

Aus dem
Lehrstuhl für Zelluläre Physiologie
Physiologisches Institut
Institut der Universität München Vorstand:
Prof. Dr. Claudia Veigel



***Die Untersuchung der Freisetzung von Calbindin D28k und LDH
bei Zellschädigung in vitro***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Daniel Joachim Dieter Hahn
aus
Gräfelfing
Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Michael Meyer
Mitberichterstatter:	PD Dr. Steffen Tiedt Prof. Dr. Paul Lingor
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	16.05.2024

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Abstract	VIII
Abbildungsverzeichnis.....	X
Formelverzeichnis.....	XIII
Tabellenverzeichnis.....	XIV
Abkürzungsverzeichnis.....	XVI
1 Einleitung	1
1.1 Die Familie der Calcium-bindenden Proteine	1
1.1.1 Calmodulin.....	1
1.1.2 S100.....	2
1.1.3 Calbindin D28k und verwandte Calcium-bindende Proteine	2
1.2 Calbindin als Biomarker	6
1.3 Relevanz und Anforderung an Biomarker in der Medizin.....	7
2 Fragestellung	9
3 Material und Methoden	10
3.1 Material.....	10
3.1.1 Chemikalien und Substanzen	10
3.1.2 Puffer und Lösungen	13
3.1.3 Antikörper	14
3.1.4 Plasmide	15
3.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterial	15
3.1.6 Software	18
3.2 Zellkultur	18
3.2.1 Zelllinie Hn10e	18
3.2.2 Zellrevitalisierung aus Glycerol Stock.....	18
3.2.3 Zellzählung.....	19
3.2.4 Proteinexpression durch Lipofection	20
3.2.5 Plasmide	20
3.2.6 Vorbereitung der Cover Slips.....	21
3.3 Immunfärbung.....	22
3.4 BCA Assay.....	23
3.5 Gelelektrophorese	23

3.5.1	Probenvorbereitung.....	23
3.5.2	Durchführung der Elektrophorese.....	24
3.5.3	Western Blot.....	24
3.5.4	Coomassie-Färbung.....	25
3.6	Purifikation rekombinanten Calbindins nach Molecular Cloning Third Edition	26
3.6.1	Protein Expression	26
3.6.2	Protein Purifikation.....	27
3.6.3	Beeinflussung von Calbindin durch Calcium und EDTA im Gellauf.....	29
3.7	Calbindin ELISA	29
3.7.1	Sandwich-ELISA.....	29
3.7.2	Vorversuch Protokoll.....	30
3.7.3	Erprobung der Konzentrationen des ersten und zweiten Antikörpers.....	31
3.7.4	Blockierung und Puffer.....	32
3.7.5	Relevanz von Calcium.....	32
3.7.6	Der finale Calbindin ELISA	35
3.7.7	Statistische Validierung.....	38
3.7.8	Ausschluss der Erkennung anderer Calcium-bindender Proteine	38
3.8	Calbindin Halbwertszeit.....	39
3.9	LDH Assay.....	40
3.9.1	Prinzip.....	40
3.9.2	Erprobung LDH Assay.....	41
3.9.3	Statistische Validierung.....	45
3.10	Calbindin und LDH-Freisetzung aus HN10e Zellen unter Einfluss von Noxen.....	46
3.10.1	Eingesetzte Noxen	46
3.10.2	Vorversuch Dosisfindung.....	47
3.10.3	Ablauf des Behandlungsexperiments.....	47
3.11	Statistische Auswertung	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Expression rekombinanten Calbindins	49
4.1.1	Aufreinigung mittels Benzamidin-Säule.....	50
4.1.2	Verzögerung von Calbindin durch EDTA im Gellauf gegenüber CaCl ₂	52
4.2	Calbindin ELISA	53
4.2.1	Auswahl des plattengebundenen 1. Antikörpers	53
4.2.2	Ökonomisierung der Antikörper.....	58
4.2.3	Anpassung des detektierenden 2. Antikörper.....	59

4.2.4	Signal-to-Noise Maximierung	61
4.2.5	Abstimmung des signalentwickelnden 3. Antikörper	64
4.2.6	Erprobung des Blockpuffers	65
4.2.7	Relevanz von Calcium im Puffersystem	68
4.2.8	Puffer-System-Vergleich.....	69
4.2.9	Statistische Validierung.....	71
4.3	Gewebeuntersuchung	76
4.3.1	Übersicht der Gewebeproben	76
4.3.2	Nullwerte im Knock-out Tier	77
4.3.3	Vergleich der Wildtyp Tiere und heterozygoten Tiere.....	77
4.3.4	Calbindin Werte in Mäusen unterschiedlichen Alters	78
4.4	Calbindin Halbwertszeit	82
4.5	LDH Assay.....	83
4.5.1	Anpassung der Konzentration eingesetzter Messreagenzien	83
4.5.2	Einfluss von Triton X-100 und der verwendeten Lösungen auf die Messwerte..	84
4.5.3	LDH-Stabilität unterschiedlicher Lagerungsbedingungen.....	86
4.5.4	Lyse mit Triton X-100	87
4.5.5	Extraktionsbedingte LDH-Freisetzung.....	90
4.5.6	Statistische Validierung.....	91
4.6	LDH-Halbwertszeit.....	94
4.7	Freisetzung von Calbindin und LDH bei Zellschädigung	95
5	Diskussion	100
5.1	Calbindin ELISA	100
5.2	Calcium abhängige Calbindin Erkennung.....	101
5.3	Calbindin Doppelbande.....	102
5.4	Calbindin in Mausgewebe	104
5.5	LDH Assay.....	107
5.6	Calbindin Halbwertszeit.....	108
5.7	Calbindin-Freisetzung im Zellmodell	109
6	Literaturverzeichnis	112
7	Danksagung	120
8	Affidavit.....	121

Zusammenfassung

Calbindin D28k als Mitglied der Calcium-bindenden Proteine bietet durch das spezifische Vorkommen in Neuronen wie den Purkinje-Zellen oder auch dem Tubulus Epithel der Nieren gute Qualitäten eines Biomarkers. Neben der Relevanz in neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson wurde Calbindin bereits als Marker nach Lithotripsie von Uretersteinen diskutiert. Zur weiteren Erfassung der möglichen Qualitäten eines Biomarkers erfolgte die Untersuchung seiner Freisetzungskinetik im Vergleich zu der eines gut etablierten Markers von Zellschädigung, der LDH-Aktivität, bei Behandlung mit unterschiedlichen Noxen im Zellmodell.

Die Erfassung erfolgte dabei mittels eines eigens angepassten und statistisch validierten Protokolls eines Calbindin ELISA beziehungsweise LDH Assay. Im Vordergrund stand hierbei neben einer hohen Sensitivität eine gute Reproduzierbarkeit, sowie Simplität und wirtschaftliche Rentabilität des jeweiligen Protokolls.

