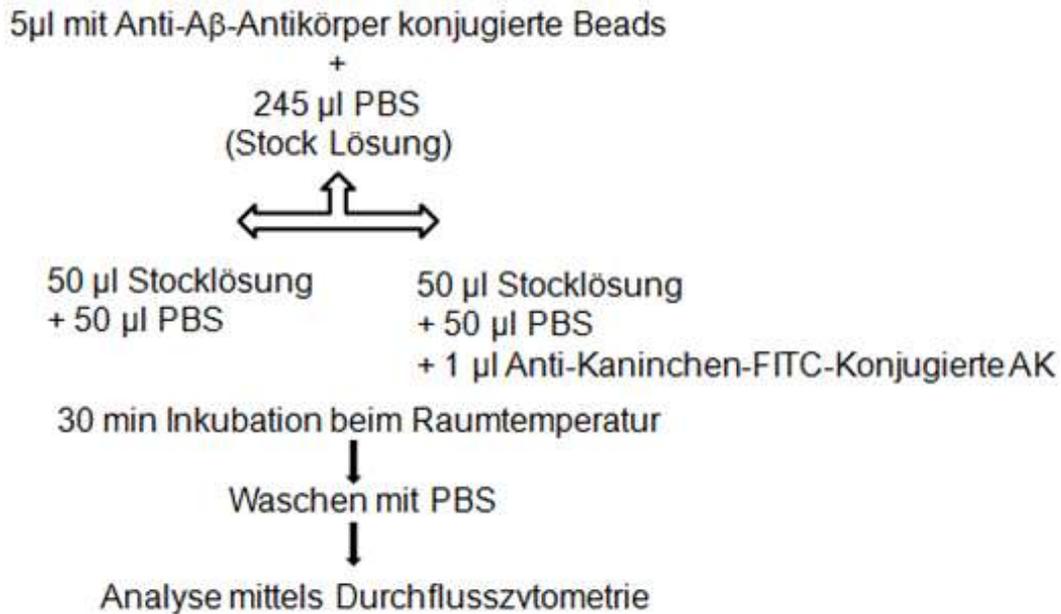


Abbildung 8: Ablauf zur Überprüfung der Kopplung der Beads an die A β -Ak

3.2.10 Markierung der CML-Antikörper mit Lightning-Link™ B-Phycoerythrin Conjugation Kit

30 µl gereinigter CML-Antikörper 2868 (1µg/1µl) wurden zwecks einer Konjugation zu 3 µl LL-Modifier Reagenz zugegeben und resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 4 h lichtgeschützt bei Zimmertemperatur. 3 µl LL-Quentscher Reagenz wurden hinzugegeben und nach 30 min Inkubation war das Reagenz einsatzbereit.

3.2.11 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Analysen

Die unmodifizierten und modifizierten A β -Proben verschiedener Volumina (1 µl, 3 µl, 5 µl, 9 µl) wurden nach 24 h bzw. 96 h Inkubation bei 37°C mit 40 µl Arbeitspuffer zu den Beads (5 µl, 3 µl, 1 µl) zu einem Endvolumen von 50 µl zusammengefügt. Die Inkubation der Proben wurde 1 h lang bei 600 rpm und Raumtemperatur auf dem Schüttler durchgeführt. Hiernach ist 300 µl Arbeitspuffer auf die Proben gegeben worden, 3 min wurden diese bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. 5 µl CML-PE-Ak (1 µg/ml), gelöst in 50 µl Arbeitspuffer, wurden in unterschiedlicher Verdünnung (1:1000, 1:5000, 1:7500, 1:10000) auf die Proben gegeben. Im Anschluss sind die Proben 1 h bei 600 rpm und Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert worden. Hinzugefügt wurden 200 µl Arbeitspuffer, die Proben wurden 3 min bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Auf die Proben wurden 250 µl PBS gegeben und per FACS-Analyse am Accuri Flow cytometer (BD Biosciences) untersucht.

Im Falle von Liquor-Analysen wurden verschiedene Mengen von Liquor, Beads und Ak-Verdünnungen benutzt und inkubiert. Das beste daraus resultierte Protokoll wurde für die Messung des Patientenmaterials benutzt (s. Ergebnisse).

3.2.12 Statistik

Nach der Prüfung über eine Normalverteilung der Werte für CML-modifiziertes A β in der AD- und Kontrollgruppe wurde ein T-Test durchgeführt. Die statistische und grafische Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach der Bearbeitung der Rohdaten mit Microsoft Office Excel 2010 und mit der statistischen Software Medcalc, Version 19.8, um signifikante Differenzen zu ermitteln. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p < 0,05$) wurde als Signifikanzgrenze zugrunde gelegt.

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war eine Methode für die Detektion von AGE-Modifikationen, v.a. CML, am Amyloid β -Peptid zu etablieren. Die etablierte Methode sollte dann im Liquor von AD-Patienten und Kontroll-Patienten als ein mögliches diagnostisches Verfahren getestet werden. Um die Methode zu etablieren, wurde zuerst synthetisches Amyloid- β -Peptid mit AGE-Induktoren (Glyoxal für CML, Methylglyoxal für Argpyrimidin) modifiziert. Die Modifikationen am A β -Peptid durch GO bzw. MGO wurden durch Messung der AGEs-intrinsischen Fluoreszenz verfolgt. Es ist wichtig zu erwähnen, dass CML selbst ein nicht fluoreszierendes AGE ist und damit mittels Fluoreszenzmessung nicht zu detektieren ist. Fluoreszierende AGEs können durch zwei Fluoreszenzen charakterisiert werden: Die erste Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 440 nm, sowie die zweite Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 330 nm und einer Emissionswellenlänge von 405 nm, dienen der Detektion der AGE-Modifikationen Pentosidin und Argpyrimidin. In Abbildung 9 sind die Modifikationen CML und Argpyrimidin dargestellt.

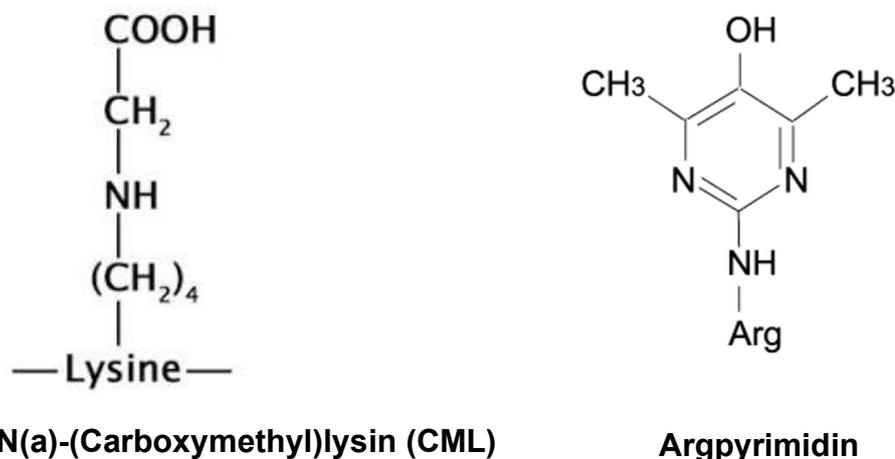


Abbildung 9: N(a)-(Carboxymethyl)lysine (CML) und Argpyrimidin

4.1 AGE-Fluoreszenzmessung nach verschiedenen Zeitpunkten

Bevor die unmodifizierten und modifizierten A β -Proben für weitere Untersuchungen bei -80° C eingefroren wurden, erfolgte die Messung der Fluoreszenzen der AGE-Modifikationen am A β zu verschiedenen Zeitpunkten. Zunächst wurde nach 24 h-Inkubation der Proben bei 37° C die AGE-spezifische Fluoreszenz bei 360/440 nm (Anregungs-/Emissionswellenlänge) und zusätzlich die Fluoreszenz bei 330/405 nm spezifisch für Argpyrimidin und Pentosidin gemessen (Abbildung 10, n=3). Die Abbildung 10 zeigt, dass unmodifiziertes A β allein nach 24 h-Inkubation eine geringe Auto-Fluoreszenz zeigt. Da CML, wie oben erwähnt, nicht fluoresziert, sind die Fluoreszenzen

im Vergleich zu unmodifiziertem A β nahezu gleich. A β -Methylglyoxal (MGO) zeigt eine 2,3-fach erhöhte Fluoreszenz gegenüber dem unmodifizierten A β .

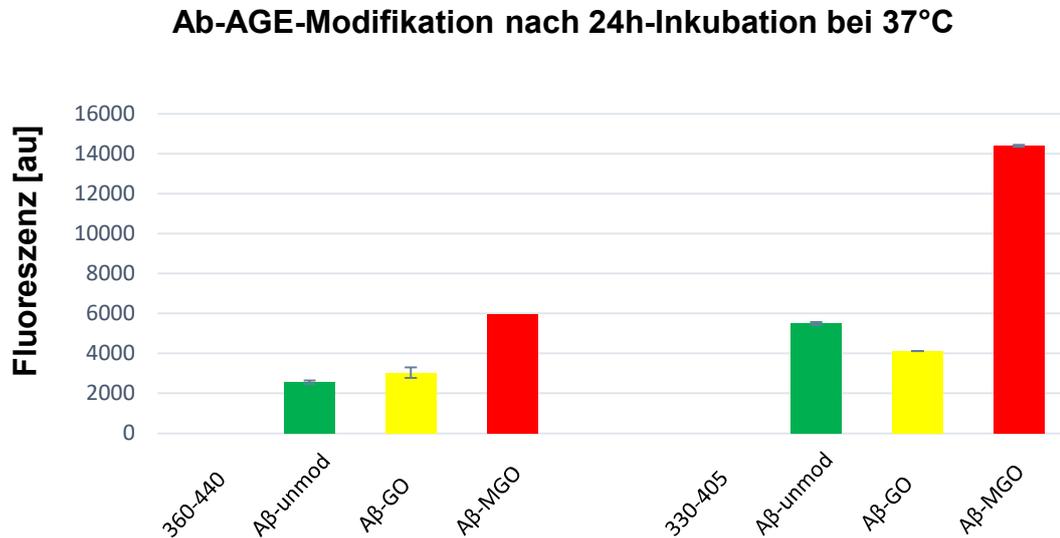


Abbildung 10: Fluoreszenzmessung der A β -AGE-Modifikationen nach 24h-Inkubation

Die Temperatur und die Konzentration der AGE-Induktoren sind u.a. Faktoren, die die Schnelligkeit der AGE-Bildungsreaktion beeinflussen. Um eine schnellere Bildung der AGEs zu ermöglichen, haben wir das A β -Peptid bei 50°C mit 10 mM GO und MGO für 96 h inkubiert. Die totale AGE-Fluoreszenz im Laufe der 96 h wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bei 360/440 nm gemessen. Wie zu erwarten, blieb die Fluoreszenz von A β unmodifiziert und die von A β -GO unverändert. Abbildung 11 zeigt, dass die Fluoreszenz bei A β -MGO ab 8 h Inkubation kontinuierlich steigt.

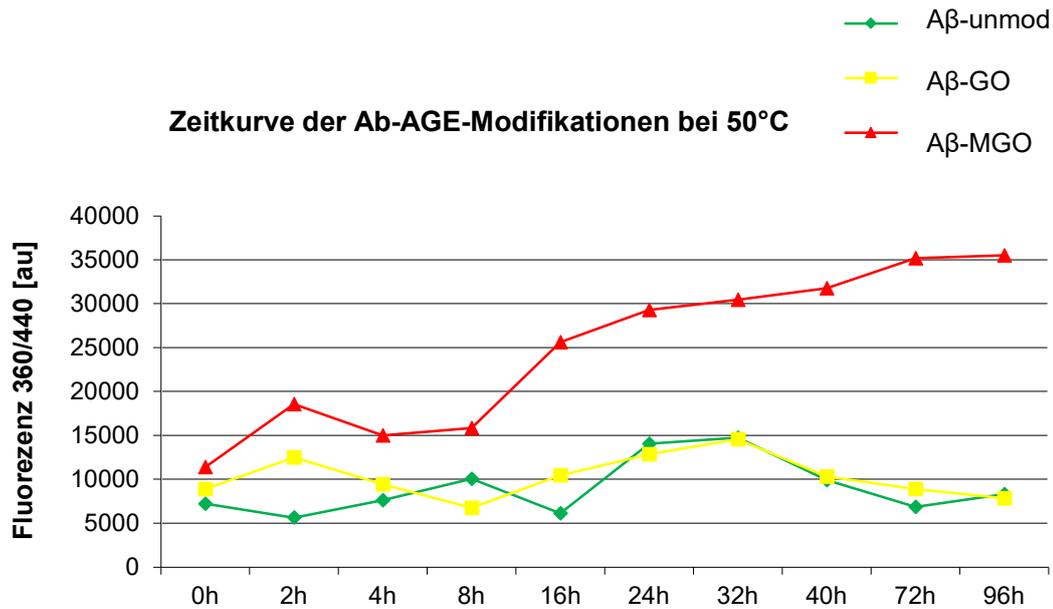


Abbildung 11: Fluoreszenz-Zeitkurve der Aβ-AGE-Modifikationen bei 50°C-Inkubation

4.2 Unmodifizierte und modifizierte Aβ-Detektion im Westernblot und Silberfärbung

Da CML ein nicht fluoreszierendes AGE ist, kann eine Messung der Fluoreszenz nach der Inkubation von Aβ-Peptid mit Glyoxal keine Auskunft über die Existenz von CML geben. Deswegen wurde CML am Aβ-Peptid mittels Westernblot detektiert. Da Aβ ein Molekulargewicht von ca. 4 kDa hat, verwendeten wir für die Trennung des Peptides 17%ige Tris-Tricin-Gele. Abbildung 12 (n=3) zeigt das Ergebnis des Westernblots mit 1 µg Aβ ohne Inkubation und je 1,25 µg unmodifiziertes und modifiziertes Aβ nach 24h Inkubation mit AGE-Induktoren. Als Primär-Ak wurde ein N-terminaler Ak (Klon 6E10) benutzt. Nach 24 h Inkubation des Peptides bei 37°C zeigt Aβ unabhängig von AGE-Induktoren einen so starken Aggregationsgrad, dass keine Banden auf der Membran detektierbar sind, da die großen Oligomere nicht ins Gel hineinlaufen. Für das Aβ-Peptid ist die Bildung von Aβ-Oligomeren und größeren Aggregaten bekannt (Lee et al. 2016). Wir konnten nur beim Aβ ohne Inkubation Banden - die Monomeren, Dimeren und Trimeren entsprechen - detektieren.

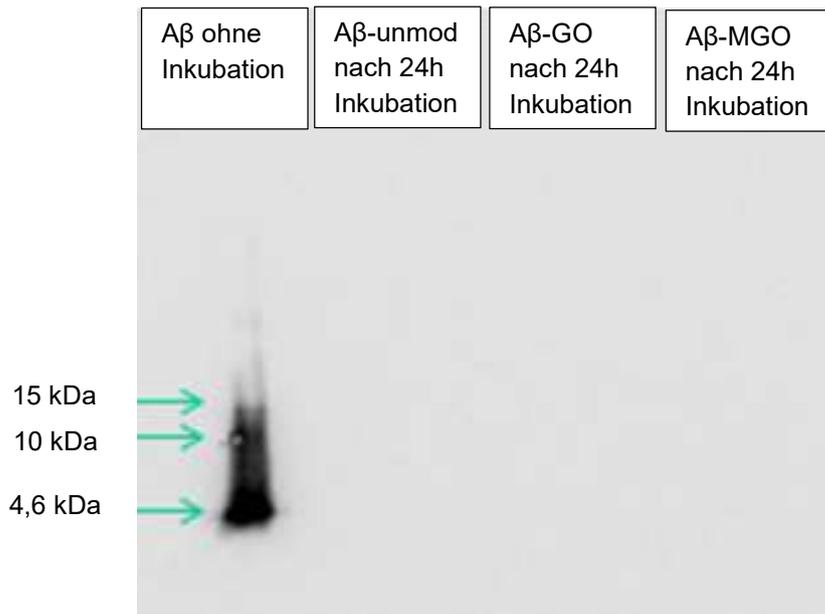


Abbildung 12: 17%iges Tris-Tricin-Gel und Westernblot für A β ohne Inkubation und nach 24h-Inkubation mittels N-terminaler-Ak (6E10)

Eine Aggregation des A β -Peptides ohne AGE-Induktoren und nur durch eine Inkubation bei 37°C für 96 h konnte mittels Westernblots vermutet werden. Abbildung 13 (n=3) zeigt, dass eine Detektion des Peptides mit einem Anti-A β -Ak (6E10) Banden im Sammelgel ergibt (1. Bild von links). Im Trenngel war keine Proteinbande zu detektieren, entsprechend vermuten wir eine Aggregation des A β s. Wenn A β mit GO und MGO behandelt wurde, waren die Aggregate so groß, dass diese nicht mehr in das Gel hineinliefen (Bild Mitte: Detektion mit einem Anti-CML-Antikörper; Bild rechts: Detektion mit einem Anti-Argpyrimidin-Antikörper).