Wenngleich mit weiteren Verfeinerungen eine weiter gesteigerte Sensitivität nicht ausgeschlossen ist, konnte mit einer unteren Messgrenze von knapp 19 pg/ml Calbindin eine konkurrenzfähige Sensitivität erzielt werden. Bei einer oberen Messgrenze von 2500 pg/ml liegt der maximale Messbereich bei dem mehr als 100-fachen des niedrigsten Wertes. Insbesondere hinsichtlich der zu untersuchenden Proben aus Zell- und Gewebelysaten sowie den Überständen der Zellkultur wurden keine, die Messwerte beeinflussende, Interaktionen verzeichnet. Das eingesetzte Antikörperpaar bestehend aus dem monoklonalen Antikörper 300 (Swant AG, Burgdorf, Schweiz) und dem polyklonalen Antikörper CB38 (Swant AG, Burgdorf, Schweiz) zeigte dabei in Kombination keine Detektion des struktur- und größenähnlichen Calretinin. Mit der Signalamplifikation durch das Sandwich-Prinzip mit dem HRP-anti-rabbit-IgG (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten) konnte gleichzeitig ein niedriger Nullwert erhalten werden. Die Intra-Test-Varianz wurde dabei mit 0,063 bestimmt, die Inter-Test-Varianz lag bei 0,079.

Bei vergleichbarer Signalentwicklung eines Phosphat-Puffer basierten Systems gegenüber dem Tris-Puffer-System zeigten sich in letzterem keine ausfallenden Calcium-Salze und damit reliablere Testeigenschaften. Die Zugabe von Calcium-Ionen ermöglichte dabei eine 30-fach höhere Signalentwicklung in Detektion von Calbindin. Eine Calcium-abhängige Konformationsänderung der Calcium-bindenden Proteine ist hierbei bereits beschrieben (Berggard, Miron, et al., 2002). Dies zeigte sich ebenfalls in der Gelelektrophorese in einem veränderten Laufverhalten in Abhängigkeit von Calcium.

Rekombinantes Calbindin wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und nachfolgend mittels Glutathion-Sepharose aufgereinigt und durch Thrombinspaltung von dem GST-Tag gelöst. In der Coomassie-Färbung konnte eine Reinheit von mehr als 95 % gezeigt und das rekombinante Protein mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie bestätigt werden.

Zum Ausschluss zerfallsbedingter Konzentrationsveränderungen bei längerer Inkubation wurde die *in vitro* Halbwertszeit von Calbindin in alleinigem Zellkulturmedium bei 37°C bestimmt mit 79 Tagen.

Die im Rahmen der ELISA Etablierung erfolgte Untersuchung von Gewebeproben von C57Bl/6N Mäusen zeigte im Vergleich der anteiligen Calbindin-Konzentration am jeweiligen Gesamtprotein adulter Tiere für die fünf Monate alten Tiere signifikant niedrigere Messwerte mit nachfolgend erneutem Anstieg. Ein Sachverhalt der bei Nagetieren bereits für Donryu Ratten beschrieben wurde. Neben den allgemeinen Veränderungen der Calbindin-Konzentrationen bei Nagetieren von fortschreitend adulten Tieren ist diese geringere Konzentration der fünf Monate alten Tiere nicht durch eine fortlaufende Synaptogenese zu erklären, die mit 30 Lebenstagen bereits ihr Maximum erreicht (Semple et al., 2013). In zusätzlich untersuchten Proben aus Bauchhaut und Nebenniere wurde kein Calbindin nachgewiesen.

Basierend auf dem Testprinzip von Korzeniewski & Callewaert (1983) und dem Protokoll von Chan et al. (2013) und Kaja et al. (2015) erfolgte eine weitere Anpassung des LDH Assays. Insbesondere eine Validierung der Verwertbarkeit der Triton X-100 haltigen Mediumproben war möglich. Die Verwendung einer Standardleiter als Bezugsquelle ermöglichte darüber hinaus eine individuelle Zuordnung der freigesetzten LDH-Aktivität über die weit geläufige Darstellung als lediglich Anteil der jeweils maximalen LDH-Aktivität. Dadurch konnte auch bei einer einmaligen Probengewinnung durch den Vergleich mit der Referenz-Aktivität des Standards eine Aussage über die Zytotoxizität getroffen werden. Die Standardleiter umfasste mit einem Bereich von 0,5 bis 200 mU/ml das 400-fache der niedrigsten erfassbaren Aktivität. Die Intra-Test-Varianz des Assays lag bei 0,041 mit einer Inter-Test-Varianz von 0,020.

Durch die Behandlung der mit einem Calbindin-Expressionsplasmid lipofizierten HN10e Zellen mit Staurosporin und Ionomycin konnte der Zelluntergang in zwei unterschiedlichen Pathways betrachtet werden. In beiden Fällen zeigte sich ein signifikant früherer Anstieg der im Medium gemessenen Calbindin-Konzentration gegenüber der freigewordenen LDH-Aktivität. So lag die an der LDH-Aktivität anteilig gemessene Calbindin-Konzentration im Medium nach acht Stunden Behandlung mit Staurosporin bei dem mehr als 2,5-fachen, für Ionomycin wurde das mehr als zweifache nach 20 Stunden erreicht. Calbindin zeigte sich im *in vitro* Modell im Vergleich zu der Größen-ähnlichen LDH als früherer Marker der Zellschädigung.

Durch das sehr spezifische Vorkommen von Calbindin im Organismus ergibt sich unter diesen Aspekten die Möglichkeit eines sensitiven und gleichzeitig stabilen Markers spezifischer Zellschädigung.

Abstract

The aim of this thesis was to compare the release of Calbindin D28k and the associated LDH activity in a cell model after treatment with different toxins. The testing was carried out using a specially adapted and statistically validated protocol of a Calbindin ELISA or LDH assay. In addition to high sensitivity, the focus was on good reproducibility, as well as simplicity and economic profitability of the respective protocol.

Although a further increase in sensitivity with further refinements cannot be ruled out, a competitive sensitivity was achieved with a lower measurement limit of about 19 pg/ml Calbindin. With an upper measurement limit of 2500 pg/ml, the maximum measurement range is more than 100 times the lowest detectable value. Regarding the samples from cell and tissue lysates and the supernatants of the cell culture, no interactions affecting the measurement were seen. The pair of antibodies used, consisting of the monoclonal antibody 300 (Swant AG, Burgdorf, Switzerland) and the polyclonal antibody CB38 (Swant AG, Burgdorf, Switzerland), in combination showed no detection of the structurally and size similar Calretinin. A low background could be obtained simultaneously with the signal amplification by the sandwich principle with the HRP anti-rabbit IgG (GE Healthcare, Chicago, Illinois, United States). The intra-test variance was determined to be 0.063, the inter-test variance was 0.079.

With comparable signal development of a phosphate buffer-based system compared to the Tris buffer system, no precipitating calcium salts were found in the latter and thus more reliable test properties could be achieved. The addition of calcium ions enabled a 30-fold higher signal development in the detection of Calbindin. A calcium dependent conformational change of the Calcium-binding proteins has already been described (Berggard, Miron, et al., 2002). This was also reflected in the gel electrophoresis in a changed running behavior in presence of calcium.

Recombinant Calbindin was expressed as a GST fusion protein in *E. coli* and was subsequently purified using Glutathione Sepharose and released from the GST tag by Thrombin cleavage. The Coomassie stain showed a purity of more than 95 % and the recombinant protein was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry.

The *in vitro* half-life of calbindin in the isolated cell culture medium at 37°C was determined to be 79 days. The half-life time was determined to rule out concentration changes caused by decomposition during longer incubation periods.

The examination of tissue samples from C57Bl/6N mice carried out as part of the ELISA establishment showed significantly lower measurements for the five month old animals with a subsequent increase in a comparison of the proportionate Calbindin concentration in the

respective total protein of adult animals. A finding that has already been described in rodents for Donryu rats. In addition to the general changes in Calbindin concentrations in rodents from progressively adult animals, this lower concentration in the five month old animals cannot be explained by ongoing synaptogenesis, which already reaches its maximum at 30 days of life (Semple et al., 2013). No Calbindin was detected in additionally examined samples of abdominal skin and adrenal glands.

Based on the test principle of Korzeniewski & Callewaert (1983) and the protocol of Chan et al. (2013) and Kaja et al. (2015) the LDH assay was further adapted. It was also possible to validate the usability of the medium samples containing Triton X-100. The use of a standard ladder as a source of reference also made it possible to individually assign the released LDH activity instead of the widely used representation as just a proportion of the maximum LDH activity in each case. As a result, the cytotoxicity could be evaluated even by a single sample by comparison with the reference activity of the standard. The standard ladder reached 400 times the lowest detectable LDH activity, ranging from 0.5 to 200 mU/mL. The intra-test variance of the assay was 0.041 with an inter-test variance of 0.020.

By treating the HN10e cells, which were lipofected with a Calbindin expression plasmid, with Staurosporine and Ionomycin, the cell death elicited via two different pathways could be observed. In both cases, the Calbindin concentration measured in the medium increased significantly earlier than the released LDH activity. The Calbindin concentration measured more than 2.5 fold the corresponding LDH activity in the medium after eight hours of treatment with Staurosporine. Regarding the treatment with Ionomycin a more than two-fold measured Calbindin concentration in relation to the LDH activity was reached after 20 hours. Calbindin was shown to be an earlier marker of cell damage in the in vitro model compared to the size-similar LDH.

Due to the very specific occurrence of Calbindin in the organism, there is the possibility of a sensitive and at the same time stable marker of specific cell damage.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Graviertes Netz der Neubauer Zählkammer.....	19
Abbildung 2:	Darstellung der BC Assay Standardleiter.....	23
Abbildung 3:	Coomassie-Färbung einer BSA-Verdünnungsreihe im SDS-Page.....	26
Abbildung 4:	Darstellung einer Coomassie-Färbung der Proteinpurifikation.....	49
Abbildung 5:	Darstellung einer Coomassie-Färbung der Thrombinspaltung.....	50
Abbildung 6:	Darstellung der Extraktion aus der Benzamidin-Säule.....	51
Abbildung 7:	Western Blot von Cerebellum- und HN10e-Lysat mit $\text{CaCl}_2/\text{EDTA}$	52
Abbildung 8:	Western Blot von HN10e-Lysat und rekombinatem Calbindin mit $\text{CaCl}_2/\text{EDTA}$	53
Abbildung 9:	Vergleich unterschiedlicher Antikörper im Western Blot (PAb CB38).....	54
Abbildung 10:	Vergleich unterschiedlicher Antikörper im Western Blot (MAb 300).....	55
Abbildung 11:	Boxplot-Darstellung der ELISA 450 nm Duplikat-Messwerte im Auslassversuch.....	55
Abbildung 12:	Boxplot-Darstellung der ELISA 450 nm Duplikat-Messwerte verschiedener Konzentrationen des 1. Antikörpers.....	56
Abbildung 13:	Säulendiagramm der ELISA 450 nm Duplikat-Messwerte verschiedener Konzentrationen des 1. Antikörpers.....	57
Abbildung 14:	Säulendiagramm der ELISA Variationskoeffizienten verschiedener Konzentrationen des 1. Antikörpers.....	58
Abbildung 15:	Graph der ELISA 450 nm Messwerte unterschiedlich alter Verdünnungen des 1. Antikörpers.....	59
Abbildung 16:	Darstellung der ELISA 450 nm Duplikat-Messwerte für unterschiedliche Konzentrationen des 2. Antikörpers.....	60
Abbildung 17:	Säulendiagramm der ELISA 450 nm Duplikat-Messwerte der Anpassung des 2. Antikörpers.....	61
Abbildung 18:	Säulendiagramm der Variationskoeffizienten der Anpassung des 2. Antikörpers im ELISA.....	63
Abbildung 19:	Säulendiagramm der ELISA 450 nm Duplikat-Messwerte der Anpassung des 3. Antikörpers.....	64
Abbildung 20:	Säulendiagramm der ELISA 450 nm Messwerte unterschiedlicher Blockierungspuffer.....	66
Abbildung 21:	Säulendiagramm der Signal-to-Noise-Ratio der ELISA 450 nm Messungen.....	66
Abbildung 22:	Säulendiagramm der ELISA 450 nm Messungen unterschiedlicher Konzentrationen des 1. Antikörpers und Variation der Blockierungsdauer.....	68

Abbildung 23:	Säulendiagramm der ELISA 450 nm Messwerte in Abhängigkeit von CaCl ₂	69
Abbildung 24:	Darstellung der Standardkurven der unterschiedlichen ELISA Puffersysteme im Vergleich.	70
Abbildung 25:	Graphische Darstellung des Mediantests der ELISA Standardwerte als Boxplots.	72
Abbildung 26:	Graphische Darstellung des Mediantests der standardisierten ELISA Standardwerte als Boxplots.	73
Abbildung 27:	Darstellung der Variationskoeffizienten der Intra-Test-Varianz des ELISA.	74
Abbildung 28:	Nummerierung der Triplikate nach Lokalisation auf der 96-Well-Test- Platte.	74
Abbildung 29:	Säulendiagramm der Mittelwerte der Variationskoeffizienten der Intra- Test-Varianz des ELISA.....	75
Abbildung 30:	Darstellung der Variationskoeffizienten der Inter-Test-Varianz des ELISA.	75
Abbildung 31:	Boxplot-Darstellung der Calbindin-Menge in ng je µg Gesamtprotein der untersuchten Gewebeproben.....	76
Abbildung 32:	Boxplot-Darstellung der Calbindin-Menge in ng je µg Gesamtprotein der Wildtyp und Heterozygoten.....	77
Abbildung 33:	Boxplot-Darstellung der Calbindin- und Gesamtprotein-Konzentrationen in Wildtyp und Heterozygoten.....	78
Abbildung 34:	Boxplot Darstellung der Calbindin-Konzentration in Abhängigkeit des Alters.	79
Abbildung 35:	Boxplot Darstellung der Konzentration Calbindin und Gesamtprotein in Abhängigkeit des Alters.....	81
Abbildung 36:	Graph des zeitlichen Verlaufs der Calbindin-Konzentration.....	82
Abbildung 37:	Säulendiagramm der LDH Assay 490 nm Messwerte unterschiedlicher Reagenzien-Konzentrationen.....	83
Abbildung 38:	Graphische Darstellung der 490 nm Messwerte im LDH Assay unterschiedlicher Puffervarianten.	85
Abbildung 39:	Die 490 nm Messwerte im LDH Assay unterschiedlicher Medium- Zusammensetzungen auf doppelt-logarithmierten Skala.	86
Abbildung 40:	Säulendiagramm der LDH Assay 490 nm Messwerte unterschiedlicher Probenlagerungen.....	87
Abbildung 41:	Säulendiagramm der LDH Assay 490 nm Messwerte verschiedener Lyse- Zeiten.....	88