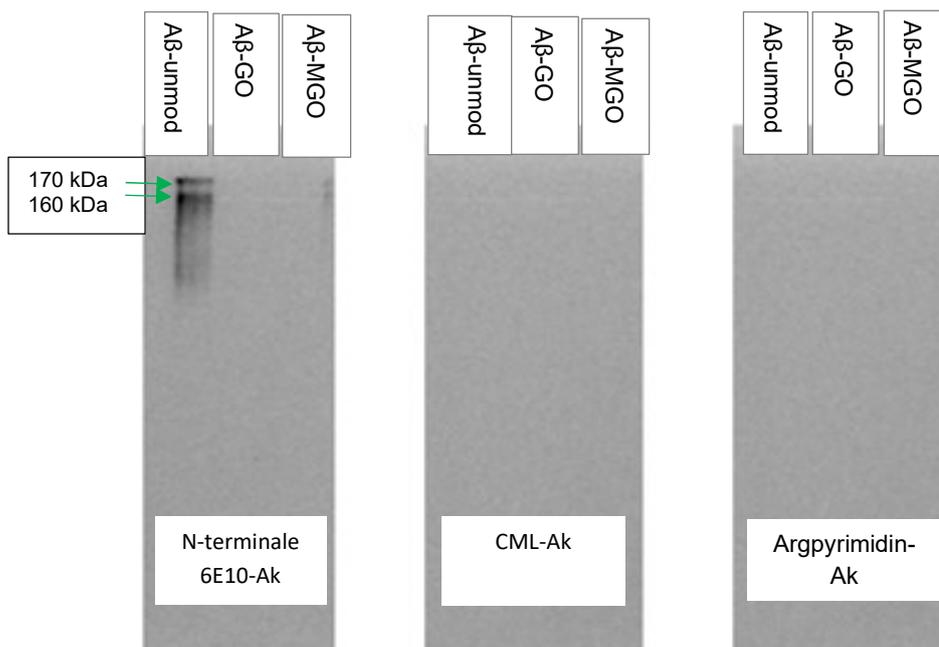


Abbildung 13: 17%iges Tris-Tricin-Gel und Westernblot für unmodifiziertes und modifiziertes A β nach 96 h-Inkubation mittels N-terminaler-Ak (6E10), CML-Ak und Argpyrimidin-Ak

Um den vermuteten Verlauf der A β -Aggregation bei 37°C ohne und mit AGE-Induktoren zu verfolgen, inkubierten wir das Peptid für unterschiedliche Zeiten. Da große Moleküle zu erwarten waren, entschieden wir uns für die Trennung des Peptides auf ein 10%iges Tris-Glycin-Gel. Nach der Inkubation trugen wir die A β -Proben (je 1,25 μ g) auf das Gel auf. Die Detektion erfolgte mittels einer Silberfärbung. Abbildung 14 zeigt, dass unmodifiziertes A β bis zu 40 h Inkubation bei 37°C detektierbar ist. Bei 72 h ist es so stark aggregiert, dass keine Banden mehr zu sehen sind. Glyoxal und Methylglyoxal aggregieren das A β -Peptid sehr stark, so dass nach 24 h modifiziertes A β nicht mehr detektierbar ist.

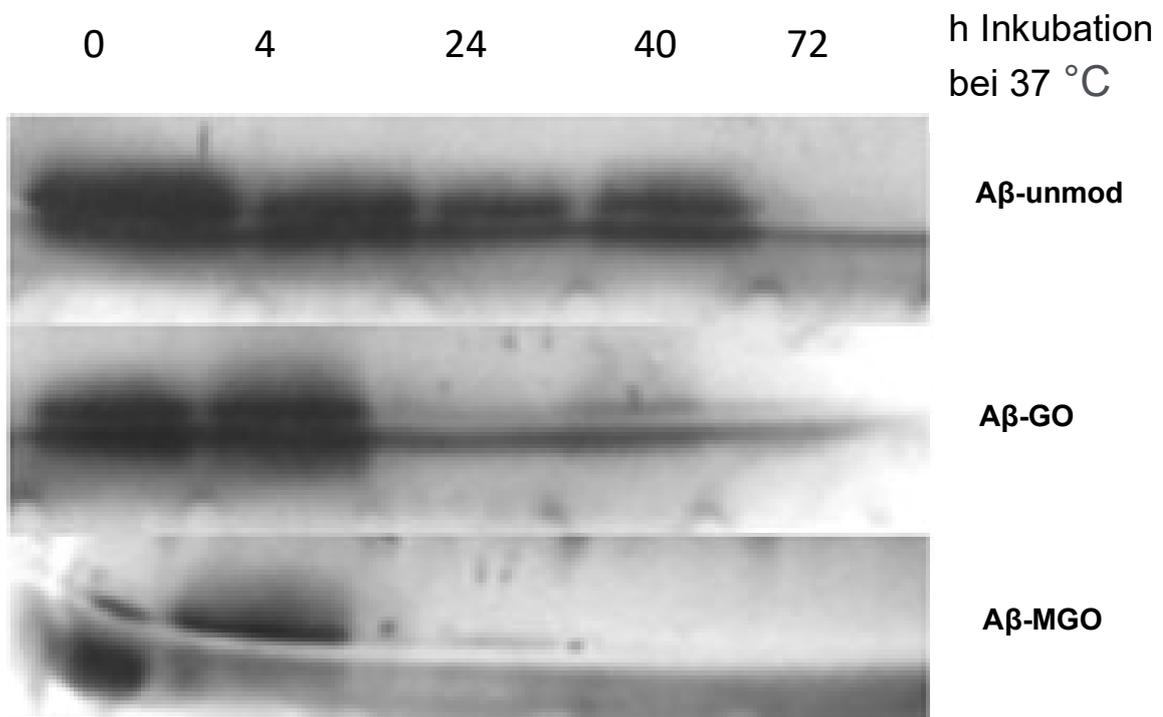


Abbildung 14: Detektion des unmodifizierten und modifizierten A β -Peptides bei 4 kDa mittels PAGE (10%iges Tris-Glycin-Gel) und Silberfärbung

Da wir im Westernblot kein modifiziertes A β detektieren konnten, wurden die Proben mit Ultraschall behandelt, um evtl. Aggregate aufzulösen. Die A β -Proben (je 1,25 μ g) wurden im ersten Versuch nach einer 10-minütigen Ultraschallbehandlung und im zweiten ohne Behandlung auf ein 10%iges Tris-Glycin-SDS-Gel aufgetragen. Abbildung 15 (n=3) zeigt, dass nur bei A β ohne Inkubation kleinere Banden zu sehen sind. Bei allen anderen Formen von A β nach 24 h-Inkubation bei 37°C sind nur schwache Banden im Sammelgel zu sehen. Das A β -Peptid ohne Inkubation bei 37°C zeigt bereits eine starke Aggregation. Eine 10-minütige Ultraschallbehandlung war nicht in der Lage, die Aggregate zu entfalten. Nur eine leichte Reduktion der hochmolekularen verwaschenen

Banden (<60kDa) konnte beobachtet werden. Wir detektierten keine Banden bei GO oder MGO modifiziertem A β , was auf eine starke Aggregation des Peptides hinweist.

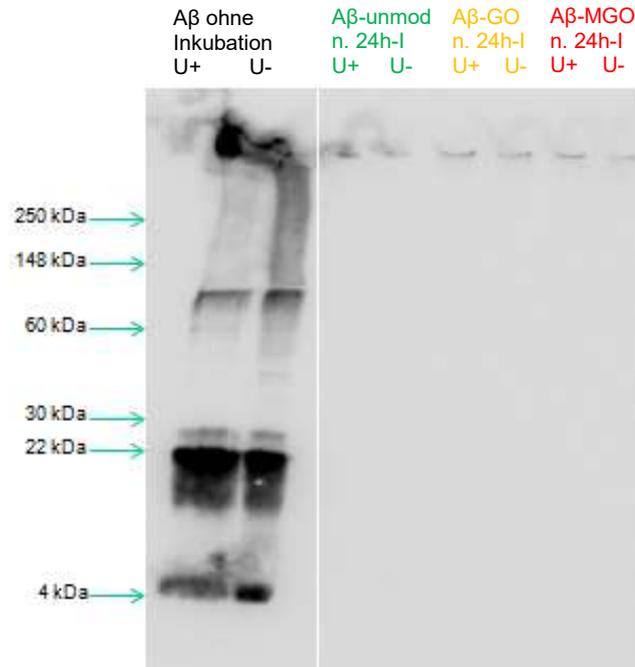


Abbildung 15: Unmodifiziertes und modifiziertes A β mit Ultraschall- (U+) und ohne Ultraschallbehandlung (U-) im 10%iges Tris-Glycin-Gel und Westernblot mittels N-terminaler-Ak (6E10)

4.3 Wahl der bindungsstärksten A β -Antikörper

4.3.1 Monoklonale Antikörper

Viele der verwendeten kommerziellen A β -Antikörper erkennen das N-terminale Ende des Peptids. In der dort vorhandenen Aminosäuresequenz sind die beiden Lysine und das Arginin, welche modifiziert werden könnten. Die Modifikationen könnten das Epitop für die monoklonalen Antikörper maskieren. Da es uns nicht gelang, aggregiertes A β -Peptid in Tris-Glycin-Gel zu trennen, entschieden wir uns, die Proben mittels Slot-Blot zu analysieren. Mit diesem Verfahren werden die Proben direkt auf eine Membran aufgetragen und dann mittels Inkubation mit Ak detektiert. Damit wird erreicht, dass alle Peptide unabhängig von der Größe auf der Membran fixiert werden. Hieraus ergibt sich der Nachteil, dass die Größe der Peptide nicht zu bestimmen ist.

Hierfür wurde das A β -Peptid unmodifiziert oder AGE-modifiziert zwei Mal auf eine PVDF-Membran aufgetragen. Ein Teil der Membran wurde über Nacht mit dem C- terminalen Ak (8G7), der andere Teil mit dem N-terminalen Ak (6E10) inkubiert. Nach Inkubation mit einem weiteren sekundären Ak und Waschen der Membran wurden die Signale nach

Zugabe des Substrates detektiert. Abbildung 16 (n=3) zeigt, dass der N-terminale-Ak (6E10) eine stärkere Bindung an das A β -Peptid aufweist. Je modifizierter A β ist, desto schwächer ist das Detektionssignal bei beiden Antikörpern.

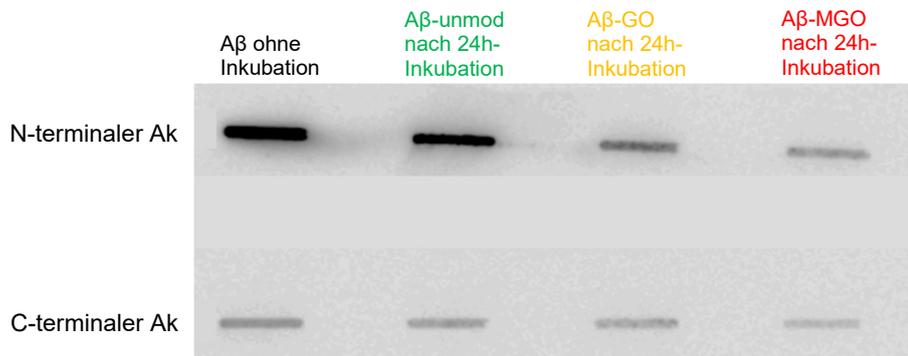


Abbildung 16: Detektion von A β -Peptid mit N- (6E10) und C-terminale-Ak (8G7) mittels Slot-Blot

Weiterhin wurde in einem ELISA-Verfahren zusätzlich zum Slot-Blot untersucht, ob der C-terminale-Ak (8G7) oder der N-terminale-Ak (6E10) besser an modifiziertes A β bindet. Dafür wurde das Kontroll-Peptid (A β ohne Modifikationen) und modifiziertes A β auf eine ELISA-Platte gecoatet. Nach Inkubation mit primärem und sekundärem Ak und Zugabe des Substrates wurde die Platte in einem ELISA-Reader gemessen. Der N-terminale-Ak bindet sowohl nach 24 h-Inkubation (s. Abbildung 17) als auch nach 96 h-Inkubation (s. Abbildung 18) stärker an unmodifiziertes und modifiziertes A β . Damit sind die Ergebnisse des Slot-Blots bestätigt worden. Gerade nach der längeren Inkubationszeit überzeugte der N-terminale-Ak, der 1,3x bis 4,4x fach stärker als der C-terminale-Ak an A β bindet. Ferner wurde, wie beim Slot-Blot, eine Reduktion der Bindung des Antikörpers an modifiziertes A β -Peptid beobachtet.

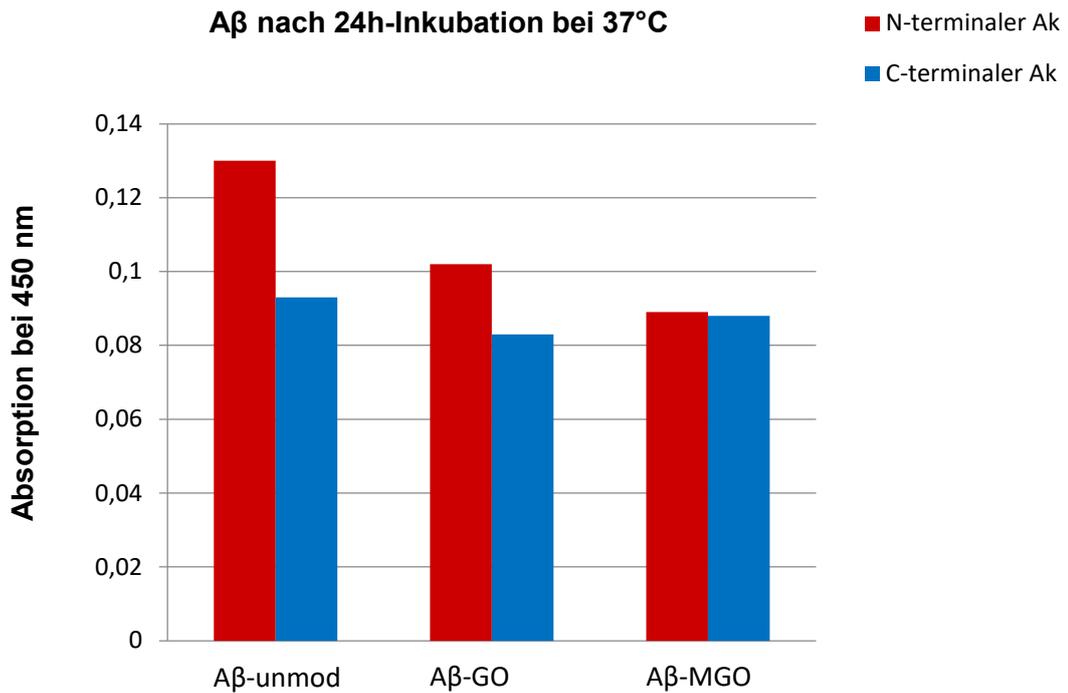


Abbildung 17: Detektion von unmodifiziertem und modifiziertem A β (nach 24 h-Inkubation) mit N-terminalem-A β -Ak (6E10) und C-terminalem-A β -Ak (8G7) mittels ELISA

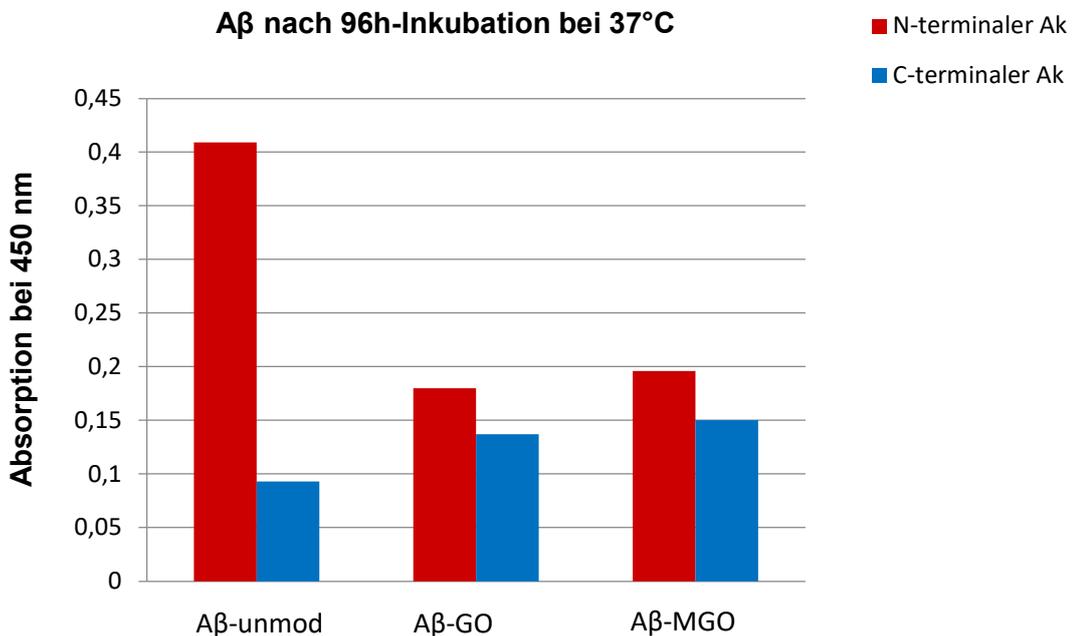


Abbildung 18: Detektion von unmodifiziertem und modifiziertem A β (nach 96 h-Inkubation) mit N-terminalem-A β -Ak (6E10) und C-terminalem-A β -Ak (8G7) mittels ELISA

Da uns ein zweiter N-terminaler-Ak zur Verfügung stand, wurden diese beiden N-terminalen-Ak zwecks ihrer A β -Bindungsstärke im ELISA-Verfahren getestet. Der N-terminale-Ak 6E10 bindet an den Epitopen 3-8 von A β und der N-terminale-Ak 4G8

bindet an den Epitopen 18-22. Abbildung 19 (n=3) zeigt, dass der N-terminale-Ak 6E10 beim Kontroll-Peptid eine bessere Bindung gegenüber dem 4G8-Ak aufweist. Dagegen war für modifiziertes A β kein Unterschied zu beobachten. Deshalb wurde für weitere Versuche der N-terminale-Ak 6E10 genommen.

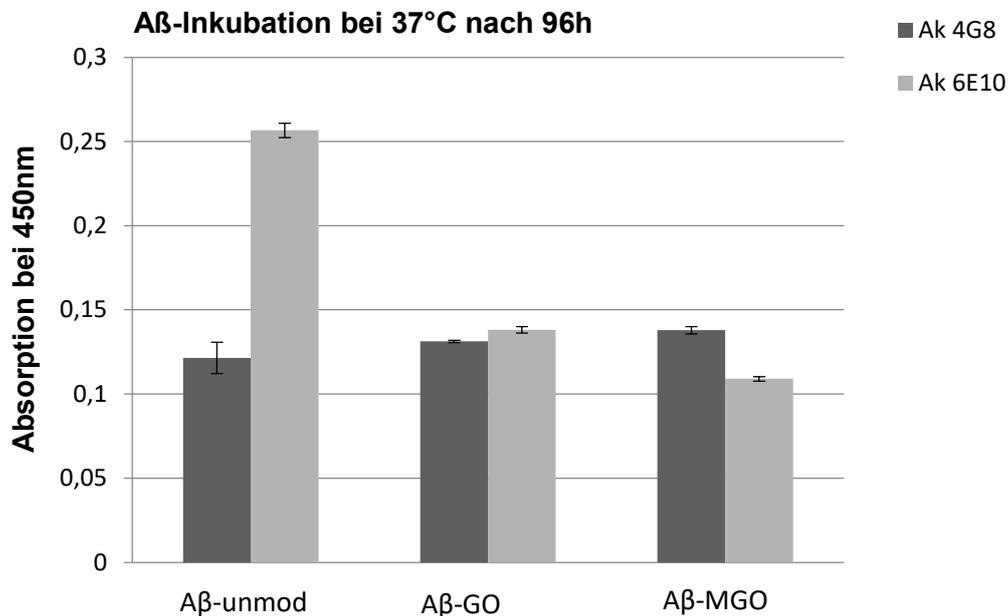


Abbildung 19: Detektion der Bindung von N-terminalem Ak 6E10 und 4G8 an das A β -Peptid mittels ELISA

4.3.2 Polyklonale Antikörper

Während monoklonale Ak auf Grund des Herstellungsmodus gegenüber polyklonalen Ak spezifischer sind, können polyklonale Ak gegenüber monoklonalen Ak sensitiver sein. Vier unterschiedliche polyklonale Ak wurden mittels ELISA auf die Bindung an unmodifiziertes A β und modifiziertes A β getestet. Abbildung 20 zeigt, dass der A β - 38/40/42-Ak die stärkste Bindung an modifiziertes und unmodifiziertes A β ohne erkennbare Unterschiede zwischen unmodifiziertem und modifiziertem A β aufweist.

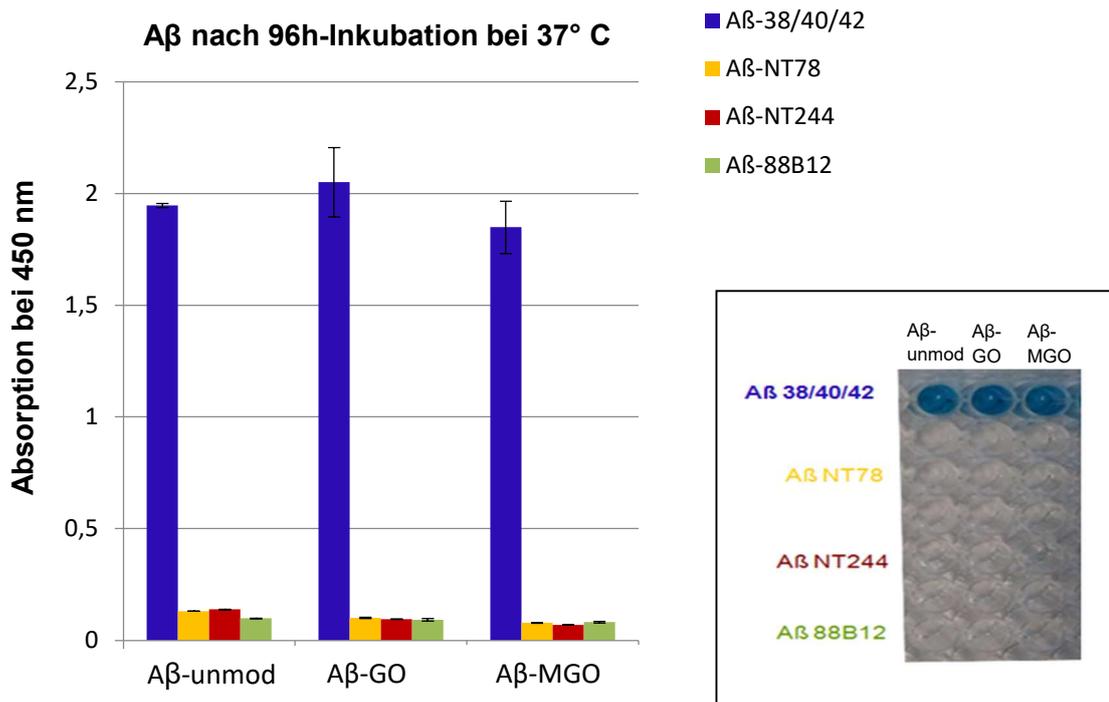


Abbildung 20: Detektion von unmodifiziertem und modifiziertem A β durch vier verschiedene A β -spezifische-polyklonale Ak mittels ELISA

Aus den Ergebnissen der ELISA mit den polyklonalen Ak können zwei wichtige Aussagen getroffen werden.

1. Der A β -38/40/42-Ak bindet mit der gleichen Effizienz sowohl unmodifiziertes als auch modifiziertes A β
2. Im Vergleich zu den monoklonalen Ak ist der A β -38/40/42-Ak sensitiver (ELISA-Signal von monoklonalen Ak <1 OD; s. Abbildung 17-19, von polyklonalen Ak 1,5 OD; s. Abbildung 20)

Im nächsten Schritt wollten wir in Erfahrung bringen, welche A β -Konzentrationen detektiert werden können. Dafür wurden verschiedene A β -Konzentrationen (120 ng, 360 ng und 1080 ng) in der modifizierten und unmodifizierten Form in einem ELISA-Verfahren mit einer A β -38/40/42-Ak-Verdünnung von 1:150 getestet. Abbildung 21 (n=3) zeigt, dass 120 ng des A β -Peptides sehr gut detektierbar sind.

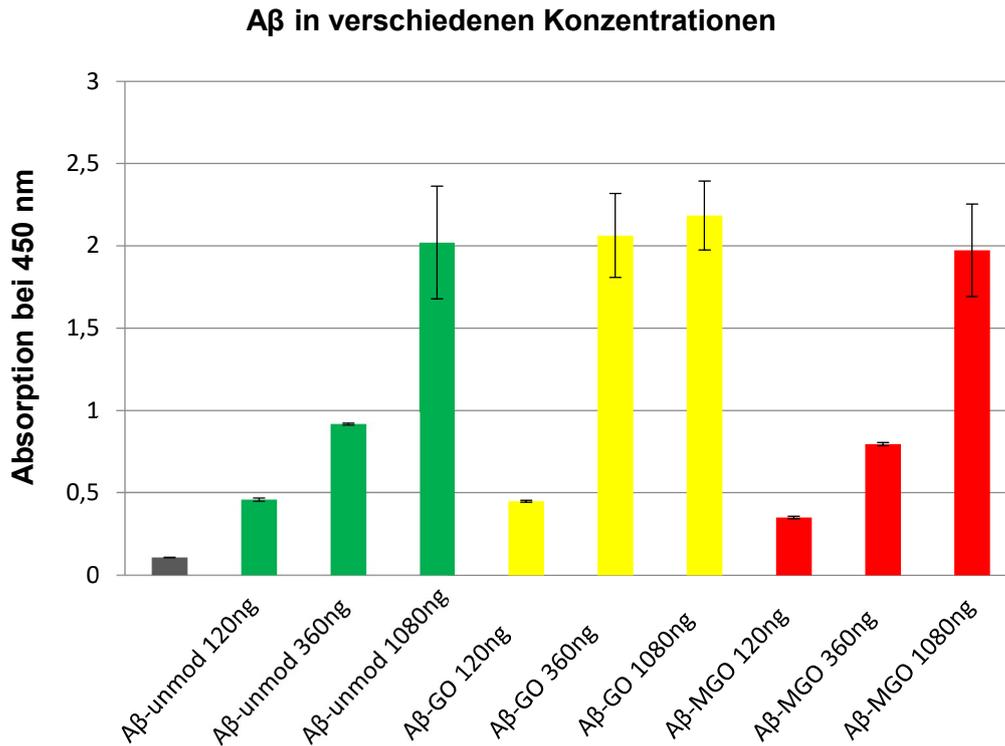


Abbildung 21: Sensitivität des ELISAs mit dem Anti- A β -38/40/42-Ak

Um die Spezifität der anti-CML- und anti-Argpyrimidin-Antikörper zu beurteilen, wurde eine 96 Wellplatte mit 0,5 μ g A β -38/40/42-Ak gecoatet. Danach wurde je 1,25 μ g unmodifiziertes und modifiziertes A β hinzugegeben. Es folgte die Inkubation mit Anti-CML-Ak oder Anti-Argpyrimidin-Ak. Wie in Abbildung 22 dargestellt, zeigt nur A β -GO ein Signal, während unmodifiziertes Peptid ein geringeres Signal aufweisen. Mit dem Anti-Argpyrimidin-Ak konnte beim A β -MGO ein positives Signal gemessen werden (Abbildung 23), allerdings ist das Signal nicht so stark wie beim CML. Als mögliche Erklärung könnte die Menge an Modifikationen per Peptid dienen. Zwei Lysine ergeben zwei CML gegenüber einem Arginin in der Sequenz des Peptides und entsprechen einer Argpyrimidin-Modifikation.

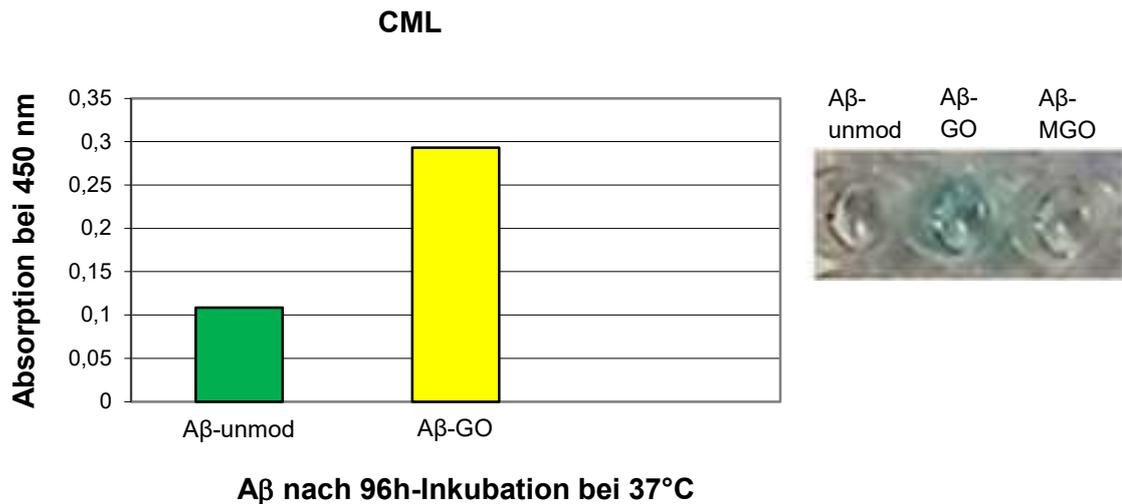


Abbildung 22: Aβ-CML-Detektion mittels ELISA

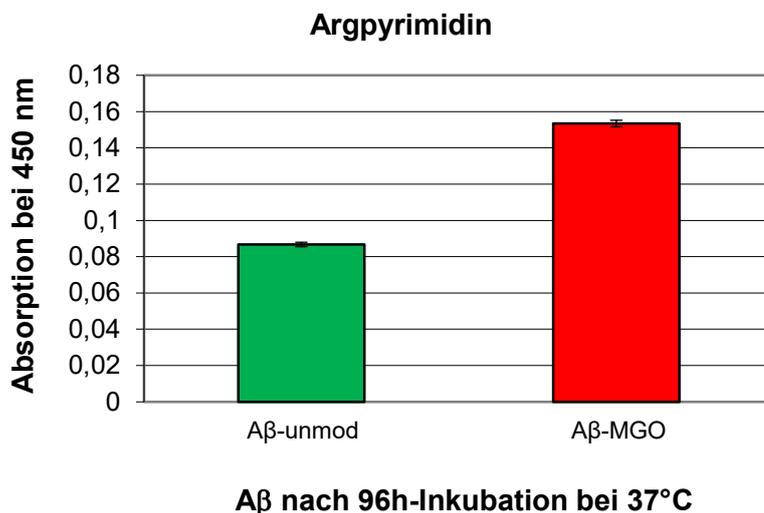


Abbildung 23: Aβ-Argpyrimidin-Detektion mittels ELISA

4.4 Etablierung der Messung von AGE-modifiziertem Aβ-Peptid mittels Durchflusszytometrie

Obwohl wir zeigten, dass mittels ELISA *in vitro* AGE-modifiziertes Aβ detektierbar ist, wollten wir eine alternative Methode entwickeln. Durchflusszytometrie mit multipler Analyse (*flow cytometric multiplex array* / BD cytometric bead array [CBA]) wird in der Literatur als eine vergleichbare Methode zu ELISA beschrieben. (Castillo und MacCallum 2012; Varro et al. 2007). Damit kann man mit einer geringeren Probenmenge (Liquor) mehrere Untersuchungsergebnisse erzielen. Allerdings ist dieser Assay für das in dieser Arbeit beschriebene Vorhaben nicht kommerziell zu erwerben.

Das Prinzip der CBA ist in Abbildung 24 (BD cytometric bead array) dargestellt. Es wird ersichtlich, dass 2 Antikörper mit unterschiedlichen Epitopen notwendig sind. Ein Antikörper gebunden an die Beads (*catcher antibody*) und ein Antikörper, der mit einem Fluorophor konjugiert ist (*detector antibody*).

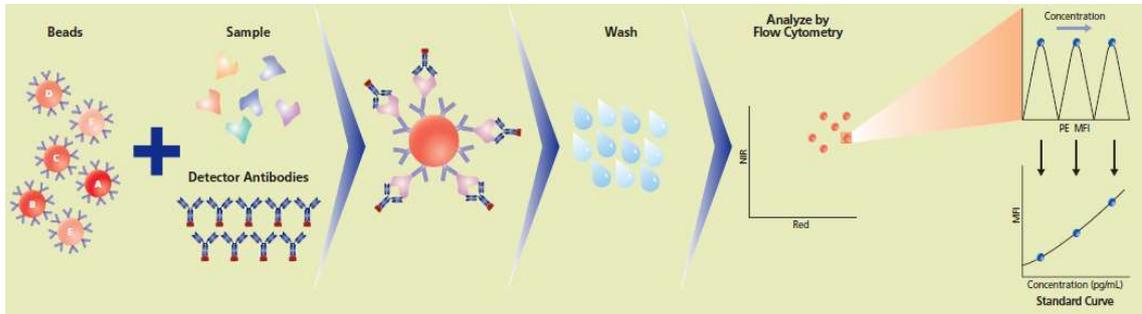


Abbildung 24: Prinzip der CBA (BD cytometric bead array) (Quelle: Becton 2019)

Für AGE-modifiziertes A β ist dieses Konstrukt nicht möglich, da die AGE-Modifikationen sehr klein sind. Zwei Antikörper würden nicht gleichzeitig die Modifikation binden können. Deswegen haben wir uns, wie in Abbildung 5 dargestellt, eine Variation der CBA-Methode überlegt. Der sog. *catcher antibody* in unserem Assay ist der A β -38/40/42-Antikörper. Als *detector antibody* fungiert ein Anti-CML-Ak mit Phycoerithrin (PE)-konjugiert. In Unterschied zum klassischen Assay benutzen wir zwei Antikörper, die zwei unterschiedliche Moleküle erkennen: Der eine das A β -Peptid (catcher Antikörper), der andere fluoreszenzmarkiertes CML an A β (detector Antikörper).

4.4.1 Etablierung einer CBA für die Analyse von AGE-modifiziertem A β -Peptid

Wie schon oben erwähnt, wurden mehrere Anti-A β -Ak auf die Bindung von AGE-modifiziertem Peptid geprüft. Der polykonale Antikörper A β -38/40/42 bindet sowohl unmodifiziertes als auch modifiziertes A β -Peptid mit der gleich hohen Effizienz. Deswegen wurde dieser für die Kopplung mit den Beads gewählt.

Die Qualität der Kopplung von Antikörpern an die Beads wurde mittels Durchflusszytometrie geprüft. Dafür wurden jeweils ungekoppelte und A β -38/40/42-gekoppelte Beads mit einem Anti-Kaninchen-Antikörper (bereits mit FITC konjugiert, s. 3.2.6 Tabelle 12) inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie. In Abbildung 25 ist zu sehen, dass Beads ohne gekoppelten A β -38/40/42-Antikörper, nur inkubiert mit den sekundären FITC-markierten Anti-Kaninchen-Ak, eine Fluoreszenz (links) hatten, die bei einem arithmetischen Mittel (englisch und im Durchflusszytometriegebrauch als „*Mean-Fluorescence-Intensity*“ [MFI] bezeichnet) von 19 lag. Nach der Inkubation der mit A β -38/40/42-Ak konjugierten Beads und dem

sekundären FITC-konjugierten Anti-Kaninchen-Ak stieg der MFI durch FITC um das 500-fache. Dies weist auf eine erfolgreiche Beads-A β -38/40/42-AK Kopplung hin.