Abbildung 42: Säulendiagramm der LDH Assay 490 nm Messwerte unterschiedlicher Triton X-100 Konzentrationen.....	89
Abbildung 43: Säulendiagramm der LDH Assay 490 nm Messwerte variierender Triton X-100 Konzentrationen und Lyse-Zeiten.	90
Abbildung 44: Säulendiagramm der LDH Assay 490 nm Messwerte unterschiedlicher Extraktionsmethoden.....	91
Abbildung 45: Boxplot-Darstellung des Mediantests der Standardwerte des LDH Assays.	92
Abbildung 46: Boxplot-Darstellung des Mediantests der standardisierten Standardwerte des LDH Assays.....	92
Abbildung 47: Graphische Darstellung der Variationskoeffizienten der Intra-Test-Varianz des LDH Assays.....	93
Abbildung 48: Säulendiagramm der Variationskoeffizienten des LDH-Assay.....	94
Abbildung 49: Histogramm der Variationskoeffizienten der Inter-Test-Varianz des LDH-Assay.....	94
Abbildung 50: Graphische Darstellung der standardisierten LDH-Aktivitäts-Messwerte der Halbwertszeitbestimmung.....	95
Abbildung 51: Boxplot-Darstellung der Calbindin-Konzentration und LDH-Aktivität in der Zellbehandlung.....	96
Abbildung 52: Boxplot-Darstellung der Calbindin-Konzentration und LDH-Aktivität im Medium bei Behandlung mit 1 μ M Ionomycin.	97
Abbildung 53: Boxplot-Darstellung der Calbindin-Konzentration und LDH-Aktivität im Medium bei Behandlung mit 500 nM Staurosporin.....	98
Abbildung 54: Darstellung des Verhältnisses der anteiligen Calbindin-Konzentration zur jeweilig anteiligen LDH-Aktivität.....	99
Abbildung 55: Beispielhafte ELISA Standardkurve dargestellt in doppelt logarithmiertem Koordinatensystem.	100
Abbildung 56: Aminosäuresequenz von humanem Calbindin D28k sowie der alternativen Splice Variante.....	104
Abbildung 57: Beispielhafte LDH Assay Standardkurve dargestellt in doppelt logarithmiertem Koordinatensystem.....	108

Formelverzeichnis

Formel 1:	Berechnung der Zellzahl nach Auszählung in der Neubauer Zählkammer.....	20
Formel 2:	Berechnung der für die Konzentrationsberechnung des ELISA verwendeten Absorptionswerte.....	37
Formel 3:	Grundprinzip des LDH Assays.....	40
Formel 4:	Hintergrundkorrektur der Messwerte im LDH Assay.....	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Chemikalien und Substanzen	12
Tabelle 2:	Verwendete Puffer und Lösungen	14
Tabelle 3:	Verwendete Antikörper.....	15
Tabelle 4:	Verwendete Plasmide	15
Tabelle 5:	Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	17
Tabelle 6:	Verwendete Software	18
Tabelle 7:	Vorgaben des MACSfectin Protokoll für Zellzahl und Volumina je Kulturschale	20
Tabelle 8:	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für den SDS-Page.	24
Tabelle 9:	Übersicht der verwendeten ELISA-Protokolle.	35
Tabelle 10:	Übersicht der eingesetzten Puffer in den ELISA-Protokollen.	35
Tabelle 11:	Vergleich der verwendeten Substanzen im LDH Assay unterschiedlicher Autoren.....	42
Tabelle 12:	Verhältnis der eingesetzten Substanzen in den unterschiedlichen Protokollen.	43
Tabelle 13:	Übersicht der verwendeten LDH Assay Protokolle.	45
Tabelle 14:	Einzelmesswerte bei 450 nm für variierende Konzentrationen des 1. Antikörpers.	56
Tabelle 15:	450 nm Messwerte variierender Konzentrationen des 1. Antikörpers im V1 und V2 Protokoll.....	57
Tabelle 16:	450 nm Messwerte variierender Konzentrationen des 1. Antikörpers.....	58
Tabelle 17:	Messwerte bei 450 nm für variierende Konzentrationen des 2. Antikörpers.	60
Tabelle 18:	450 nm Messwerte variierender Konzentrationen des 1. und des 2. Antikörpers.	62
Tabelle 19:	Variationskoeffizienten der 450 nm Messungen variierender Konzentrationen des 1. und 2. Antikörpers im ELISA.....	62
Tabelle 20:	Darstellung der Messwerte der 450 nm Messungen verschiedener Konzentrationen des 3. Antikörpers im ELISA.....	64
Tabelle 21:	Darstellung der Variationskoeffizienten der 450 nm Messungen verschiedener Konzentrationen des 3. Antikörpers im ELISA.....	65
Tabelle 22:	450 nm Messungen unterschiedlicher ELISA-Blockpuffervarianten.	67
Tabelle 23:	Vergleich der 450 nm Messwerte unterschiedlicher Blockierungsdauer.....	68

Tabelle 24:	Vergleich der 450 nm Messwerte unterschiedlicher Proben in Abhängigkeit von CaCl ₂	69
Tabelle 25:	Vergleich der Calbindin-Konzentrationen von Wildtyp und heterozygoten Gewebeproben.	78
Tabelle 26:	Vergleich der Calbindin-Konzentrationen von Gewebeproben unterschiedlichen Alters.....	79
Tabelle 27:	Gegenüberstellung von Calbindin und Gesamtprotein der verschiedenen Gewebeproben nach Alter.....	80
Tabelle 28:	490 nm Messwerte für unterschiedliche Konzentrationen der Reagenzien im LDH Assay.....	84
Tabelle 29:	490 nm Messwerte im oberen und unteren Bereich der Messskala des LDH Assay in Abhängigkeit der Triton X-100 Verdünnung.	86
Tabelle 30:	Messung bei 490 nm im LDH Assay für unterschiedliche Probenlagerungen.....	87
Tabelle 31:	LDH Assay 490 nm Messwerte unterschiedlicher Lyse-Zeiten.	88
Tabelle 32:	490 nm Messwerte im LDH Assay der Lyse nativer und transfizierter HN10e-Zellen.	89
Tabelle 33:	Gemessene Calbindin Konzentration und LDH-Aktivität der unbehandelten Kontrolle.....	97
Tabelle 34:	Calbindin Konzentration und LDH-Aktivität der Behandlung mit 1 µM Ionomycin sowie 500 nM Staurosporin über 28 Stunden.	98
Tabelle 35:	Am 28 Stunden Kontrollwert anteilige Calbindin Konzentration und LDH-Aktivität der Zellbehandlung.....	99

Abkürzungsverzeichnis

BCA Assay	Bicinchoninsäure Assay
BLK	Blank (Nullwert)
BSA	Rinder Serum Albumin
CaBP	Calcium binding protein
CB	Calbindin D28k
Cb	Cerebellum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DTT	1,4 Dithiothetiol
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetales Kälber Serum
GST	Glutathion-S-Transferase
Hc	Hippocampus
HRP	Meerrettichperoxidase
INT	Iodnitrotetrazoliumchlorid
Ko	Knock-out
LB	Lysogeny broth
LDH	Laktatdehydrogenase
N	Niere
NAD⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Parietal Cortex
PLL	Polylysin
PMS	Phenazin-methosulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

RT	Raumtemperatur
ü.N.	über Nacht
Wt	Wildtyp

1 Einleitung

Das Protein Calbindin D28k aus der Familie der Calcium-bindenden Proteine konnte bereits in einigen Studien als potenzieller Biomarker bei Läsionen, insbesondere von Nieren- und Nervengewebe benannt werden (Adedeji et al., 2021; Bradbury et al., 2016; Hoffmann et al., 2010). Eine Betrachtung im Zellmodell ist bislang nicht beschrieben. Die Kinetik der Freisetzung aus geschädigten Zellen wird in dieser Arbeit untersucht.