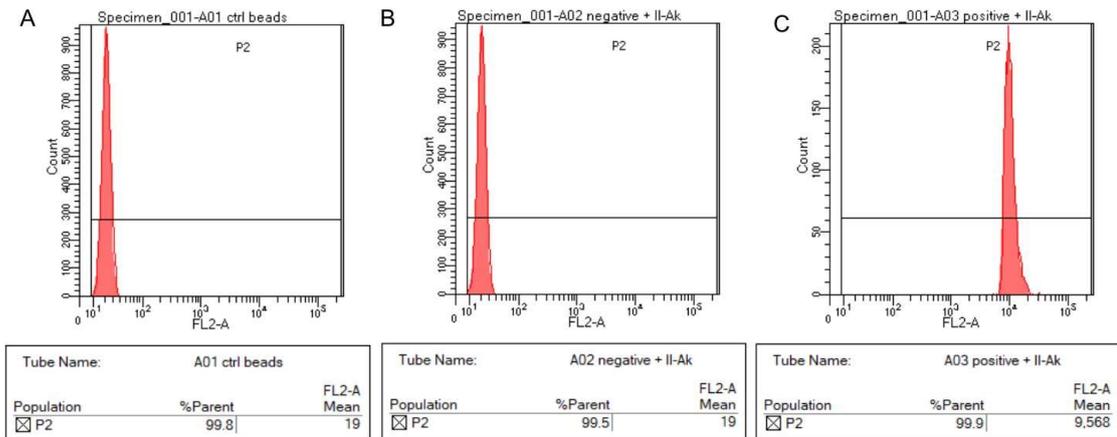


Abbildung 25: Analyse der Qualität der Kopplung von A β -38/40/42-Ak an die Beads mittels Durchflusszytometrie. A: Unkonjugierte Beads, B: Unkonjugierte Beads inkubiert mit dem Anti-Kaninchen-FITC markierten Antikörper, C: Konjugierte Beads mit dem A β -38/40/42-Antikörper und inkubiert mit dem Anti-Kaninchen-FITC markierten Antikörper

Nach der Kopplung der Beads mit dem A β -38/40/42-Ak wurde geprüft, ob die gekoppelten Beads A β in Liquor erkennen und binden können. Dafür wurde eine Liquorprobe mit Beads inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Elution des an die Beads gebundenen Materials. Die weitere Analyse erfolgte mittels Westernblots. Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, konnte das A β -Peptid mittels Anti-A β -Ak-gekoppelten Beads aus dem Liquor extrahiert werden. Die Beads binden auch an das vorläufige Protein APP (Amyloid-Precursor-Protein) von A β . Damit konnten wir beweisen, dass der erste Schritt des Assays funktioniert.

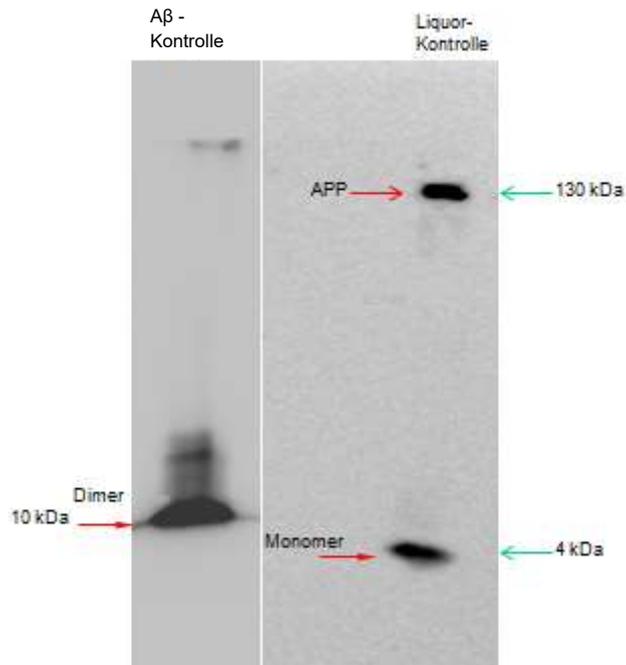


Abbildung 26: Immunpräzipitation zum Nachweis der A β -Bindung an die Anti-A β -Ak gekoppelten Beads

4.4.2 Optimierung des CBA-Assays für die CML-Detektion

Zur Optimierung der CBA-Methode führten wir eine Reihe von *in vitro* Versuchen mit verschiedenen Probenvolumina und Antikörper-Verdünnungen durch. Bei A β -Proben nach 96 h-Inkubation (in unseren Versuchen das Maximum der CML-Induktion) bei 37°C trat bei 9 μ g A β eine Sättigung der Signalverschiebung in der Fluoreszenz auf, so dass wir für weitere Versuche 5 μ g des modifizierten Peptides benutzten. Bei 1 μ l Beads verdoppelte sich die Signalverschiebung in der Fluoreszenz im Vergleich zu 3 μ l Beads. Wir gehen davon aus, dass bei 1 μ l Beads die Menge der gebundenen A β -modifizierten-Peptide pro Bead größer ist als in 3 μ l Beads. Entsprechend wird mehr Fluoreszenz pro Bead gemessen. Bei 3 μ l Beads sind vermutlich schwächere Signale auf mehrere Beads verteilt. Die Signalverschiebung in der Fluoreszenz bei einer Verdünnung von 1:5000 des CML-PE-konjugierten-Aks ergab die optimale Signal-zu Hintergrund-Ratio.

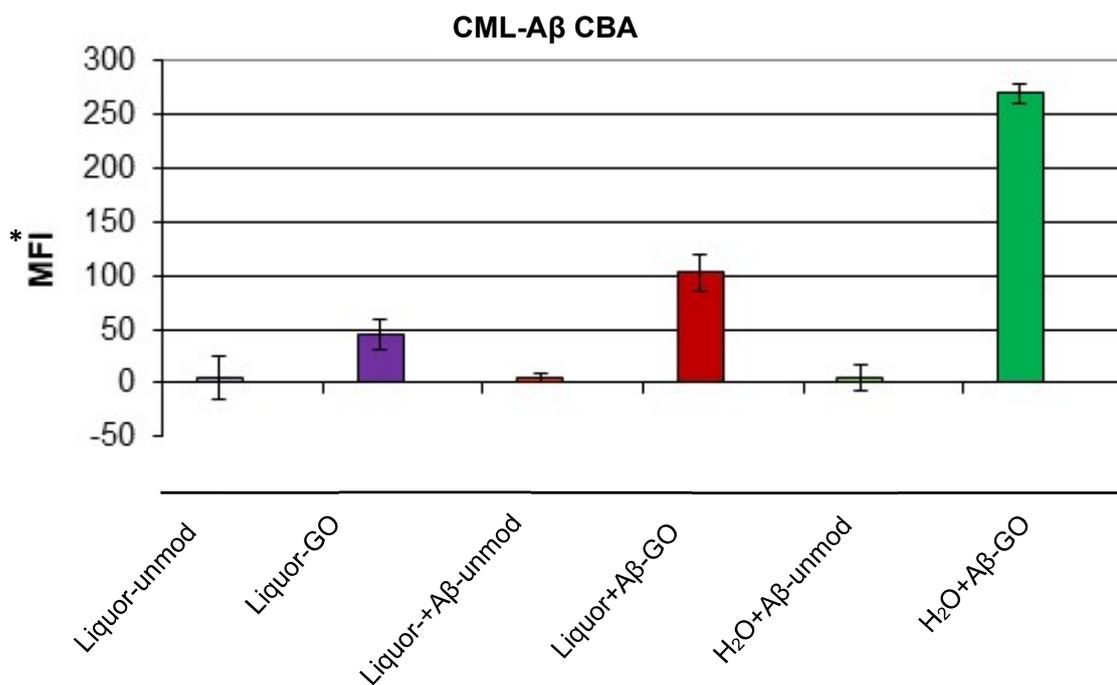
4.4.3 Spiking-Experimente zur Detektion von *in vitro* modifiziertem A β -Peptid in Liquor

Zur Überprüfung, ob CML-modifiziertes A β mit dem entwickelten Assay in Liquor detektiert werden kann, wurde folgende Analyse durchgeführt (n=3):

1. Analyse von 20 μ l Liquor-Proben ohne jegliche Behandlung
2. Analyse von 20 μ l Liquor-Proben nach einer Inkubation mit GO (Entstehung CML)

3. Spiking in Proben von 5 μl unmodifizierten A β -Peptiden in 20 μl Liquor
4. Spiking in Proben von 5 μl (mit GO) modifizierten A β -Peptiden in 20 μl Liquor
5. Analyse von unmodifiziertem 5 μl A β in H $_2$ O
6. Analyse von modifiziertem 5 μl A β in H $_2$ O

Nach Inkubation der oben genannten Proben mit 2 μl Anti-A β -Ak-gekoppelten-Beads, 5 μl 5x RIPA und H $_2$ O zu einem Endvolumen von 50 μl , wurden die Proben mit dem Anti-CML-PE-gekoppelten Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation und 2 x Waschen wurden die Proben mittels Durchflusszytometrie gemessen. Aus Abbildung 27 wird ersichtlich, dass mit dem entwickelten Assay CML-modifizierte A β -Peptide in Liquor detektiert werden können. Ein Vergleich der negativen (Liquor ohne Spiking) mit den positiven Proben (Liquor inkubiert mit GO bzw. Liquor gespiked mit modifiziertem A β Peptid) zeigt eine Verschiebung der MFI um 50-100 Einheiten. Modifiziertes A β in H $_2$ O zeigt eine noch deutlichere Verschiebung der MFI.



*MFI: Mean of fluorescence intensity

Abbildung 27: Detektion von CML-modifiziertem A β -Peptid in Liquor bzw. H $_2$ O mittels Durchflusszytometrie

Die Abbildungen 28 und 29 zeigen repräsentativ durchflusszytometrische Analysen des modifizierten A β -Peptides in H $_2$ O und Liquor. 1 μl Ak-gekoppelte Beads wurden jeweils mit 5 μl unmodifiziertem bzw. modifiziertem A β in H $_2$ O inkubiert. Nach Inkubation mit dem CML-PE-konjugierten Ak erfolgte die Analyse. Eine Veränderung des MFI-Signals (Erhöhung) in der Probe mit GO-behandeltem A β deutete im Vergleich zu

unbehandeltem Peptid auf eine Detektion von CML-modifiziertem A β hin (s. Abbildung 28).

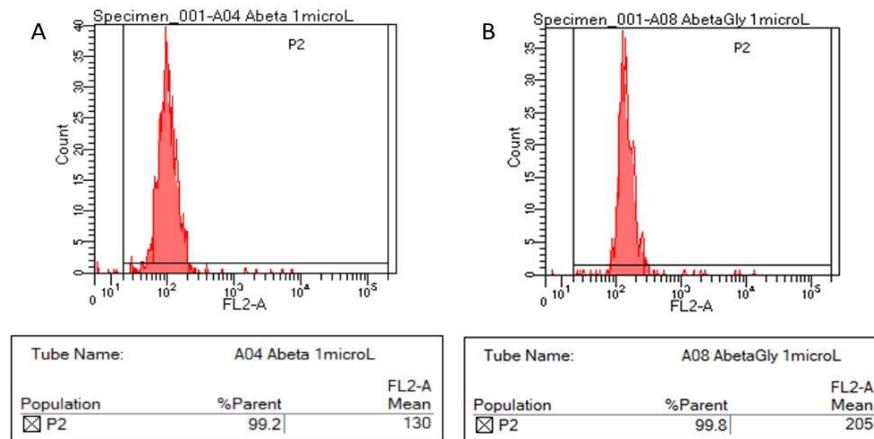


Abbildung 28: FACS-Analyse von unmodifiziertem A β (A) und mit Glyoxal modifiziertem A β (B) in H₂O

Je 5 μ g unmodifiziertes und modifiziertes A β wurden zu 40 μ l Liquor hinzugefügt. Nach Inkubation mit dem CML-PE-konjugierten Ak erfolgte die Analyse. Das Signal im Liquor unterscheidet sich vom Signal im H₂O. Für die Analyse wurde ein Marker gesetzt. Dieser Marker entsprach dem höheren Fluoreszenzsignal in der Liquorprobe mit unmodifiziertem A β -Peptid. (Abbildung 29, A). Die Analyse der Liquorprobe mit modifiziertem A β zeigte eine erhöhte Prozentzahl der Beads und MFI im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 29, B). Damit konnte gezeigt werden, dass modifiziertes A β im Liquor mit dem Assay nachweisbar ist.

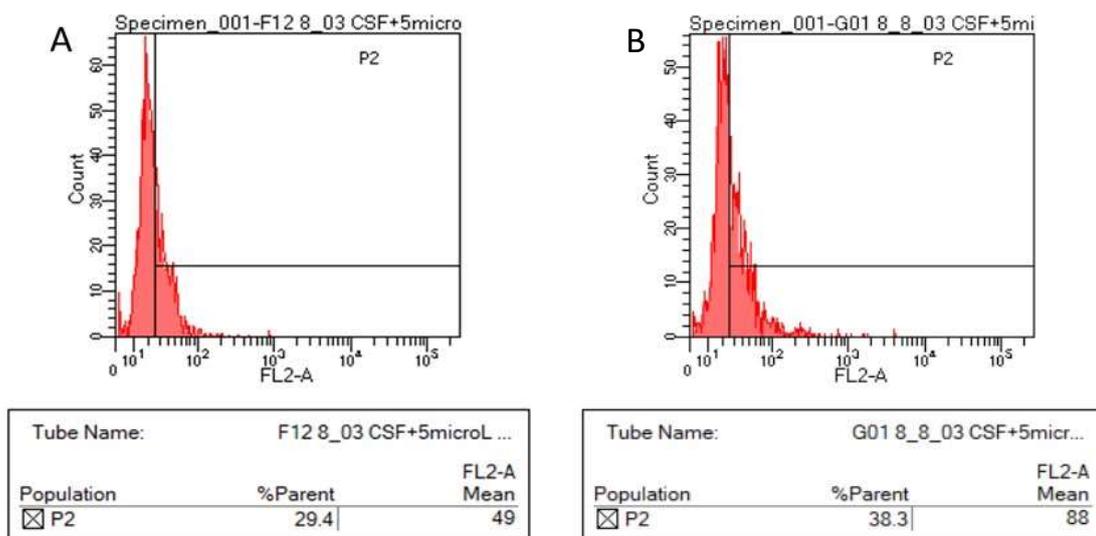


Abbildung 29: FACS-Analyse von unmodifiziertem A β (A) und A β -GO (B) hinzugefügt zu Liquor

Die Unterschiede zwischen den Messungen im H₂O und Liquor lassen vermuten, dass CML modifiziertes A β im Liquor *in vivo* existiert.

In einem anderen Experiment modifizierten wir Liquor mit 10 μ M Glyoxal für 24 h bei 37°C. *Abbildung 30* zeigt das Ergebnis der Analyse von unmodifiziertem Liquor (A) und modifiziertem Liquor mit Glyoxal (B). Durch die Behandlung der Liquorproben mit GO zeigte sich eine deutliche Erhöhung des Signals, sowohl in der Prozentzahl der Beads innerhalb des Markerbereichs (P2) als auch innerhalb des MFIs zu erkennen. Somit bestätigten wir noch einmal, dass CML-modifiziertes A β mittels des Assays in einer relevanten Probe wie Liquor nachweisbar ist.

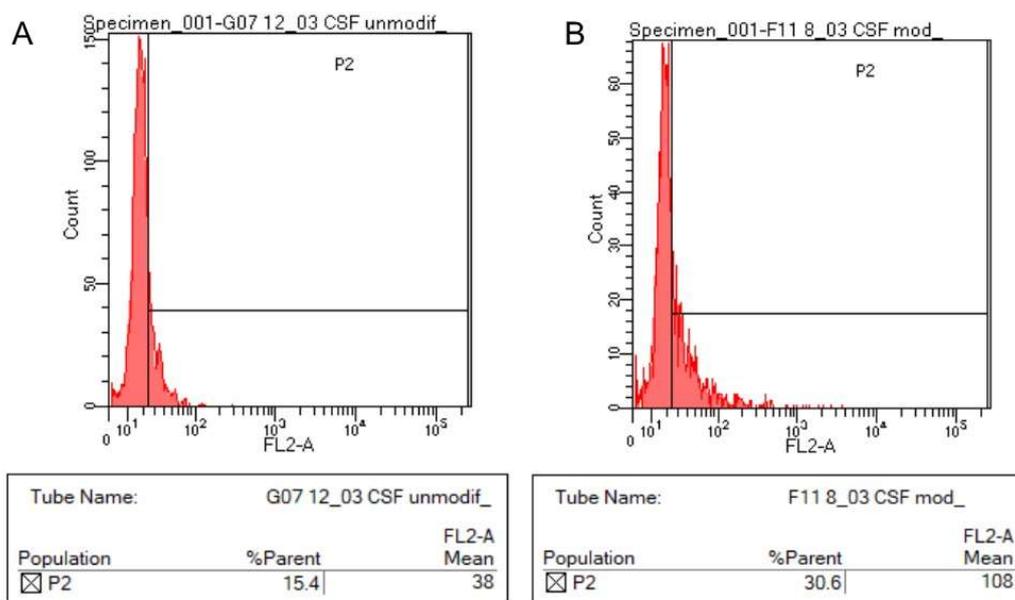


Abbildung 30: FACS-Analyse von unmodifiziertem Liquor (A) und mit Glyoxal modifiziertem Liquor (B)

In den folgenden Versuchen testeten wir die benötigte Menge von Liquor (ohne Zugabe von modifiziertem A β -Peptid, also *in vivo*), in dem ein deutliches Signal vom Hintergrund unterschieden werden konnte. Wie erwartet war das Signal abhängig vom untersuchten Liquorvolumen. Wenn wir 50 μ l Liquor benutzten, war das Signal nicht zufriedenstellend von Hintergrundstörfaktoren getrennt. Bei 100 μ l Liquor war die Unterscheidung des Signals von Hintergrundstörfaktoren zufriedenstellend, obwohl die Menge an Beads für die Detektion aller CML-modifizierten A β -Peptide ausreichend war. Bei 200 μ l Liquor war das Signal der MFI um das 3-fache stärker als bei 100 μ l Liquor (*Abbildung 31*). Damit zeigten wir, dass CML-modifiziertes A β *in vivo* im Liquor vorhanden war.