1.1 Die Familie der Calcium-bindenden Proteine

Basierend auf der gemeinsamen, hochkonservierten Struktur der EF-Hand, einem Helix-Loop-Helix-Motiv, das die reversible Bindung von Metall-Ionen und insbesondere die hochaffine Bindung von Calcium-Ionen ermöglicht (Christakos et al., 1989), untersuchten Kawasaki und Kretsinger 2017 mehr als 800 unterschiedliche Sequenzen in einer Cluster-Analyse in sechs Gruppen und 156 Subfamilien (Kawasaki & Kretsinger, 2017). Die Bezeichnung EF-Hand geht hierbei zurück auf die Veranschaulichung des Motivs mithilfe der Finger der rechten Hand, dem Zeigefinger als erste Helix „E“ und dem Daumen als zweite Helix „F“ sowie dem zwischenliegenden gebogenen Mittelfinger – dem Metallionen-bindenden Loop. Die klassische EF-Hand ist 29 Aminosäuren lang und bildet in der Regel bei doppeltem Vorkommen eine gepaarte Struktur aus (Nakayama & Kretsinger, 1994). Eine mögliche Theorie legt aufgrund dessen eine im Laufe der Evolution erfolgte genetische Duplikation der Struktursequenz nahe (Kawasaki & Kretsinger, 2017; Nakayama & Kretsinger, 1994).

Innerhalb dieser Proteinfamilie weisen die einzelnen Proteine – trotz des hoch konservierten EF-Hand-Motivs – eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen auf. Auf die bedeutendsten Vertreter dieser Proteinfamilie soll nachfolgend näher eingegangen werden.

1.1.1 Calmodulin

Calmodulin wird als Wichtigstes der Calcium-bindenden Proteine angesehen (Alberts, 2008) und wird der Klassifikation nach der CTER-Gruppe zugeordnet, der auch Troponin C angehört (Nakayama & Kretsinger, 1994). Es kommt in allen eukaryotischen Zellen vor, schwankt in der Expression aber zwischen unterschiedlichen Gewebetypen. Das 17 kDa schwere Protein besitzt vier EF-Hand-Motive und durchläuft in Abhängigkeit der Anzahl an gebundenen Calcium-Ionen Konformationsänderungen, die spezifische Protein-Interaktionen ermöglichen. So wird für die

Aktivierung der Phosphodiesterase nur ein an Calmodulin gebundenes Calcium-Ion benötigt, für die Mikrotubuli-Depolymerisation hingegen eine Vollbesetzung aller vier Motive mit Calcium-Ionen (Means & Dedman, 1980). Besonders wichtig ist die Interaktion mit der ATP gestützten Calcium-Pumpe der Zellmembran, deren Aktivierung Gegenmaßnahmen bei intrazellulär steigender Calcium-Konzentration ermöglicht (Alberts, 2008).

1.1.2 S100

Aus der Subfamilie der S100 Proteine, einer Gruppe kleiner Proteine mit einem Molekulargewicht von 10 - 12 kDa, ist das – unter anderem in Astrozyten und Oligodendrozyten vorkommende – β - β Homodimer S100B medizinisch eines der bekanntesten Vertreter (Steiner et al., 2007). Als Biomarker kommt das Protein bei traumatischen Gehirnverletzungen zum Einsatz, sowie bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Multiple Sklerose oder die Parkinson-Krankheit sind veränderte extrazelluläre Konzentrationen detektierbar (Langeh & Singh, 2021; Michetti et al., 2019). S100 Proteine enthalten zwei EF-Hand-Motive und bilden Homo- oder Heterodimere der bekannten β - oder α -Varianten (Kligman & Hilt, 1988). Im Menschen sind 24 S100 Gene bekannt, die überwiegend auf Chromosom 1 liegen (Kawasaki & Kretsinger, 2017). Die S100 Proteine zeigen eine bedeutende Funktion in der Zell-Zell-Kommunikation, im Zellwachstum sowie der Organisation von Mikrotubuli. Aufgrund der Induktion der Ausbildung von Neuriten wird S100B auch Neurite extension factor (NEF) genannt (Zimmer et al., 1995).

1.1.3 Calbindin D28k und verwandte Calcium-bindende Proteine

Calbindin D28k (CB) ist ein Calcium-bindendes Protein aus der EF-Hand-Proteinfamilie. Von sechs möglichen EF-Hand-Motiven sind, aufgrund sequenzieller Unterschiede und konsequentem Fehlen der für die Bahnung der Ionen essentielle Sauerstoffatome in zwei Motiven, nur vier Motive an der Bindung von Calcium-Ionen beteiligt (Hunziker, 1986). Erstmals beschrieben wurde das Protein 1969 in Darm- und Nieren-Epithel von Hühnern als Vitamin D abhängiges Calcium binding Protein (CaBP) (Wasserman et al., 1969). Dabei liegen bei dem hochkonservierten Protein die Interspezies-Unterschiede innerhalb der Säugetiere bei 2 % und zu Vögeln bei ungefähr 21 % (Christakos et al., 1989).

Die Calbindin Subfamilie selbst besteht aus drei Proteinen: dem namensgebenden Calbindin D28k, Calretinin und Secretagogin. Diese Gruppe besitzt definitionsgemäß zu maximal zwei anderen Proteinen anderer Subfamilien eine Verbindung. Die drei Proteine werden von Genen

auf unterschiedlichen Chromosomen codiert, besitzen jedoch alle sechs EF-Hand-Motive (Schwaller, 2014). Das 31 kDa schwere Calretinin wurde erstmals in der Retina gefunden und zeigt in Abhängigkeit der Calcium-Bindung eines Sensorproteins typische Konformationsänderungen (Schwaller, 2014). Darüber hinaus zeigten Experimente mit Knock-out-Tieren die Bedeutung des Proteins für die Kleinhirnfunktion (Schiffmann et al., 1999). In Mesotheliom-Zellen konnte die für das Wachstum-relevante Rolle von Calretinin gezeigt werden (Blum & Schwaller, 2013). Secretagogen wurde als 32 kDa schweres Calcium-bindendes Protein in den β -Zellen des Pankreas entdeckt. Dabei weist es sechs EF-Hand-Motive auf, von denen bei höheren Eukaryoten mindestens ein Motiv nicht funktional ist. Die Veränderungen der Tertiärstruktur bei Calciumbeladung lassen auch für Secretagogen – neben seiner essenziellen Rolle in der neuroendokrinen und synaptischen Sekretion – eine Sensorfähigkeit vermuten. Das Protein konnte entsprechend in Drüsen – endokrine, wie auch exokrine – aber auch in Neuronen nachgewiesen werden und ergänzt im ZNS das Expressionsmuster von Parvalbumin (Alpar et al., 2012).