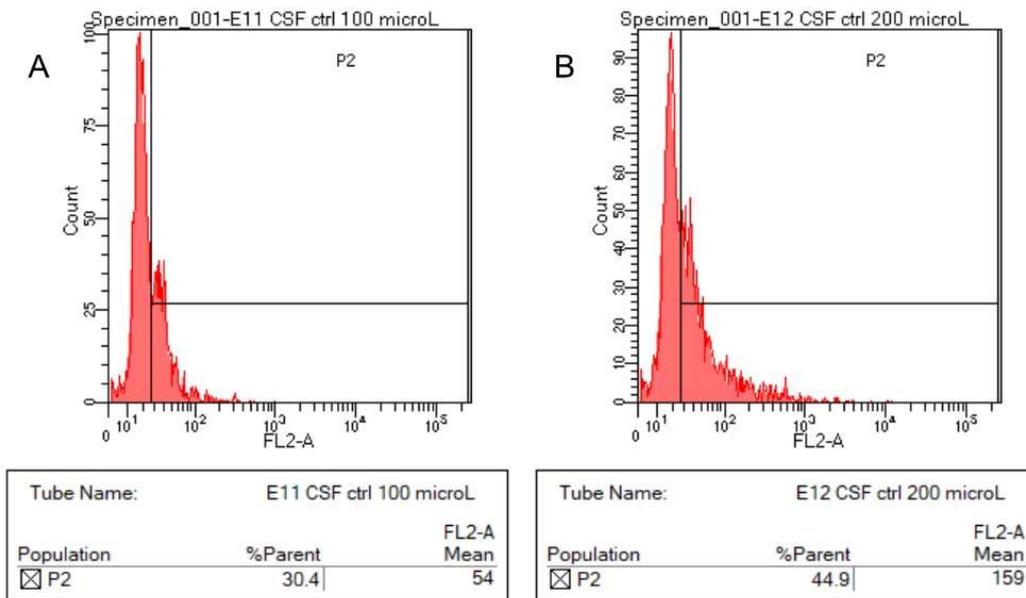


Abbildung 31: Durchflusszytometrische Analyse von 100 μ l (A) und 200 μ l (B) Liquor

4.5 Etablierung des Messprotokolls für die Analyse von Kontroll-Proben und AD-Proben

Nachdem wir die optimalen Bedingungen für die Analyse der Liquorproben gefunden hatten, legten wir als Ergebnis unserer Arbeit folgendes Protokoll für die Messung der klinischen Proben fest:

- Beads 5 min in Ultraschallbad
- Pro Ansatz 1 μ l Beads entspricht 6000 Beads und
- Pro Ansatz 200 μ l Liquor zu PBS-T
- 1 Stunde auf Schüttler inkubieren
- 2x Waschen / Pelletieren:
 - 125 μ l PBS-T hinzu, \rightarrow kurz (30 s) auf Schüttler
 - Zentrifugieren (25 min, 2000 rpm)
 - Überstand abnehmen
- Pellet in 50 μ l PE-gekoppelten Anti-CML-Akn (1:5000) lösen
- 1 h im Dunkeln (auf Schüttler) inkubieren
- 2 x Waschen / Pelletieren (s. oben)
- Pellet in 180 μ l PBS lösen (ggf. nochmals auf Schüttler)
- FACS Analyse

4.6 Analyse von Kontroll- und AD-Patientenproben mittels CML-CBA Assay

Von den 30 zur Verfügung gestellten Liquorproben waren 15 AD-Patienten, 2 gemischte Demenzpatienten und 13 Kontroll-Patienten. Zur Kontrollgruppe gehörten Patienten mit folgenden Diagnosen: Chronisches Schmerzsyndrom, leichte kognitive Störung, Verdacht auf organische Halluzinose, schizoaffektive Störung, paranoide Schizophrenie, rezidivierende depressive Störung, Hirnorganisches Psychosyndrom, kombinierte Persönlichkeitsstörung und Anpassungsstörung. Die Altersgrenzen der AD-Gruppe waren 58-83 Jahre, bei der Kontrollgruppe 55-86 Jahre. Da „nur“ eine klinische Diagnose der AD-Krankheit vorhanden war, entschieden wir uns dafür, die Proben als „Pool“ zu messen. Damit sollte die Variation einzelner Patienten in der Messung vermieden werden. Weiterhin sollte mit der Messung die Arbeitshypothese untersucht werden, ob in den AD-Proben mehr CML-modifiziertes-A β vorzufinden ist. In dieser Arbeit ging es vorrangig um die Etablierung der Methode, weshalb eine Gelegenheitsstichprobe mit n=30 Liquorproben im Sinne von Proof of Concept durchgeführt wurde. Abbildung 32 zeigt das Ergebnis der gepoolten AD- und Kontrollproben. Es ist ersichtlich, dass bei den AD-gepoolten Proben (drei unterschiedliche Pools) fast doppelt so viel CML-modifiziertes A β vorhanden ist wie bei der Kontrollgruppe. Zusätzlich erkennt man, dass obwohl 3 Pools von den gleichen Proben gemessen wurden, die Variation der Messungen sehr stark war. Trotzdem, ergab ein T-Test einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Pools ($p < 0,05$). Dieses Ergebnis entspricht der Arbeitshypothese, ist aber mit Vorsicht zu betrachten. Auf Grund der größeren Variation bei den Messungen und da die Proben sehr kostbar sind, führten wir keine einzelnen Messungen der Proben durch. Versuche, die Variation der Messungen der Proben zu verringern, führten leider nicht zu dem gewünschten Effekt.

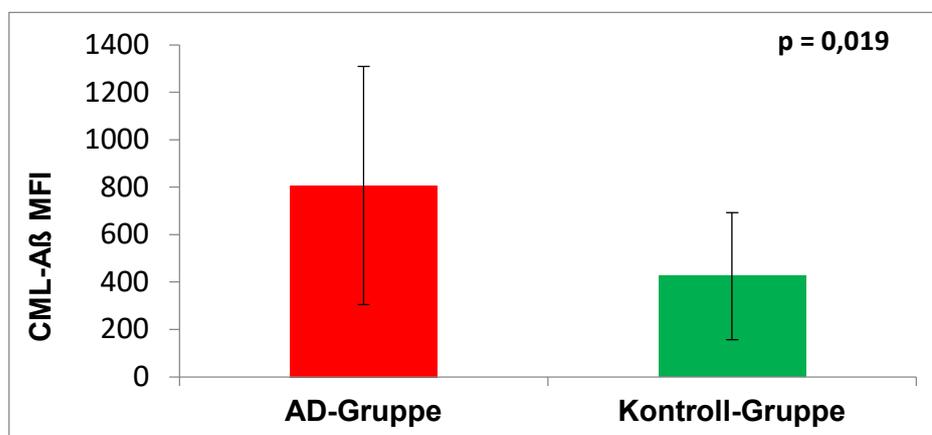


Abbildung 32: A β -CML bei AD- und Kontrollgruppe mittels FACS-Analyse (n=3)

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode für die *in vivo* Detektion von AGE-Modifikationen, v.a. CML an das Amyloid β -Peptid. Die Methode umfasst folgende Schritte: (a) Modifizierung von A β und Liquor *in vitro* mittels Inkubation mit AGE-Induktoren (Glyoxal=CML, Methylglyoxal=Argpyrimidin), (b) Fluoreszenzmessung der A β -AGE-Modifikationen, bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 440 nm (für die Detektion aller fluoreszierenden AGEs), (c) Fluoreszenzmessung der A β -AGE-Modifikationen, bei einer Anregungswellenlänge von 330 nm und einer Emissionswellenlänge von 405 nm (für die Detektion von AGE-Modifikationen Pentosidin und Argpyrimidin), (d) Westernblot zur Detektion von CML-modifiziertem und unmodifiziertem A β -Peptid, (e) Slot-Blot und ELISA zur Detektion von unmodifiziertem und modifiziertem A β (nach 24h-Inkubation) mit N-terminalen-A β -Akn (6E10, 4G8) und C-terminalem-A β -Ak (8G7), (f) Messung von AGE-modifiziertem A β -Peptid mittels CBA (cytometric bead array), (g) Spiking-Experimente und FACS-Analyse zur Detektion von CML-modifiziertem A β -Peptid in Liquor bzw. H₂O mittels Durchflusszytometrie. Wir konnten durch unseren Test nachweisen, dass bei den AD-Patienten CML-modifiziertes A β im Liquor signifikant erhöht ist.

5.1 Die Diagnostik-Methoden

5.1.1 Die CBA-Methode

Die Grundlage der CBA-Methode besteht darin, dass an jeden Bead-Typ ein spezifischer Antikörper konjugiert ist. Für unsere Methode wird ein zweiter, mit einem Fluorophor konjugierter Detektorantikörper benötigt, der eine andere spezifische Fluoreszenzintensität zeigt (s. Abbildung 5). Die Proben können mit einem Set an Beads inkubiert werden, um ein breites Spektrum von Proteinen gleichzeitig nachzuweisen. Wir führten unsere Messungen nur für A β -GO durch, der Assay könnte in weiteren Versuchen um A β -MGO erweitert werden. Ein Vorteil des CBA-Systems ist, dass es mit dem bereits im Labor installierten Durchfluss-Zytometer durchgeführt werden kann (Furuya et al. 2019). Sofern das System mit dem richtigen Laser und der richtigen Optik ausgestattet ist, kombiniert es die Prinzipien des "Sandwich"-Immunoassays mit der Durchflusszytometrie zur gleichzeitigen Messung der Eigenschaften mehrerer Partikel (Cook et al. 2001). Dies macht seine Verwendung recht einfach. Ein weiterer Vorteil des Systems ist, dass nur eine sehr kleine Probenmenge benötigt wird. Cook et al. berichten erfolgreiche Bestimmung von sechs verschiedenen Zytokinen aus nur 5-15 μ l Probenmenge (Tränen) (Cook et al. 2001).

Es gibt CBA-Kits für eine Vielzahl von Produkten von Liganden (Elshal und McCoy 2006). Daten zur Quantifizierung viraler Proteine (Yan et al. 2004) und menschlicher Zytokine, z.B. IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ und TNF- α (Morgan et al. 2004) sind bereits veröffentlicht. Ribeiro-Santos et al. führten z. B. CBA-Messungen im Blut zur Bestimmung 7 verschiedener Zytokine durch. Sie stellten die Vermutung auf, dass erhöhtes IL-6 negativ mit der kognitiven Leistung bei Schizophrenie-Patienten korreliert (Ribeiro-Santos et al. 2020). Im Unterschied zum klassischen Assay benutzten wir zwei Antikörper, die zwei unterschiedliche Moleküle erkennen: Der eine erkennt A β -Peptid (A β -38/40/42-Ak, *catcher* Antikörper), der andere erkennt fluoreszenzmarkiertes CML an A β -Peptid (Anti-CML-Phycoerythrin (PE)-konjugierter AK, *detector* Antikörper). Der Antikörper A β -38/40/42 bindet sowohl unmodifiziertes als auch modifiziertes A β -Peptid mit der gleichen Effizienz.

5.1.2 Vergleich der Cytometric Bead Assay-Methode zu ELISA oder Westernblot

CBA-Tests haben sich als einfach durchführbar und reproduzierbar erwiesen. Angesichts der Tatsache, dass diese Assays auch kosten- und zeiteffektiv sind und die Anforderungen an das Probenvolumen minimieren, ist es wahrscheinlich, dass diese Multiplex-Bead-Array-Assays immer häufiger eingesetzt werden. Zusätzlich ermöglichen sie die quantitative Messung einer großen Anzahl von Analyten unter Verwendung von 96-Well-Plattenformaten (Ahsan 2022; Furuya et al. 2019). ELISA ist seit langem das Standardverfahren für quantitative Analyse von Biomarkern, allerdings für Multiplex-Analysen mit hohem Durchsatz nicht geeignet. Multiplex-Assays können Biomarker über einen größeren Bereich als kommerzielle ELISA-Kits quantifizieren, aber kommerzielle ELISA-Kits können im Bereich niedrigster Konzentration besser detektieren (Furuya et al. 2019). Eine Vielzahl von Studien hat gute Korrelationen zwischen Multiplex-Bead-Array-Assays und entsprechenden ELISA-Messungen gezeigt, wenn identische Capture- und Reporter-Antikörper sowie ähnliche Verdünnungsmittel und Serumblocker verwendet werden, so dass die Variabilität minimiert wird und ähnliche quantitative Werte erreicht werden (Chen et al. 1999). Vor diesem Hintergrund sollte jede Studie, bei der Patienten oder andere Proben sequenziell überwacht werden, für alle Proben nur mit einer einzigen Technik, einer einzigen Plattform und demselben kommerziellen Anbieter durchgeführt werden (Elshal und McCoy 2006). CBA verwendet Fluoreszenzsysteme, um die Bindung des sekundären Antikörpers an den löslichen Liganden nachzuweisen, während ELISA im Allgemeinen die enzymatische Amplifikation eines kolorimetrischen Substrats verwendet. Außerdem wird für CBA-Experimente der Einfang-Antikörper (*catcher* Ak) in Suspension auf kugelförmigen Beads immobilisiert und nicht auf der im ELISA verwendeten flachen Oberfläche. Es sind

die Fluoreszenzintensitäten dieser kugelförmigen Beads, die die Multiplexkapazität solcher Technologien bereitstellen (Richens et al. 2010). Die meisten Studien, die CBA und ELISA verglichen haben, haben Zytokine quantifiziert. Generell zeigte sich eine gute Korrelation zwischen CBA und ELISA. Es wurde wenig oder gar keine Kreuzreaktivität zwischen den Zytokin-Antikörpern beobachtet (Kellar und Douglass 2003). Obwohl Multiplex-Assays von verschiedenen Anbietern ähnliche Trends bei den Zytokinspiegeln zeigen, variieren die gemessenen absoluten Zytokinspiegel (Khan et al. 2004). Daher sollten auch CBA-Tests von verschiedenen Anbietern nicht als austauschbar angesehen werden. Die unterschiedlichen absoluten Zytokinwerte in verschiedenen Kits können höchstwahrscheinlich durch den Einsatz unterschiedlicher Antikörper und die vom Hersteller empfohlene verschiedene Inkubationszeiten der Proben erklärt werden (Dupuy et al. 2013).

Stavnsbjerg et al haben gezeigt, dass störende Effekte bei Zytokinmessungen mittels ELISA und Multiplex-Assays durch 10-Fache Verdünnung von Tumorlysaten die genaueste Messung liefern, ohne die interessierenden Zytokine zu verdünnen. Zusätzlich sollte auf eine sorgfältige Auswahl der Lysepuffer-Komponenten geachtet werden. Generell sollte beim Vergleich von Studien berücksichtigt werden, dass verschiedene Assays wie ELISA und Multiplex-Assays nicht zu denselben absoluten Konzentrationen führen (Stavnsbjerg et al. 2022).

Wir suchten durch das ELISA-Verfahren den bindungsstärksten monoklonalen und polyklonalen A β -Ak aus und zeigten u.a. dass ab einer Konzentration von 120 ng das A β -Peptid sehr gut per ELISA detektierbar ist. Zum Schluss detektierten wir CML- und Argpyrimidin-modifiziertes A β mittels ELISA. Da ELISA in der Literatur Schwachstellen bei der Bestimmung von Alzheimer-Demenz zeigt und wir ein alternatives Verfahren suchten, führten wir unsere Liquormessungen nur mit der modifizierten CBA-Methode durch. Stehn et al. konnten zeigen, dass die Oligomerisierung von A β -Peptiden die Interpretation von ELISA-Messungen erschwert, da A β -Aggregate durch ELISA ineffizient nachgewiesen werden, was zu einer Unterschätzung der A β -Spiegel führt (Stenh et al. 2005). Interessanterweise deuten die verringerten Plasma-A β -Spiegel unter den Trägern der sog. arktischen Mutation darauf hin, dass oligomere Formen von A β , d.h. Protofibrillen, im Plasma existieren könnten. Transgene Studien mit der Arktis-Mutation bestätigten die Wahrnehmung, dass A β -Oligomerisierung und -Fibrilierung von zentraler Bedeutung für die AD-Pathogenese sind (Cheng et al. 2004). Das unterstreicht den großen Bedarf an Methoden zur Unterscheidung und Quantifizierung verschiedener löslicher A β -Spezies, um ein besseres Verständnis von A β -Oligomeren in AD zu erlangen. Die Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen ist ein häufiges

Thema bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen, z. B. Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose und Prionenerkrankungen. Hier könnten, laut Stenh et al., neue ELISAs mit konformationsspezifischen Antikörpern für die Analyse neurotoxischer oligomerer Spezies nützlich sein (Stenh et al. 2005).

Die Vorteile der CBA-Methode gegenüber Western Blots zur Untersuchung der Zellsignalisierung bestehen darin, dass mehrere Parameter mit derselben Probe aus einem geringen Probenvolumen gemessen werden können. Darüber hinaus benötigt der Assay weniger Zeit und die Ergebnisse sind quantitativ messbar (Morgan et al. 2004). Mit der CBA-Methode können bis zu 30 Proteine gleichzeitig in einem Probenvolumen von 25-50µl bestimmt werden. Mit ELISA oder Westernblot kann mit demselben Probenvolumen nur ein Protein bestimmt werden. Mit dem BD CBA Enhanced Sensitivity Flex Set System können Proteinmengen von 0,274 pg/ml in einem multiplexed assay bestimmt werden. Außerdem kann kostbare Zeit gespart werden, weil jeder Bead eine eigene Fluoreszenzintensität hat, so dass mehrere Beads gleichzeitig in einer Probe gemessen werden können. Wir haben uns für die Detektion von CML am Aβ-Peptid mittels Westernblot entschieden, da CML ein nicht fluoreszierendes AGE ist und eine Messung der Fluoreszenz nach der Inkubation von Aβ-Peptid mit Glyoxal keine Auskunft über die Existenz von CML geben kann. Wir konnten kein CML-modifiziertes Aβ mittels Westernblot detektieren, und vermuten, dass Glyoxal und Methylglyoxal das Aβ-Peptid sehr stark aggregieren, so dass das Protein nicht ins Gel hineinlaufen kann.

5.1.3 Hautautofluoreszenz und Korrelation mit MCI/AD

AGEs in Geweben können mithilfe der relativ einfachen nichtinvasiven Messung der Hautautofluoreszenz (HAF) gemessen werden. Ein erhöhter HAF-Wert entspricht einem hohen AGE-Level im Gewebe (Drenth et al. 2017). Meerwaldt et al. fanden z.B. eine starke Korrelation zwischen HAF und dem Hautgehalt von AGEs, einschließlich Pentosidin, N(ε) - (Carboxymethyl) Lysin (CML) und N(ε) - (Carboxyethyl) Lysin (CEL) bei Diabetikern. HAF-Werte korrelieren mit Alter, Dauer der Diabeteserkrankung, mittleren HbA1c-Werten vom letzten Jahr und Kreatininwerten (Meerwaldt et al. 2004).