1.1.3.1 Vorkommen

Bei der Lokalisation von Calbindin D28k ist zwischen der Vitamin D abhängigen und unabhängigen Expression zu unterscheiden. Im Gegensatz zu der in Vögeln und Reptilien weit verbreiteten namensgebenden Vitamin D abhängigen Expression von Calbindin D28k im Darmepithel, zeigen Säugetiere diese in der Regel nicht (Christakos et al., 1989). Eine Ausnahme stellt unter anderem das adulte Hausschwein dar, das in duodenalen endokrinen Zellen Calbindin D28k vorweisen kann (Pochet et al., 1990). In dem renalen Tubulusepithel sowie im Epithel des Darms wird Calbindin hingegen auch weitgehend bei Säugetieren Vitamin D abhängig exprimiert. Es kommt dabei jedoch ausschließlich im Tubulusepithel des distalen Konvoluts vor (Christakos et al., 1989).

Im Pankreasgewebe konnte Calbindin in β -Zellen nachgewiesen werden und schließt hier an das Vitamin D System an (Johnson et al., 1994). Durch Vitamin D Zufuhr kann die Calbindin-Konzentration sowie die Insulin Sekretion beeinflusst werden. Calbindin selbst zeigt dabei eine Modulation der exzitatorischen Insulin-Sekretion durch Interaktion mit intrazellulären Calcium-Konzentrationen (Sooy et al., 1999), die eine entscheidende Rolle in der Sekretion spielen (Parkash et al., 2002).

In den, für den Calcium Haushalt des Organismus bedeutenden, Knochen wurde Calbindin D28k in Osteoblasten nachgewiesen (Bellido et al., 2000) und zeigt in vitro unter einer Vitamin D abhängigen Expression eine bedeutende Rolle für den Aufbau der extrazellulären kalzifizierten Matrix (Faucheux et al., 1998).

Unabhängig von dem Vitamin D System wird Calbindin in Neuronen exprimiert. M. R. Celio (1990) präsentierte durch immunhistochemische Färbungen des zentralen Nervensystems der Ratte die Verteilung von Calbindin. Neben dem Vorkommen in einigen wenigen, den Golgi Typ II Zellen zuzuordnenden, Interneuronen, kommt es vor allem in Golgi Typ I Zellen vor. Hier zeigt sich Calbindin unter anderem im Hippocampus, in den striatonigralen Neuronen sowie den thalamischen Projektionsneuronen. Ebenfalls findet es sich im Nucleus basalis Meynert und insbesondere in den Purkinje Zellen des Kleinhirns und den vegetativen Zentren des Hypothalamus. Darüber hinaus konnte Calbindin aber auch in spinalen und sensorischen Ganglien der olfaktorischen, cochlearen und vestibulären Bahnen dargestellt werden (Celio, 1990).

Starke Unterschiede zeigen sich in der Expression von Calbindin im Auge, sowohl zwischen unterschiedlichen, aber auch innerhalb der anatomisch und physiologischen Schichten (Wassle et al., 1998). Bei positiven Nachweisen in horizontalen Zellen von Säugetieren, zeigen sich interspezies-Unterschiede vor allem in der Verteilung der Expression innerhalb der Zapfen, während die Stäbchen der Photorezeptor-Schicht kein Calbindin enthalten (Pasteels et al., 1990).

1.1.3.2 Funktion

Die vier funktionalen EF-Hand-Motive 1, 4, 5, und 3 werden ihrer Affinität folgend, sequenziell in Abhängigkeit der Calciumkonzentration mit Calcium-Ionen beladen (Venters et al., 2003). Die dabei durchlaufenen Konformationsänderungen und die Präsentation hydrophober Oberflächenanteile, in Kombination mit einer hoch-selektiven Bindung von Calcium-Ionen über Magnesium-Ionen, führten zu der vermuteten Funktion einer atypischen Calcium-Detektion über eine gewöhnliche Calcium-Bindung hinaus (Berggard, Miron, et al., 2002). Eine Sensorfunktion nimmt Calbindin somit im renalen Tubulusepithel durch die Calcium-abhängige Bindung an TRPV5 wahr und zeigt in diesem Gewebe eine essenzielle Rolle für den Calcium-Transport.

Calbindin zeigt jedoch in Protein-Peptid-Interaktionen mit intrazellulären Kaskade-Peptiden auch eine Calcium-unabhängige Wirkung. So interagiert es direkt mit dem Ran-binding-Protein M (Lutz et al., 2003) und über die IMPase mit der PI-Kaskade (Berggard, Szczepankiewicz, et al., 2002). Die Protein-Interaktionen von Calbindin liefern Anhaltspunkte für seine beobachtete zytoprotektive Rolle. In vitro konnte gezeigt werden, dass Calbindin Caspase 3 in Gegenwart von Calcium-Ionen bindet (Bobay et al., 2012). Neben der Caspase 3 bedingten anti-apoptotischen Wirkung in Osteoblasten (Bellido et al., 2000), wird in neuronalen Modellen eher die Calcium-vermittelte Apoptose als gehemmt Element betrachtet (Iacopino et al., 1992).

Darüber hinaus zeigen Versuche mit Knock-out Tieren sowie Zellmembran-Experimente die Bedeutung für die neuronale Funktionalität der Purkinje Zellen des Kleinhirns (Airaksinen, Eilers, et al., 1997) und legen eine Signal-transformierende Rolle nahe.

1.1.3.3 Calbindin bei pathophysiologischen Prozessen

In der dementiellen Erkrankung Morbus Alzheimer kommt es durch intraneuronale Aggregation von Tau-Protein zu Neurofibrillenbündeln und zusätzlich zu extrazellulärer kortikaler Ablagerung von aggregierten β -Amyloid-Plaques. Dabei lassen sich eine neuritische Degeneration von Axonen und Nervenzellverluste beobachten, die sich symptomatisch in einer kortikalen Demenz und begleitenden psychiatrischen Veränderungen zeigen (Hufschmidt & Amtage, 2017). In immunhistochemischen Untersuchungen wiesen Greene et al. (2001) in Gewebeproben erkrankter Patienten eine reduzierte Anzahl Calbindin D28k positiver Zellen im Vergleich zu Gesunden nach. Zudem fand sich bei Gesunden eine Korrelation Calbindin D28k positiver Zellen mit zunehmendem Alter, die bei an Alzheimer erkrankten Patienten nicht nachweisbar war (Greene et al., 2001). Im Tiermodell transgener 5XFAD Mäuse zeigten CB-knockout Tiere bei gleicher β -Amyloid-Verteilung eine deutlich größere Apoptose-Rate und reduzierte Konzentration anti-apoptotischer Proteine wie bcl-2 und bcl-xL (Kook et al., 2014). Zusätzlich konnte eine Calbindin D28k Überexpression im in vitro Modell in unterschiedlichen Zelllinien den β -Amyloid induzierten oxidativen Stress reduzieren und geringere Apoptoseraten verzeichnen (Guo et al., 1998; Wernyj et al., 1999).

Ähnliche Effekte auf das anti-apoptotische Protein bcl-2 konnte auch durch in vivo Experimente eines MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) induzierten Morbus Parkinson Modells in Calbindin D28k überexprimierenden Mäusen gezeigt werden (Yuan et al., 2013). Morbus Parkinson zeigt als progrediente demenzielle Erkrankung in der Pathogenese Überlappungen mit der Lewy-Körperchen-Krankheit. Im Fall der α -Synucleinopathie kommt es ebenfalls zu einer Aggregatbildung und in dessen Folge zu einer Degeneration aminerg, cholinerg und typischerweise dopaminerg Neurone der Substantia Nigra (Hufschmidt & Amtage, 2017). Wenngleich in einer Analyse der japanischen Bevölkerung ein Single-Nucleotid-Polymorphism (SNP) im CALB1 Gen mit Morbus Parkinson unabhängig des α -Synuclein-Gens assoziiert werden konnte (Mizuta et al., 2008), konnte im Tiermodell mit Calbindin-Knockout Mäusen im Fall des MPTP induzierten Morbus Parkinson Modells keine erhöhte Suszeptibilität festgestellt werden (Airaksinen, Thoenen, et al., 1997).