Igase et al. publizierten die erste Studie, die einen hoch signifikanten Zusammenhang zwischen MCI und HAF in einer nicht-diabetischen gesunden Bevölkerung nachwies. Sie analysierten die mögliche Assoziation von HAF und MCI in Erwachsenen mittleren Alters und älteren gesunden Probanden. Ihre drei Hypothesen ließen sich bestätigen: (a) HAF korreliert signifikant mit der Hirnatrophie im Schläfenhornbereich, (b) HAF ist bei MCI-Patienten signifikant höher als bei normalen Probanden, und (c) HAF ist eine unabhängige Determinante von MCI bei scheinbar gesunden Probanden. Die o.g.

Ergebnisse, dass HAF ein unabhängiger MCI-Screening-Marker für gesunde Menschen zu sein scheint und dass eine erhöhte HAF das Auftreten von Demenz vorhersagen könnte, legen nahe, dass die HAF-Untersuchung in routinemäßige medizinische Untersuchungen einbezogen werden sollte (Igase et al. 2017). Allerdings zeigt die HAF keine Spezifität für die Diagnose von AD oder Diabetes. Zusätzliche Nachteile der HAF als einziger Diagnostikmarker sind Folgende:

Erstens kann sie durch andere fluoreszierende Verbindungen (Fluorophore) als AGEs beeinflusst werden. Ein potentiell störendes Fluorophor, das in residenten Hautzellen enthalten ist, ist die reduzierte Form von NAD(P) [z.B. NAD(P)H; Anregung bei 350 nm, Emission bei 460 nm].

Zweitens ist es wahrscheinlich, dass die HAF auch durch vorübergehende Veränderungen der interstitiellen und möglicherweise auch intrakapillären Konstitution von Verbindungen mit fluoreszierenden Eigenschaften beeinflusst wird (Mulder et al. 2006). Mehrere Chromophore können auch eine unerwünschte Varianz bei der AF-Messung der Haut durch Absorption von Anregung, aber auch Emission von Fluoreszenzlicht induzieren. Hämoglobin und Melanin sind bei weitem die wichtigsten Störfaktoren, die Licht im Bereich von 330-400 nm absorbieren können. Zusätzlich wurde die epidermale Dicke als Störfaktor erwähnt. Sandby-Møller et al. zeigten, dass nur die Hautpigmentierung (z. B. Melanin) und in viel geringerem Maße die Rötung (z. B. Hämoglobin) die Menge des Emissionslichts von der Haut signifikant beeinflussen kann und dass der Effekt der epidermalen Dicke vernachlässigbar ist. Der Einfluss der Hautabsorption wird weitgehend korrigiert, wenn AF als relativer Wert dargestellt wird. Es besteht jedoch weiterhin die Sorge, dass insbesondere die Hautpigmentierung zu unerwünschten intra- und interindividuellen Abweichungen bei den Messungen führen kann (Sandby-Møller et al. 2003; Mulder et al. 2006).

Nach der Etablierung unserer Methode können AGE-Modifikationen in der Haut von AD-Patienten und Kontrollprobanden gemessen werden. Es wird eine Korrelation des AGE-Gehalts der Haut mit dem klinischen Status der Patienten erwartet. Es soll analysiert werden, ob glykiertes A β in Liquor und Plasma mit dem AGE-Gehalt (Messung der Hautfluoreszenz) korreliert.

5.2 AGEs und Morbus Alzheimer

Methylglyoxal, der Vorläufer von Argpyrimidin, wird unter anderem durch die nichtenzymatische Maillard-Reaktion von Ascorbat gebildet (Reddy et al. 2002). Es wird angenommen, dass Methylglyoxal eine der Hauptquellen für AGEs in Geweben ist.

Methylglyoxal kann zur Neurodegeneration beitragen, indem es oxidativen Stress auslöst, der ein Ungleichgewicht zwischen der Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies und ihrer Entgiftung durch endogene Systeme, insbesondere Glutathion und Glutathionperoxidase, widerspiegelt. Methylglyoxal würde die Glutathionperoxidase direkt inaktivieren, was zu einem erhöhten Gehalt an intrazellulären Peroxiden und einer anschließenden Zellschädigung führen würde (Amicarelli et al. 2003). Bär et al. untersuchten die CML- und Pentosidinspiegel in gepaarten Blut- und Liquorproben von Patienten mit Alzheimer-Demenz, vaskulärer Demenz (VD) und Kontrollen. Die CML-Spiegel waren im Serum von AD-Patienten signifikant verringert und im Liquor dieser Gruppe im Vergleich zu altersangepassten Kontrollen signifikant erhöht. Es gab keinen signifikanten Unterschied für die CML-Konzentrationen im Serum oder Liquor im Vergleich von Patienten mit leichter AD zu Patienten mit mittelschwerer bis schwerer AD (Bär et al. 2003). In der AD-Gruppe wurde keine Veränderung der Pentosidinspiegel im Serum oder Liquor beobachtet, während Serum-Pentosidine in der VD, im Vergleich zu altersangepassten Kontrollen, deutlich erhöht waren. Da Pentosidin nicht verändert wurde, könnte dies bedeuten, dass eine erhöhte CML möglicherweise nicht nur spezifisch für das ZNS und die umgebenden CSF-Räume ist, sondern auch eng mit der Alzheimer-Pathologie verbunden ist (Bär et al. 2003).

Monacelli et al. zeigten in einer kleinen Studienpopulation, dass Liquor-Pentosidin mit zunehmendem Alter generell ansteigt, allerdings bei AD-Patienten erniedrigt ist. CML im Liquor zeigte keinen eindeutigen Trend. Patienten mit koronarer Herzkrankheit und Diabetes wurden ausgeschlossen (Monacelli et al. 2014).

In unseren Versuchen modifizierten wir A β sowohl mit Glyoxal als auch mit Methylglyoxal. Lediglich unsere CBA-Methode untersuchte nur CML-modifiziertes A β in Liquor. Wir konnten einen erhöhten Spiegel bei AD-Patienten detektieren.

Castellani et al. berichteten über die genaue Co-Lokalisierung von CML und Hexitol-Lysin mit der neurofibrillären Pathologie von AD. CML und andere AGEs weisen nicht nur auf aktiven oxidativen Stress in der Pathologie von AD hin, sondern können, durch Bindung von redoxaktiven Übergangsmetallen, weitere oxidative Schäden auslösen. Die Präsenz von CML und Hexitol-Lysin in verstreuten neurofibrillären Verwicklungen sowie die zytoplasmatische neuronale Färbung in Hippocampus-Pyramiden-Neuronen, die nicht an der neurofibrillären Pathologie beteiligt sind, liefern starke Beweise dafür, dass die AGE-Bildung ein frühes Ereignis im neurodegenerativen Prozess ist (Castellani et al. 2001). Pentosidin, jedoch nicht CML, wurde in der faserartigen Struktur des Neuopils und der senilen Plaque beobachtet. Eine denkbare Erklärung für die festgestellte

Diskrepanz ist der Unterschied des Vorläufers für diese AGE-Strukturen. Obwohl angenommen wird, dass Glucose ein Hauptvorläufer für AGEs ist, haben neuere Studien gezeigt, dass Pentosidin und CML auch *in vitro* durch Reaktionen von Protein mit Ascorbat, Ribose und anderen Kohlenhydratquellen gebildet werden können. Daher können Pentosidin und CML *in vivo* unterschiedliche Vorläufer aufweisen. Interessanterweise könnte Pentosidin aus pathologischer Sicht aufgrund seiner charakteristischen Eigenschaft als potenter Proteinvernetzer (eine Eigenschaft, die in CML nicht vorhanden ist) zur extraneuronalen faserartigen Struktur und senilen Plaques beitragen (Horie et al. 1997). CML-Reaktivität ist im Zytoplasma von Neuronen vorhanden, mit Unterschieden in der Expressionsintensität, der Anzahl der Zellen und der topografischen Verteilung. Die CML-Expression ist im Hippocampus höher als im frontalen und temporalen Cortex. Bei AD-Patienten wurde festgestellt, dass CML zusammen mit Tau-Protein exprimiert wird, was eine ähnliche neurofibrilläre Verwicklungsform zeigt, in neuritischen Plaques, jedoch nicht im Kern von Amyloid-Plaques. Die höchste Reaktivität wird bei Patienten mit gleichzeitiger AD und DM beobachtet, gefolgt von Patienten mit individuellem Auftreten von AD, DM und Kontrollgruppen (Gironès et al. 2004). Manche Studien konnten keine Korrelation zwischen CML und AD nachweisen. Seidl et al. fanden keinen Unterschied der CML- oder Pentosidinkonzentrationen im frontalen Kortex von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu Kontrollpatienten (Seidl et al. 1997).

CML und Pentosidin wurden im Serum und zirkulierenden extrazellulären Vesikeln gemessen. Der CML-Spiegel war im Frühstadium von AD erhöht, während der Pentosidinspiegel unverändert blieb. Der CML-Spiegel in den extrazellulären Vesikeln war im mittelschweren Stadium der AD niedriger als in der Kontrollgruppe (Haddad et al. 2019).

Sharma et al. untersuchten AGEs wie CML und CEL, Marker für oxidativen Stress, im Plasma von Parkinson- und Alzheimer-Patienten sowie Kontrollpersonen. Es zeigten sich höhere CML-Spiegel bei AD- und Parkinson-Patienten verglichen mit der altersangepassten gesunden Kontrollgruppe. Allerdings zeigten weibliche AD-Patienten niedrigere CEL-Spiegel (Sharma et al. 2020). Die geschlechtsspezifischen Unterschiede im AGE-Plasmaspiegel von AD-Patienten sollten in zukünftigen Studien berücksichtigt werden.

AD-Patienten zeigten sowohl in Plasma als auch in Liquor einen deutlichen Anstieg der cysteinylierten und gleichzeitig glykierten sowie oxidierten und zusätzlich glykierten Albuminformen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ansonsten war der glykierte

Albuminspiegel im Liquor zwischen den AD-Patienten und Kontrollpersonen ähnlich. Aber es wurde eine höhere Albumin-Glykierung im Plasma als im Liquor der AD-Patienten festgestellt (Costa et al. 2019).

AGEs und RAGE im Hippocampus sind auch bei anderen neurologischen Erkrankungen wie bei MS-Patienten vorhanden. Das MGO-abgeleitete AGE, N δ -(5-Hydro-5-methyl-4-imidazol-2-yl)-ornithin, zeigte sich in der weißen Substanz von MS-Patienten verglichen mit der Kontrollgruppe erhöht. Freie AGEs im Plasma - nicht proteingebundene AGEs - korrelierten mit ihren jeweiligen Spiegeln im Liquor. Plasmaprotein-gebundene CEL-Spiegel waren bei MS-Patienten erhöht, korrelierten allerdings nicht mit den Liquor-Spiegeln (Wetzels et al. 2019).

Hu et al. synthetisierten 2 glykierte A β ₄₂-Peptide, in dem sie das Lysin an der Stelle 16 und 28 mit CML ersetzten. Sie zeigten, dass die Glykation, v.a. an Position 28, den Aggregationsprozess verlangsamt, indem Amyloid-Fibrillen viel langsamer gebildet werden, und mehr Zytotoxizität induziert. Acetylierung von Lysin 16 reduziert die Aggregationseigenschaften von A β und die Acetylierung von Lysin 28 verlangsamt die A β ₄₂-Fibrillierungsrate. Sie vermuten deshalb, dass A β in einem stabileren Oligomerezustand verbleiben würde, wenn mehr glykiertes A β koexistent wäre (Hu et al. 2021). Wir konnten im Westernblot kein modifiziertes A β nachweisen und vermuteten, dass aufgrund der Aggregationen das Protein erst gar nicht in das Gel hineinlief.

Unsere Daten suggerieren, dass CML-modifiziertes A β in Liquor von AD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe in doppelter Menge vorkommt. Allerdings beruhen unsere Messungen auf dem Ergebnis aller gemessenen Proben in den AD- und Kontrollgruppen als Kollektiv. Aufgrund der geringen Probenzahl wurden die Proben gepoolt in 2 Gruppen (AD-Gruppe und Kontrollgruppe) gemessen. Wenn man CML-modifiziertes A β in Liquor von AD- und Kontrollproben vergleicht, ist eine signifikante Erhöhung der CML-modifizierten A β in der AD-Gruppe ($p = 0.019$) zu beobachten. Das Ergebnis wird jedoch mit Vorsicht betrachtet. Zum einen standen eine geringe Anzahl von Proben (15 AD, 13 Kontrollen) zur Verfügung. Zum anderen ist zwar eine AD-Diagnose durch die Feststellung der klassischen AD-Merkmale wie A β -Plaques und neurofibrillären Tangles im Gehirn zu 100% sicher, jedoch ist diese Feststellung nur nach dem Tod der Patienten möglich. Dies erklärt, weshalb für die Arbeit Pools der Proben analysiert wurden. Primär ging es in dieser Doktorarbeit um die Etablierung der Methode. Die Messung an Patientenmaterial sollte die Tauglichkeit der Methode mit klinisch relevanten Proben bestätigen.

5.3 Limitationen der Methode

Nachfolgende Limitationen sind für unsere Methode zu berücksichtigen:

- Die gemessene Fluoreszenz kann keine direkten quantitativen Informationen über die Konzentrationen einzelner Verbindungen liefern (Meerwaldt et al. 2004). Hierzu wäre eine Eichkurve mit modifiziertem A β herzuleiten, wie es üblicherweise bei CBA durchgeführt wird, um anhand dieser Kurve die unbekannte Konzentration der CML-modifizierten A β zu bestimmen.
- Sie kann keine Auskünfte geben bzgl. einer Anwendung dieser Methode in anderen Körperflüssigkeiten. Liquor wurde deshalb untersucht, weil die Menge von A β hier höher ist.
- Die größte Limitation der Arbeit ist die geringe Anzahl der analysierten Proben. Zusätzlich konnte die Variation in der Messung von Probe zu Probe nicht gelöst werden. Das Ziel der Methodenuntersuchung beabsichtigt in erster Linie die Etablierung der Methodik zur Messung modifizierter A β s. Weitere Studien über die Anwendbarkeit der Methode in der AD-Diagnostik sind erforderlich und sind zu konzipieren.

5.4 Perspektiven: Neuer Assay für die Diagnostik

Uns ist gelungen, eine Methode zu entwickeln, welches CML-modifiziertes A β in Liquor durchflusszytometrisch detektieren kann. Dies ist bisher einmalig.

Vorteile der Methode sind:

- Es wird eine geringe Probenmenge benötigt.
- Mehrere Analyten können gleichzeitig gemessen werden.

Nachteil der Methode ist:

- Unsere Messung erfolgt im Liquor. Die Probenbeschaffung ist invasiver als z.B. die AGE-Messung durch fluoreszenzbasierte Hautscans (z.B. durch den AGE-Reader, Diagn-Optics) (Meerwaldt et al. 2004).

Als Blut-Biomarker scheint eine Kombination von Plasma P-Tau217 mit A β_{42} /A β_{40} für die Erkennung der MCI und AD gut geeignet zu sein. Obwohl dies vielversprechend ist, sind Immunpräzipitation-Massenspektrometrie-Studien kostspielig und erfordern eine umfangreiche Entwicklung, bevor sie in der Primärversorgung oder beim Screening eingesetzt werden können. Zusätzlich ist die Haupteinschränkung von Plasma

A β ₄₂/A β ₄₀, dass sein Spiegel bei Personen mit zerebraler A β -Pathologie nur um 10-20% verringert ist, verglichen mit 40-60% im Liquor (Prince et al. 2013; Leuzy et al. 2022).

Perspektivisch sollte, zur weiteren Überprüfung unserer Methode, die Variation der Messungen gelöst werden.

Ist dieses Problem gelöst, kann eine großangelegte Studie mit wesentlich mehr Proben durchgeführt werden. Es sollten unterschiedliche Demenz-Gruppen auch mit MCI untereinander verglichen werden. Die gemessenen CML-modifizierten A β -Werte sollten in Abhängigkeit von anderen Faktoren wie Alter, Gewicht, Geschlecht, Rauchen, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, KHK, pAVK, Niereninsuffizienz, Fettstoffwechselstörung, COPD, MMST, Sonnenexposition, Hautfarbe und sportlicher Aktivität gemessen werden. In anderen Studien zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen dem Alter der Probanden und der in der Haut enthaltenen AGE-Menge (Simm et al. 2008). Weiterhin konnte eine positive Korrelation zwischen der AGE-Fluoreszenz der Haut und dem pathologischen Status der Patienten mit Diabetes mellitus festgestellt werden (Chabroux et al. 2010; Ueno et al. 2008; Hartog et al. 2007). Diese Zusammenhänge sind weiter zu untersuchen. Die Einfachheit der HAF-Messung ermöglicht den klinischen Einsatz, allerdings müsste in einer großangelegten Studie die HAF mit der Menge der gemessenen CML-modifiziertem A β verglichen werden. Zusätzlich könnte die Methode in Blut getestet werden, um eine weniger invasive Methode etablieren zu können. Uribarri et al. zeigten bereits, dass MGO- und CML-Werte im Serum, sowie im Gewebe des Gyrus temporalis superior von AD-Patienten verglichen zur Kontrollgruppe erhöht waren und mit den Serumwerten der Patienten korrelierten (Uribarri et al. 2020). Haddad et al. fanden heraus, dass die MGO- und GO-Konzentrationen im Serum von MCI-Patienten höher sind, als bei Kontroll-Patienten. Allerdings hatten die Serumspiegel eine höhere Wahrscheinlichkeit, MCI-Patienten von Kontrollpersonen, aber nicht von AD-Patienten zu unterscheiden. Der Serumspiegel von CML stieg im Frühstadium der Alzheimer-Krankheit an und korrelierte mit den kognitiven Scores der MMSE und dem GO-Wert (Haddad et al. 2019). In weiteren Untersuchungen sollten zusätzlich Beads mit anderen AGE-Ak wie Anti-MGO und Anti-Pentosidin gekoppelt werden, um deren Einfluss in AD zu bestimmen.

Unsere Methode könnte der Detektion von CML-modifiziertem A β als AD-Biomarker dienen. Zuvor sollten allerdings die oben genannten Einflussfaktoren und deren Rolle bei CML-Modifikationen geklärt werden.

6 Zusammenfassung

Weltweit sind ca. 47 Millionen Menschen von Demenz betroffen und alle 20 Jahre wird sich diese Zahl fast verdoppeln.