Watanabe et al. (1994) wiesen in der Untersuchung von Lungenkarzinom-Exzidaten mittels Enzym Immunoassay messbar erhöhte Calbindin D28k Konzentrationen, jedoch mit großen interindividuellen Unterschieden, nach. Messbare Calbindin-Werte im Serum konnten nicht

festgestellt werden (Watanabe et al., 1994). Basierend auf diesen Erkenntnissen konnte in einer zweiten, größeren Studie in 74 % der Lungenkarzinome Calbindin D28k immunhistochemisch nachgewiesen werden. Dabei erfasste die Studie zusätzlich signifikant höhere Überlebenszeiten für Calbindin D28k positive Adenokarzinome (Castro et al., 2000).

Das Medulloblastom, ein infiltrierender maligner Tumor, der meist im Dach des IV. Ventrikels liegt und zu 70 - 80 % bei Kindern im Alter von fünf bis neun Jahren auftritt zeigt bei intrakranieller Druckerhöhung häufig eine zerebelläre Symptomatik (Hufschmidt & Amtage, 2017). In vitro konnte in der humanen Medulloblastom-Zellreihe D283 Med, ebenso wie in histopathologischen Schnitten von Tumorgewebe, immunhistochemisch Calbindin D28k nachgewiesen werden (Katsetos et al., 1995). Dabei konnte in einer retrospektiven Analyse von 55 Patientenfällen die Expression von Calbindin D28k in den Medulloblastom-Zellen als prognostischer Wert für eine kürzere Überlebenszeit, sowie einer höheren Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs gezeigt werden (Pelc et al., 2002).

1.2 Calbindin als Biomarker

Für die Erfassung renalen Schadens und spezifischer Schädigung des distalen Tubulusepithels konnte Calbindin D28k im Urin als Marker gefunden werden. Die Lithotripsie in 81 Patienten mit Nieren- oder Ureter-Steinen mittels ESWL (Extrakorporale Stoßwellenlithotripsie) zeigte in Abhängigkeit der eingesetzten Schockwellen-Stärke im Urin signifikant erhöhte Calbindin D28k Konzentrationen (in $\mu\text{g/g}$ Creatinin) in Messungen direkt sowie zwei Stunden nach Behandlung. Bei einem definierten Cut-off-Wert der in einem gesunden Kollektiv ($n = 100$) beobachteten Serumkonzentrationen von Calbindin, konnten insbesondere im Fall der Nierensteine ein deutlicher Anstieg der Konzentrationen im Serum in 67 – 73 % der Fälle verzeichnet werden (Hasegawa et al., 1993).

Die chemische Schädigung des distalen Tubulusepithels durch die selektive Aufnahme von Cisplatin und dessen Akkumulation zeigte in sequenziellen Urin-Untersuchungen von Patienten-Kohorten signifikant erhöhte Werte. Zwei unterschiedliche Studien mit Patienten, die 70 mg/m^2 Cisplatin, eine Dosis $> 25 \text{ mg/m}^2$ erhielten, zeigten dabei deutlich einen Peak der im Urin messbaren Werte an Tag 10 mit einer nachfolgenden Normalisierung (George et al., 2020; Takashi et al., 1996). Die Studie von George et al. (2020) zeigte dabei bei subsequenten Zyklen einen Rückgang auf den Basis-Ausgangswert. Im Falle einer chemisch ausgelösten akuten Nephrotoxizität mittels Gentamicin ($60 - 120 \text{ mg/kg}$) konnte in Ratten Calbindin D28k als signifikant sensitiverer Marker im Urin im Vergleich zu den etablierten Routineparametern

identifiziert werden (Hoffmann et al., 2010). Bei Behandlung von Ratten mit der nephrotoxischen Compound X von Sanofi R&D (Vitry-sur-Seine, Frankreich) zeigten sich bereits Erhöhungen der Calbindin D28k Konzentrationen im Urin bevor Nekrose oder Degeneration des Tubulus-Epithels beobachtet werden konnten (Adedeji et al., 2021).

Die rezessiv vererbte Niemann-Pick Typ C Erkrankung betrifft ungefähr eins von 120.000 Lebendgeborenen. Dabei führt der gestörte intrazelluläre Cholesterol-Transport zu einer altersabhängigen progressiven, aber sehr heterologen viszeralen und insbesondere neurologischen und psychiatrischen Symptomatik (Hufschmidt & Amtage, 2017). Betroffene Menschen versterben dabei häufig bereits mit dem 20. Lebensjahr. Von verzögerter Entwicklung über Krampfanfälle zeigt sich bei Patienten auch typischerweise eine Kleinhirnsymptomatik, wie Ataxie und Gangunsicherheit (Vanier, 2010). Diese Symptomatik geht bei progredienter Erkrankung einher mit einem immunhistochemisch detektierbaren Verlust von Purkinje-Zellen (Vite et al., 2015). In Experimenten mit NPC1 Katzen, die durch homozygote Missense-Mutation im NPC1-Gen die Niemann-Pick Typ C Erkrankung ausbildeten, konnten in unterteilten Altersgruppen bis zu dem gesetzten Endpunkt von 24 Wochen signifikant erhöhte Calbindin D28k Konzentrationen im Liquor der erkrankten Tiere im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erfasst werden. Gleichzeitig zeigte der Einsatz des Glykosphingolipid-Biosynthese Inhibitors Miglustat, in 16 Fällen einen signifikanten Abfall der posttherapeutischen Calbindin D28k Konzentration im Liquor im Vergleich zu den Werten vor Behandlungsbeginn (Bradbury et al., 2016).

1.3 Relevanz und Anforderung an Biomarker in der Medizin

Ob in der Diagnostik, zur Beurteilung des Therapieerfolges oder in der Verlaufskontrolle, Biomarker spielen eine immer größere Rolle in der modernen Medizin. In vielen Fällen zeigen sie bereits vor der apparativen Diagnostik einen entsprechend pathologischen Verhalten an. Insbesondere wertvoll ist ein Parameter der hochselektiv und bereits vor anderen Laborwerten auffällige Werte zeigt.

Die Anforderungen an den Biomarker folgen den zu untersuchenden Pathologien, wobei der perfekte universal Biomarker als solches nicht existieren kann. Im Falle der Tumormarker als Biomarker, stellen diese beispielsweise die frei zirkulierenden Bestandteile umgesetzter Tumorzellen als weit über der Norm liegende Messwerte dar.

Die Anforderung eines hochselektiven Vorkommens des als Biomarker fungierenden Proteins ermöglicht die präzise Kontrolle pathologischer Mechanismen in einem Organ oder einer

spezifischen Zellpopulation. Die Untersuchung unterschiedlicher Materialien kann hier, bei Vorkommen in unterschiedlichen Geweben, eine zielgerichtete Lokalisation erlauben. In der Histopathologie ermöglicht die Kenntnis spezifisch vorkommender Proteine die Gewebe- und Zellzuordnung, insbesondere auch bei noch entdifferenzierenden Zellen.