In der Praxis werden für die Diagnose von AD klinische und kognitive Kriterien verwendet. Die endgültige Diagnose einer AD bedarf der histopathologischen Untersuchung, die selten erfolgt. Zusätzlich werden molekulare Biomarker und Bildgebungsmarker in die Diagnose miteinbezogen. Im Allgemeinen sind die topografischen Biomarker weniger spezifisch als die molekularen Biomarker, korrelieren jedoch besser mit dem Auftreten klinischer Symptome. Molekulare Biomarker sind zur Frühdiagnose geeigneter. Erwähnenswerte Nachteile der verfügbaren Liquor-Biomarker sind die niedrige Sensitivität, sowie Spezifität. Die Anwendung vom Blut-Biomarker in der klinischen Praxis ist aufgrund einer Reihe von biologischen und technischen Gründen – neben der niedrigen Sensitivität und Spezifität – bisher nicht zuverlässig. Daher ist die Entwicklung von neuartigen praktikablen Methoden zur Früherkennung und genauen Diagnose der Alzheimerkrankheit unerlässlich.

Es konnten hohe Konzentrationen an AGEs in den senilen Plaques und neurofibrillären Knäueln bei Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden. Die extrazellulären Proteinablagerungen der Plaques bestehen aus Amyloid-Beta-Peptid (A β) und die intrazellulär gelegenen Neurofibrillenbündel aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein, welches akkumuliert und zu gepaarten helikalen Filamenten aggregiert. Dies führt zum Neuronenverlust, sodass es im Verlauf zu einer Hirnatrophie kommt. AGEs als Produkte der irreversiblen Glykierung von Proteinen, sind gegenüber proteolytischen Prozessen resistent und induzieren die Vernetzung (Cross-Linking) von Polypeptiden bzw. Plaquebildung. Viele AGEs sind fluoreszierende Verbindungen, CML allerdings nicht.

Folgende Hypothese wird aufgestellt: AGE-modifiziertes A β kommt *in vivo* vor, trägt signifikant zur Aggregation und deren pathologischen Effekten auf Neuronen und Endothelzellen bei. Wissenschaftliche Daten über mögliche AGE-Modifikationen des A β s *in vivo* sind bisher nicht vorhanden. Ein Problem des Nachweises von modifiziertem A β *in vivo* könnte sein, dass viele der verwendeten kommerziellen Antikörper das N-terminale Ende des Peptides erkennen. In der dort vorhandenen Aminosäuresequenz sind die beiden Lysine und das Arginin, welche modifiziert werden. So könnte eine Modifikation das Epitop für die monoklonalen Antikörper maskieren.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode für die *in vivo* Detektion von AGE-Modifikationen v.a. CML an das Amyloid β -Peptid. Zur Etablierung der Methode erfolgten folgende Schritte:

- (a) Modifizierung von A β und Liquor *in vitro* mittels Inkubation mit AGE-Induktoren (Glyoxal=CML, Methylglyoxal=Argpyrimidin),
- (b) Fluoreszenzmessung der A β -AGE-Modifikationen, bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 440 nm (für die Detektion aller fluoreszierenden AGEs),
- (c) Fluoreszenzmessung der A β -AGE-Modifikationen, bei einer Anregungswellenlänge von 330 nm und einer Emissionswellenlänge von 405 nm (für die Detektion von AGE-Modifikationen Pentosidin und Argpyrimidin),
- (d) Westernblot zur Detektion von CML-modifiziertem und unmodifiziertem A β -Peptid, da CML nicht fluoreszierendes AGE ist. Wenn A β mit GO und MGO behandelt wurde, waren die Aggregate so groß, dass diese nicht mehr in das Gel hineinliefen. Mittels Silberfärbung wurde gezeigt, dass unmodifiziertes A β bis zu 40 h Inkubation und GO-modifiziertes A β nach 4 h bei 37°C detektierbar ist.
- (e) Slot-Blot und ELISA zur Detektion von unmodifiziertem und modifiziertem A β (nach 24h-Inkubation) mit N-terminalen-A β -Akn (6E10, 4G8) und C-terminalem-A β -Ak (8G7), hier konnte ebenfalls eine Reduktion der Bindung des Antikörpers an modifiziertes A β beobachtet werden. Zusätzlich wurden 4 polyklonale Antikörper mittels ELISA auf die Bindung an unmodifiziertes und modifiziertes A β getestet. Gleichzeitig wurde die Menge der verschiedenen A β -Konzentrationen zur Detektion bestimmt.
- (f) Messung von AGE-modifiziertem A β -Peptid mittels modifizierter CBA (cytometric bead array),
- (g) Spiking-Experimente und FACS-Analyse zur Detektion von CML-modifiziertem A β -Peptid in Liquor bzw. H₂O mittels Durchflusszytometrie. Unser CBA-Assay kann CML-modifiziertes A β in 200 μ l Liquor *in vivo* nachweisen.

Obwohl die Anzahl der Proben bei uns gering war, konnten wir zeigen, dass bei der AD-Gruppe fast doppelt so viel CML-modifiziertes A β vorhanden ist wie bei der Kontrollgruppe. Dieser Sachverhalt könnte in einer großen Studie perspektivisch geprüft werden und als früher Biomarker in der AD-Diagnostik eingesetzt werden.

7 Literaturverzeichnis

Ahsan, Haseeb (2022): Monoplex and multiplex immunoassays: approval, advancements, and alternatives. In: *Comparative clinical pathology* 31 (2), S. 333–345. DOI: 10.1007/s00580-021-03302-4.

Albert, Marilyn S.; DeKosky, Steven T.; Dickson, Dennis; Dubois, Bruno; Feldman, Howard H.; Fox, Nick C. et al. (2011): The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. In: *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 7 (3), S. 270–279. DOI: 10.1016/j.jalz.2011.03.008.

Amicarelli, Fernanda; Colafarina, Sabrina; Cattani, Franca; Cimini, Annamaria; Di Ilio, Carmine; Ceru, Maria Paola; Miranda, Michele (2003): Scavenging system efficiency is crucial for cell resistance to ROS-mediated methylglyoxal injury. In: *Free Radical Biology and Medicine* 35 (8), S. 856–871. DOI: 10.1016/S0891-5849(03)00438-6.

Bălașa, Adrian Florian; Chircov, Cristina; Grumezescu, Alexandru Mihai (2020): Body Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease-An Up-To-Date Overview. In: *Biomedicines* 8 (10). DOI: 10.3390/biomedicines8100421.

Bär, K.J; Franke, S.; Wenda, B.; Müller, S.; Kientsch-Engel, R.; Stein, G.; Sauer, H. (2003): Pentosidine and Nε-(carboxymethyl)-lysine in Alzheimer's disease and vascular dementia. In: *Neurobiology of aging* 24 (2), S. 333–338. DOI: 10.1016/S0197-4580(02)00086-6.

Bateman, Randall J.; Xiong, Chengjie; Benzinger, Tammie L. S.; Fagan, Anne M.; Goate, Alison; Fox, Nick C. et al. (2012): Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. In: *The New England journal of medicine* 367 (9), S. 795–804. DOI: 10.1056/NEJMoa1202753.

Becton, Dickinson and Company (2019): Measurement of the types and amounts of immunoglobulins and cytokines that are secreted by B cells provides insight into the quality and quantity of their immune response—features that are also frequently altered in disease states. New Jersey. Online verfügbar unter <https://www.bdbiosciences.com/us/applications/research/b-cell-research/m/1614912/techniques/intracellularcytokines>, zuletzt geprüft am 14.05.2021.

Bickel, H. (2000): Demenzsyndrom und Alzheimer Krankheit: Eine Schätzung des Krankenbestandes und der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland. In:

Gesundheitswesen (Bundesverband der Ärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (Germany)) 62 (4), S. 211–218. DOI: 10.1055/s-2000-10858.

Bio-Rad Laboratories GmbH Deutschland (2010): Protein Blotting Methods. Electrophoretic Transfer. Carlsbad, USA. Online verfügbar unter https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2895.pdf, zuletzt geprüft am 14.05.2021.

Castellani, Rudy J.; Harris, Peggy L.R; Sayre, Lawrence M.; Fujii, Junichi; Taniguchi, Naoyuki; Vitek, Michael Peter et al. (2001): Active glycation in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease: N ϵ -(Carboxymethyl) lysine and hexitol-lysine. In: *Free Radical Biology and Medicine* 31 (2), S. 175–180. DOI: 10.1016/s0891-5849(01)00570-6.

Castillo, Luis; MacCallum, Donna M. (2012): Cytokine measurement using cytometric bead arrays. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 845, S. 425–434. DOI: 10.1007/978-1-61779-539-8_29.

Chabroux, S.; Canouï-Poitrine, F.; Reffet, S.; Mills-Joncour, G.; Morelon, E.; Colin, C.; Thivolet, C. (2010): Advanced glycation end products assessed by skin autofluorescence in type 1 diabetics are associated with nephropathy, but not retinopathy. In: *Diabetes & metabolism* 36 (2), S. 152–157. DOI: 10.1016/j.diabet.2009.11.003.

Chen; Lowe; Wilson; Crowther; Tzeggai; Bishop; Varro (1999): Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. In: *Clinical chemistry* 45 (9), S. 1693–1694.

Chen, Jianfei; Jing, Jun; Yu, Shiyong; Song, Minbao; Tan, Hu; Cui, Bin; Huang, Lan (2016): Advanced glycation endproducts induce apoptosis of endothelial progenitor cells by activating receptor RAGE and NADPH oxidase/JNK signaling axis. In: *American journal of translational research* 8 (5), S. 2169–2178.

Cheng, Irene H.; Palop, Jorge J.; Esposito, Luke A.; Bien-Ly, Nga; Yan, Fengrong; Mucke, Lennart (2004): Aggressive amyloidosis in mice expressing human amyloid peptides with the Arctic mutation. In: *Nature medicine* 10 (11), S. 1190–1192. DOI: 10.1038/nm1123.

Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group (1998). In: *Neurobiology of aging* 19 (2), S. 109–116.

Cook, E. B.; Stahl, J. L.; Lowe, L.; Chen, R.; Morgan, E.; Wilson, J. et al. (2001): Simultaneous measurement of six cytokines in a single sample of human tears using microparticle-based flow cytometry: allergics vs. non-allergics. In: *Journal of Immunological Methods* 254 (1-2), S. 109–118. DOI: 10.1016/s0022-1759(01)00407-0.

Costa, M.; Mestre, A.; Horrillo, R.; Ortiz, A. M.; Pérez, A.; Ruiz, A. et al. (2019): Cross-Sectional Characterization of Albumin Glycation State in Cerebrospinal Fluid and Plasma from Alzheimer's Disease Patients. In: *The journal of prevention of Alzheimer's disease* 6 (2), S. 139–143. DOI: 10.14283/jpad.2018.48.

Damian, Marinella; Hausner, Lucrezia; Jekel, Katrin; Richter, Melany; Froelich, Lutz; Almkvist, Ove et al. (2013): Single-domain amnesic mild cognitive impairment identified by cluster analysis predicts Alzheimer's disease in the european prospective DESCRIPA study. In: *Dementia and geriatric cognitive disorders* 36 (1-2), S. 1–19. DOI: 10.1159/000348354.

Dr. Horst Bickel (2020): Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen, S. 1. Online verfügbar unter https://www.alzheimer-bayern.de/images/downloads/demenz/8_Zahlen/infoblatt1_haeufigkeit_demenzerkrankungen_dalzg.pdf.

Drenth, Hans; Zuidema, Sytse U.; Krijnen, Wim P.; Bautmans, Ivan; van der Schans, Cees; Hobbelen, Hans (2017): Advanced Glycation End-Products Are Associated With the Presence and Severity of Paratonia in Early Stage Alzheimer Disease. In: *Journal of the American Medical Directors Association* 18 (7), 636.e7-636.e12. DOI: 10.1016/j.jamda.2017.04.004.

Du Yan, Shi; Bierhaus, Angelika; Nawroth, Peter P.; Stern, David M. (2009): RAGE and Alzheimer's disease: a progression factor for amyloid-beta-induced cellular perturbation? In: *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 16 (4), S. 833–843. DOI: 10.3233/JAD-2009-1030.

Dubois, Bruno; Feldman, Howard H.; Jacova, Claudia; Cummings, Jeffrey L.; DeKosky, Steven T.; Barberger-Gateau, Pascale et al. (2010): Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. In: *The Lancet Neurology* 9 (11), S. 1118–1127. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70223-4.

Duning, Thomas: Leitliniengerechte Diagnostik und Therapie von Demenzerkrankungen: Was gibt es Neues?, S. 15. Online verfügbar unter https://www.ukm.de/fileadmin/ukminternet/daten/kliniken/neurologie/Aktuelles/Praesentationen/Demenzfortbildung_Oktober_2016/2_Diagnostik_und_Therapie_Demenz.pdf, zuletzt geprüft am 13.04.2021.

- Dupuy, Anne Marie; Kuster, Nils; Lizard, Gérard; Ragot, Kévin; Lehmann, Sylvain; Gallix, Benoît; Cristol, Jean Paul (2013): Performance evaluation of human cytokines profiles obtained by various multiplexed-based technologies underlines a need for standardization. In: *Clinical chemistry and laboratory medicine* 51 (7), S. 1385–1393. DOI: 10.1515/cclm-2012-0648.
- Elshal, Mohamed F.; McCoy, J. Philip (2006): Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 38 (4), S. 317–323. DOI: 10.1016/j.ymeth.2005.11.010.
- Engvall, Eva; Perlmann, Peter (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. In: *Immunochemistry* 8 (9), S. 871–874. DOI: 10.1016/0019-2791(71)90454-x.
- Fawver, Janelle N.; Schall, Hayley E.; Petrofes Chapa, Rachel D.; Zhu, Xiongwei; Murray, Ian V. J. (2012): Amyloid- β metabolite sensing: biochemical linking of glycation modification and misfolding. In: *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 30 (1), S. 63–73. DOI: 10.3233/JAD-2012-112114.
- Fournet, Maxime; Bonté, Frédéric; Desmoulière, Alexis (2018): Glycation Damage: A Possible Hub for Major Pathophysiological Disorders and Aging. In: *Aging and disease* 9 (5), S. 880–900. DOI: 10.14336/AD.2017.1121.
- Fukumoto, H.; Asami-Odaka, A.; Suzuki, N.; Shimada, H.; Ihara, Y.; Iwatsubo, T. (1996): Amyloid beta protein deposition in normal aging has the same characteristics as that in Alzheimer's disease. Predominance of A beta 42(43) and association of A beta 40 with cored plaques. In: *The American Journal of Pathology* 148 (1), S. 259–265.
- Furuya, Hideki; Pagano, Ian; Chee, Keanu; Kobayashi, Takashi; Wong, Regan S.; Lee, Riko; Rosser, Charles J. (2019): Comparison of Commercial ELISA Kits, a Prototype Multiplex Electrochemoluminescent Assay, and a Multiplex Bead-Based Immunoassay for Detecting a Urine-Based Bladder-Cancer-Associated Diagnostic Signature. In: *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 9 (4). DOI: 10.3390/diagnostics9040166.
- Genevieve, M.; Vivot, A.; Gonzalez, C.; Raffaitin, C.; Barberger-Gateau, P.; Gin, H.; Rigalleau, V. (2013): Skin autofluorescence is associated with past glycaemic control and complications in type 1 diabetes mellitus. In: *Diabetes & metabolism* 39 (4), S. 349–354. DOI: 10.1016/j.diabet.2013.03.003.
- Gironès, Xavier; Guimerà, Arantxa; Cruz-Sánchez, Celia-Z; Ortega, Arantxa; Sasaki, Noboyuki; Makita, Zenji et al. (2004): N epsilon-carboxymethyllysine in brain aging,

diabetes mellitus, and Alzheimer's disease. In: *Free Radical Biology and Medicine* 36 (10), S. 1241–1247. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.006.

Guillozet, Angela L.; Weintraub, Sandra; Mash, Deborah C.; Mesulam, M. Marsel (2003): Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. In: *Archives of neurology* 60 (5), S. 729–736. DOI: 10.1001/archneur.60.5.729.

Häckel, Andreas (2021): Neue Strategien zur Bestimmung von A β -Peptiden und Tau-Proteinen. In: *InFo Neurologie* 23 (3), S. 57. DOI: 10.1007/s15005-021-1896-6.

Haddad, Mohamed; Perrotte, Morgane; Khedher, Mohamed Raâfet Ben; Demongin, Clément; Lepage, Aurélie; Fülöp, Tamás; Ramassamy, Charles (2019): Methylglyoxal and Glyoxal as Potential Peripheral Markers for MCI Diagnosis and Their Effects on the Expression of Neurotrophic, Inflammatory and Neurodegenerative Factors in Neurons and in Neuronal Derived-Extracellular Vesicles. In: *International journal of molecular sciences* 20 (19). DOI: 10.3390/ijms20194906.

Hallauer, J. F.; Schons, M.; Smala, Antje (2000): Untersuchung von Krankheitskosten bei Patienten mit Alzheimer-Erkrankung in Deutschland. In: *Gesundheitsökonomie & Qualitätsmanagement*.

Hampel, Harald; O'Bryant, Sid E.; Molinuevo, José L.; Zetterberg, Henrik; Masters, Colin L.; Lista, Simone et al. (2018): Blood-based biomarkers for Alzheimer disease: mapping the road to the clinic. In: *Nature reviews. Neurology* 14 (11), S. 639–652. DOI: 10.1038/s41582-018-0079-7.

Hartog, Jasper W. L.; Voors, Adriaan A.; Schalkwijk, Casper G.; Scheijen, Jean; Smilde, Tom D. J.; Damman, Kevin et al. (2007): Clinical and prognostic value of advanced glycation end-products in chronic heart failure. In: *European heart journal* 28 (23), S. 2879–2885. DOI: 10.1093/eurheartj/ehm486.

Hebert, Liesi E.; Weuve, Jennifer; Scherr, Paul A.; Evans, Denis A. (2013): Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. In: *Neurology* 80 (19), S. 1778–1783. DOI: 10.1212/WNL.0b013e31828726f5.

Hofmann, W. (2012): Leitliniengerechte Diagnose des Demenzsyndroms. In: *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie* 45 (4), S. 341–351. DOI: 10.1007/s00391-012-0295-5.

Horie, K.; Miyata, T.; Yasuda, T.; Takeda, A.; Yasuda, Y.; Maeda, K. et al. (1997): Immunohistochemical localization of advanced glycation end products, pentosidine, and carboxymethyllysine in lipofuscin pigments of Alzheimer's disease and aged

- neurons. In: *Biochemical and biophysical research communications* 236 (2), S. 327–332. DOI: 10.1006/bbrc.1997.6944.
- Hu, Kai-Wei; Fan, Hsiu-Fang; Lin, Han-Chen; Huang, Jian-Wei; Chen, Yu-Chieh; Shen, Cai-Ling et al. (2021): Exploring the Impact of Glyoxal Glycation on β -Amyloid Peptide (A β) Aggregation in Alzheimer's Disease. In: *The journal of physical chemistry. B* 125 (21), S. 5559–5571. DOI: 10.1021/acs.jpccb.1c02797.
- Hurd, Michael D.; Martorell, Paco; Delavande, Adeline; Mullen, Kathleen J.; Langa, Kenneth M. (2013): Monetary costs of dementia in the United States. In: *The New England journal of medicine* 368 (14), S. 1326–1334. DOI: 10.1056/NEJMsa1204629.
- Igase, Michiya; Ohara, Maya; Igase, Keiji; Kato, Takeaki; Okada, Yoko; Ochi, Masayuki et al. (2017): Skin Autofluorescence Examination as a Diagnostic Tool for Mild Cognitive Impairment in Healthy People. In: *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 55 (4), S. 1481–1487. DOI: 10.3233/JAD-160917.
- Kellar, Kathryn L.; Douglass, Janine P. (2003): Multiplexed microsphere-based flow cytometric immunoassays for human cytokines. In: *Journal of Immunological Methods* 279 (1-2), S. 277–285. DOI: 10.1016/S0022-1759(03)00248-5.
- Khan, Ayesha; Kalaria, Raj N.; Corbett, Anne; Ballard, Clive (2016): Update on Vascular Dementia. In: *Journal of geriatric psychiatry and neurology* 29 (5), S. 281–301. DOI: 10.1177/0891988716654987.
- Khan, Sameena S.; Smith, Meghan S.; Reda, Debra; Suffredini, Anthony F.; McCoy, J. Philip (2004): Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. In: *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* 61 (1), S. 35–39. DOI: 10.1002/cyto.b.20021.
- Kiencke, Peter; Daniel, Dietmar; Grimm, Christine; Rychlik, Reinhard (2011): Direct costs of Alzheimer's disease in Germany. In: *The European journal of health economics : HEPAC : health economics in prevention and care* 12 (6), S. 533–539. DOI: 10.1007/s10198-010-0267-x.
- Kong, Yanyan; Wang, Fushuai; Wang, Jiao; Liu, Cuiping; Zhou, Yinping; Xu, Zhengqin et al. (2020): Pathological Mechanisms Linking Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE). In: *Frontiers in aging neuroscience* 12, S. 217. DOI: 10.3389/fnagi.2020.00217.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.

- Lee, Myeongsang; Chang, Hyun Joon; Park, Jung Yeon; Shin, Joonha; Park, Jong Woo; Choi, Jee Woo et al. (2016): Conformational changes of A β (1-42) monomers in different solvents. In: *Journal of molecular graphics & modelling* 65, S. 8–14. DOI: 10.1016/j.jmglm.2016.02.003.
- Leuzy, Antoine; Mattsson-Carlgrén, Niklas; Palmqvist, Sebastian; Janelidze, Shorená; Dage, Jeffrey L.; Hansson, Oskar (2022): Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. In: *EMBO molecular medicine* 14 (1), e14408. DOI: 10.15252/emmm.202114408.
- Meerwaldt, R.; Graaff, R.; Oomen, P. H. N.; Links, T. P.; Jager, J. J.; Alderson, N. L. et al. (2004): Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. In: *Diabetologia* 47 (7), S. 1324–1330. DOI: 10.1007/s00125-004-1451-2.
- Michalowsky, Bernhard; Kaczynski, Anika; Hoffmann, Wolfgang (2019): Ökonomische und gesellschaftliche Herausforderungen der Demenz in Deutschland – Eine Metaanalyse. In: *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 62 (8), S. 981–992. DOI: 10.1007/s00103-019-02985-z.
- Monacelli, Fiammetta; Borghi, Roberta; Pacini, Davide; Serrati, Carlo; Traverso, Nicola; Odetti, Patrizio (2014): Pentosidine determination in CSF: a potential biomarker of Alzheimer's disease? In: *Clinical chemistry and laboratory medicine* 52 (1), S. 117–120. DOI: 10.1515/cclm-2012-0829.
- Morgan, Edward; Varro, Rudi; Sepulveda, Homero; Ember, Julia A.; Apgar, John; Wilson, Jerry et al. (2004): Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 110 (3), S. 252–266. DOI: 10.1016/j.clim.2003.11.017.
- Mulder, Douwe J.; van Water, Tara de; Lutgers, Helen L.; Graaff, Reindert; Gans, Rijk O.; Zijlstra, Felix; Smit, Andries J. (2006): Skin autofluorescence, a novel marker for glycemic and oxidative stress-derived advanced glycation endproducts: an overview of current clinical studies, evidence, and limitations. In: *Diabetes technology & therapeutics* 8 (5), S. 523–535. DOI: 10.1089/dia.2006.8.523.
- Münch, G.; Schicktanz, D.; Behme, A.; Gerlach, M.; Riederer, P.; Palm, D.; Schinzel, R. (1999): Amino acid specificity of glycation and protein-AGE crosslinking reactivities determined with a dipeptide SPOT library. In: *Nature biotechnology* 17 (10), S. 1006–1010. DOI: 10.1038/13704.

- Namba, Yoshio; Tomonaga, Masanori; Kawasaki, Hiroshi; Otomo, Eiichi; Ikeda, Kazuhiko (1991): Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. In: *Brain Research* 541 (1), S. 163–166. DOI: 10.1016/0006-8993(91)91092-F.
- Nesterenko, Michael V.; Tilley, Michael; Upton, Steve J. (1994): A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. In: *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 28 (3), S. 239–242. DOI: 10.1016/0165-022X(94)90020-5.
- Prasad, Kailash (2019): AGE-RAGE stress: a changing landscape in pathology and treatment of Alzheimer's disease. In: *Molecular and cellular biochemistry* 459 (1-2), S. 95–112. DOI: 10.1007/s11010-019-03553-4.
- Prince, Martin; Bryce, Renata; Albanese, Emiliano; Wimo, Anders; Ribeiro, Wagner; Ferri, Cleusa P. (2013): The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. In: *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 9 (1), 63-75.e2. DOI: 10.1016/j.jalz.2012.11.007.
- Prince, Martin; Wimo, Anders; Guerchet, Maaelenn; Ali, Gemma-Claire; Wu, Yu-Tzu; Prina, Matthew (2015): World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends, S. 1–4.
- Rabbito, Alessandro; Dulewicz, Maciej; Kulczyńska-Przybik, Agnieszka; Mroczo, Barbara (2020): Biochemical Markers in Alzheimer's Disease. In: *International journal of molecular sciences* 21 (6). DOI: 10.3390/ijms21061989.
- Reddy, V. Prakash; Obrenovich, Mark E.; Atwood, Craig S.; Perry, George; Smith, Mark A. (2002): Involvement of Maillard reactions in Alzheimer disease. In: *Neurotoxicity research* 4 (3), S. 191–209. DOI: 10.1080/1029840290007321.
- Reese, Jens Peter; Hessmann, Philipp; Seeberg, Greta; Henkel, Dajana; Hirzmann, Pamela; Rieke, Jürgen et al. (2011): Cost and care of patients with Alzheimer's disease: clinical predictors in German health care settings. In: *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 27 (4), S. 723–736. DOI: 10.3233/JAD-2011-110539.
- Ribeiro-Santos, Rafael; Campos-Carli, Salvina Maria de; Ferretjans, Rodrigo; Teixeira-Carvalho, Andrea; Martins-Filho, Olindo Assis; Teixeira, Antonio Lucio; Salgado, João Vinícius (2020): The association of cognitive performance and IL-6 levels in schizophrenia is influenced by age and antipsychotic treatment. In: *Nordic journal of psychiatry* 74 (3), S. 187–193. DOI: 10.1080/08039488.2019.1688389.

- Richens, Joanna L.; Urbanowicz, Richard A.; Metcalf, Rebecca; Corne, Jonathan; O'Shea, Paul; Fairclough, Lucy (2010): Quantitative validation and comparison of multiplex cytokine kits. In: *Journal of biomolecular screening* 15 (5), S. 562–568. DOI: 10.1177/1087057110362099.
- Rostamzadeh, Ayda; Jessen, Frank (2020): Früherkennung der Alzheimer-Krankheit und Demenzprädiktion bei Patienten mit leichter kognitiver Störung : Zusammenfassung aktueller Empfehlungen. In: *Der Nervenarzt* 91 (9), S. 832–842. DOI: 10.1007/s00115-020-00907-y.
- Sandby-Møller, Jane; Poulsen, Thomas; Wulf, Hans Christian (2003): Influence of Epidermal Thickness, Pigmentation and Redness on Skin Autofluorescence¶. In: *Photochem Photobiol* 77 (6), S. 616. DOI: 10.1562/0031-8655(2003)077<0616:ioetpa>2.0.co;2.
- Schägger, Hermann; Jagow, Gebhard von (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. In: *Analytical biochemistry* 166 (2), S. 368–379. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90587-2.
- Schmitt, Annett; Schmitt, Johannes; Münch, Gerald; Gasic-Milencovic, Jovana (2005): Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. In: *Analytical biochemistry* 338 (2), S. 201–215. DOI: 10.1016/j.ab.2004.12.003.
- Seidl, Rainer; Schuller, Elisabeth; Cairns, Nigel; Lubec, Gert (1997): Evidence against increased glycooxidation in patients with Alzheimer's disease. In: *Neuroscience Letters* 232 (1), S. 49–52. DOI: 10.1016/S0304-3940(97)00576-4.
- Sell, D. R.; Monnier, V. M. (1989): Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. In: *The Journal of biological chemistry* 264 (36), S. 21597–21602.
- Sharma, Amit; Weber, Daniela; Raupbach, Jana; Dakal, Tikam Chand; Fließbach, Klaus; Ramirez, Alfredo et al. (2020): Advanced glycation end products and protein carbonyl levels in plasma reveal sex-specific differences in Parkinson's and Alzheimer's disease. In: *Redox biology* 34, S. 101546. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101546.
- Simm, Andreas; Nass, Norbert; Bartling, Babett; Hofmann, Britt; Silber, Rolf-Edgar; Navarrete Santos, Alexander (2008): Potential biomarkers of ageing. In: *Biological chemistry* 389 (3), S. 257–265. DOI: 10.1515/BC.2008.034.

Statistisches Bundesamt 2019: Statistisches Jahrbuch 2019/ 4 Gesundheit.
Gesundheitskosten. Kosten im Gesundheitswesen, S. 154.

Stavnsbjerg, Camilla; Jørgensen, Jennifer Solgaard; Engel, Trine Bjørnbo; Brus, Anja; Ringgaard, Lars; Hansen, Anders Elias et al. (2022): Matrix effect in tumor lysates - Does it affect your cytokine ELISA and multiplex analyses? In: *Journal of Immunological Methods* 500, S. 113177. DOI: 10.1016/j.jim.2021.113177.

Stenh, Charlotte; Englund, Hillevi; Lord, Anna; Johansson, Ann-Sofi; Almeida, Claudia G.; Gellerfors, Pär et al. (2005): Amyloid-beta oligomers are inefficiently measured by enzyme-linked immunosorbent assay. In: *Annals of neurology* 58 (1), S. 147–150. DOI: 10.1002/ana.20524.

Stomrud, Erik; Minthon, Lennart; Zetterberg, Henrik; Blennow, Kaj; Hansson, Oskar (2015): Longitudinal cerebrospinal fluid biomarker measurements in preclinical sporadic Alzheimer's disease: A prospective 9-year study. In: *Alzheimer's & dementia (Amsterdam, Netherlands)* 1 (4), S. 403–411. DOI: 10.1016/j.dadm.2015.09.002.

Tejada-Vera, Betzaida (2013): Mortality from Alzheimer's disease in the United States: data for 2000 and 2010. In: *NCHS data brief* (116), S. 1–8.

Tinetti, Mary E.; McAvay, Gail J.; Murphy, Terrence E.; Gross, Cary P.; Lin, Haiqun; Allore, Heather G. (2012): Contribution of individual diseases to death in older adults with multiple diseases. In: *Journal of the American Geriatrics Society* 60 (8), S. 1448–1456. DOI: 10.1111/j.1532-5415.2012.04077.x.

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (9), S. 4350–4354. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.

Ueno, Hiroki; Koyama, Hidenori; Tanaka, Shinji; Fukumoto, Shinya; Shinohara, Kayo; Shoji, Tetsuo et al. (2008): Skin autofluorescence, a marker for advanced glycation end product accumulation, is associated with arterial stiffness in patients with end-stage renal disease. In: *Metabolism: clinical and experimental* 57 (10), S. 1452–1457. DOI: 10.1016/j.metabol.2008.05.016.

Uribarri, Jaime; Buchman, Aron S.; Cai, Weijing; Haroutunian, Vahram; Beerli, Michal Schnaider (2020): Human brain and serum advanced glycation end products are highly correlated: Preliminary results of their role in Alzheimer's disease and type 2 diabetes. In: *Alzheimer's & Dementia* 16 (S4). DOI: 10.1002/alz.045280.

van der Flier, W. M.; Scheltens, P. (2005): Epidemiology and risk factors of dementia. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 76 Suppl 5, v2-7. DOI: 10.1136/jnnp.2005.082867.

Varro, Rudolf; Chen, Roy; Sepulveda, Homero; Apgar, John (2007): Bead-based multianalyte flow immunoassays: the cytometric bead array system. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 378, S. 125–152. DOI: 10.1007/978-1-59745-323-3_9.

Wautier, J. L.; Wautier, M. P.; Schmidt, A. M.; Anderson, G. M.; Hori, O.; Zoukourian, C. et al. (1994): Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (16), S. 7742–7746. DOI: 10.1073/pnas.91.16.7742.

Wetzels, Suzan; Vanmierlo, Tim; Scheijen, Jean L. J. M.; van Horsen, Jack; Amor, Sandra; Somers, Veerle et al. (2019): Methylglyoxal-Derived Advanced Glycation Endproducts Accumulate in Multiple Sclerosis Lesions. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 855. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00855.

Yan, Xiaomei; Schielke, Erika G.; Grace, Karen M.; Hassell, Christian; Marrone, Babetta L.; Nolan, John P. (2004): Microsphere-based duplexed immunoassay for influenza virus typing by flow cytometry. In: *Journal of Immunological Methods* 284 (1-2), S. 27–38. DOI: 10.1016/j.jim.2003.09.016.

Yanagisawa, Katsuyuki; Makita, Zenji; Shiroshita, Koichi; Ueda, Toshihiro; Fusegawa, Takashi; Kuwajima, Satoru et al. (1998): Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urine of diabetic patients. In: *Metabolism: clinical and experimental* 47 (11), S. 1348–1353. DOI: 10.1016/S0026-0495(98)90303-1.

Zetterberg, Henrik; Blennow, Kaj (2018): From Cerebrospinal Fluid to Blood: The Third Wave of Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease. In: *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 64 (s1), S271-S279. DOI: 10.3233/JAD-179926.

8 Thesen der Dissertation

1. Die Anwendung von Liquor- und Blut-Biomarker in der AD-Diagnostik entwickelte sich rasant in den letzten Jahren. Dabei spielen das A β -Peptid und das Tau-Proteine eine zentrale Rolle.
2. Es konnten hohe Konzentrationen an AGEs in den senilen Plaques und neurofibrillären Knäueln bei Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden.
3. AGEs als Produkte der irreversiblen Glykierung von Proteinen induzieren Cross-Linking von Polypeptiden bzw. Plaquebildung.
4. Wissenschaftliche Daten über mögliche AGE-Modifikationen des A β s *in vivo* fehlen bisher. Ein Problem des Nachweises von modifiziertem A β *in vivo* könnte sein, dass viele der verwendeten kommerziellen Antikörper das N-terminale Ende des Peptides erkennen. In der dort vorhandenen Aminosäuresequenz sind die beiden Lysine und das Arginin, welche modifiziert werden.
5. CBA-Tests sind einfach durchführbar, reproduzierbar und gleichzeitig kosten- und zeiteffektiv. Es können bis zu 30 Proteine gleichzeitig in einem Probenvolumen von 25-50 μ l bestimmt werden.
6. Durch eine veränderte CBA konnten wir CML-modifiziertes A β in 200 μ l Liquor bestimmen. Dieser Test sollte in einer großangelegten Studie geprüft werden und könnte als frühzeitiger Biomarker bei AD-Diagnostik eingesetzt werden.

Anhang

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde im Forschungslabor der Universitätsklinik und Poliklinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Halle (Saale) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Simm angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich auf vielfältige Weise bei meiner Arbeit unterstützten:

Herrn Dr. Alexander Navarrete Santos möchte ich von Herzen für die Unterstützung und Betreuung der Laborversuche danken. Seine Geduld, konstruktive Kritik und Aufmunterungen haben mir über die Jahre sehr geholfen. Mein spezieller Dank gilt für das stets offene Ohr, auch für nicht berufliche Belange.

Herrn Prof. Dr. Andreas Simm danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und des Arbeitsplatzes mit optimalen Arbeitsbedingungen. Insbesondere für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Besonderen Dank auch an das Forschungslaborteam und die gesamten Mitarbeiter der beteiligten Institutionen für die Bereitstellung der Liquorproben und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Den Mitgliedern des Wilhelm-Roux-Programms danke ich herzlich für die Bereitstellung der Fördermittel.

Mein ausdrücklicher Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meiner gesamten Ausbildung unterstützten und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Ohne sie wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

Erklärung über frühere Promotionsversuche und Selbständigkeitserklärung

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

25.10.2022, Maedeh Mirzadeh-Kruse