Zur Erfassung von apoptotischen oder nekrotischen Prozessen sollte das als Biomarker verwendete Protein ausschließlich intrazellulär vorkommen. Die Freisetzung in die entsprechende Körperflüssigkeit erfolgt dann bei Zellstress, durch Zellschädigung oder Zelluntergang in die Zirkulation. Ein Protein, das auch sezerniert wird, kann bei entsprechender Gewebehypertrophie auch zu höheren Messwerten führen und die Aussagekraft des Biomarkers beeinflussen.

Die hohe Freisetzungskinetik des Proteins ist besonders relevant, wenn eine Veränderung der Zellphysiologie rasch erkannt werden soll. Ein verzögerter messbarer Anstieg des Biomarkers beeinflusst in dieser Fragestellung dessen Anwendbarkeit und Aussagekraft.

Die Stabilität spielt eine große Rolle für die Testung. Ein Protein mit einer sehr kurzen Halbwertszeit ist laborchemisch schwer zu erfassen und könnte bei wengleich hoher Selektivität keine validen Ergebnisse garantieren. Gleichzeitig ist nicht nur die Stabilität im Organismus zu beachten, sondern auch die erforderlichen Transport- und Testbedingungen, die zur Erfassung valider Ergebnisse notwendig sind.

2 Fragestellung

Die Fragestellung dieser Arbeit ist die Untersuchung der Freisetzung von Calbindin D28k aus Zellen im in vitro Modell im Rahmen von durch Noxen induzierter Zellschädigung und Zelluntergang. Die Kinetik soll dabei anhand von LDH als ubiquitär vorkommendes – intrazelluläres Protein beurteilt werden. Dabei bietet sich mit LDH ein Protein ähnlicher Größe, das gleichzeitig nicht sezerniert wird.

Darüber hinaus soll der Vergleich zu LDH, einem in vivo gut etablierten Marker unspezifischer Zellschädigung, eine Aussage über die Reliabilität als Frühmarker treffen können. Die Erfassung der Calbindin Halbwertszeit in vitro soll dabei die Beurteilung möglicherweise auftretender Maxima ermöglichen.

Hierfür soll zunächst ein sensitiver und spezifischer Calbindin D28k ELISA mittels rekombinant exprimierten Calbindin etabliert und statistisch validiert werden. Insbesondere der Ausschluss einer Kreuzdetektion des nah verwandten Calretinin soll durch Proben transfizierter Zellen als auch durch Lysate von Mausgewebe erfolgen. Zur Erhebung der freiwerdenden LDH-Aktivität soll ein LDH Assay zu einer Referenz LDH Probe mittels Standardleiter etabliert und statistisch validiert werden. Vor allem verlässliche Messwerte für Proben in Zellmedium sind relevant.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Substanzen

Chemikalien und Substanzen	Firma	Bestellnummer
Ampicillin Natriumsalz 98 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	A 9518
Aprotinin (aus Rinder Lunge)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	A 1153
Aqua (steril)	B. Braun, Melsungen, Deutschland	0082479E
BCA Reagenz A	Interchim Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland	UP 95424A
BCA Reagenz B	Interchim Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland	UP 95425A
Brilliant Blue R	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	B 7920
BSA – Rinder Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	A 9647
Calciumchlorid Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	5239.2
Desoxyribonuclease I	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New Jersey, USA	2138
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	4984
DL – Milchsäure Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	L 7900
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium mit GlutaMAX™	Gibcom for life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	61965-026
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Glutamin- und Phenolrot-frei	Gibco, for life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA	11594416
DMSO – Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	D 8418
DTT – 1,4 Dithiothetriol	Roche Holding AG, Basel, Schweiz	10197777001
EDTA – Ethylendiamintetraessig- säure Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	E 7889
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3738.4
Ethanol 99,8 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	9065.3
FBS – Fötale Kälber Serum	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Deutschland	210471

GlutaMax™	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	35050061
Gluthathion Sepharose	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden	170756
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3783.1
Glycine	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	G 8790
Imidazol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	I 0125
INT – Iodnitrotetrazoliumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	I 8377
Ionomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	I 9657
IPTG – Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	I 6758
LB Medium – Lysogeny broth (Lennox)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	X 964.2
Leupeptin Hemisulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	L 2884
L-Gluthathione	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	G 6013
Lithium-L-Laktat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	L2250-10G
L-LDH (Typ XI) – L-Laktatdehydrogenase	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	L1254
Lysozym, aus Hühnereiweiß	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	L 7651
MaCSfectin Reagenz	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-098-411
Magnesiumchlorid hexahydrate	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	2189.2
Methanol 99,9 p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	4627.2
Milchpulver	Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell am Bodensee, Deutschland	3030
Mowiol Polyvinylalkohol 4-88	Fluka, Buchs, St. Gallen, Schweiz	81381
NAD⁺ – Nicotinamidadenindinucleotid Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	N 0632
Natriumcarbonat wasserfrei	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	6392
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3957
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	K 300.2
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	G 885.1
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	S 5761

Nonidet P-40	BDH Middle East LLC, Dubai, Vereinigte Arabische Emirate	56009
PBS – Phosphat-gepufferte Salzlösung	Gibco, for life technologies, Kalifornien, USA	14190-094
DPBS – Dulbecco's phosphate buffered saline		
PMS – Phenazin-methosulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	P 9625
PMSF – Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	P 7626
Protein Assay Standard II, Lyophilized	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA	500-0007
PS – Penicillin-Streptomycin (Penicillin 10.000 U/ml, Streptomycin 10.000 µg/ml)	Gibco for life technologies, Darmstadt, Deutschland	15140-122
RNAse A	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland	109169
Salzsäure 37 % rauchend	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	4625.1
Schwefelsäure 2 M	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	9896.2
SDS – Natriumdodecylsulfat ultra pure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	23.26
Staurosporin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	S4400
Streptomycin Sulfate	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	S 9137
Thrombin	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA	GE27-0846-01
TMB Ultra – 3,3',5,5'-Tetra-methylbenzidin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	34028
TRIS-Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	4855
Triton X100	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	T 9284
Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	T 9410
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	P 9416
Wasserstoffperoxid 30 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	8070.2

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Substanzen

3.1.2 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Inhalt
1x PBS	120 mM NaCl, 20 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 2,5 mM KH ₂ PO ₄ in H ₂ O, pH 7,3
PBS-EDTA	PBS + 1 mM EDTA
TBS	50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH7,6
ELISA	
Beschichtungspuffer	0,2 M NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃ , pH 9,4
Tris Puffer	25 mM Tris/HCl, 0,15 M NaCl, 1 mM CaCl ₂ , pH 7,2
Waschpuffer	25 mM Tris/HCl, 0,15 M NaCl, 1 mM CaCl ₂ , pH 7,2 + 0,1 % Tween 20
Blockierungspuffer	2 % w/v BSA in Tris Puffer
Verdünnungspuffer	2 % w/v BSA in Tris Puffer + 0,05 % v/v Tween 20
LDH Assay	
1x LDH-Puffer	80 mM Laktat, 1,8 mM NAD ⁺ , 1 mM INT, 0,4 mM PMS, TrisHCl pH8
Zell-Medium	
EMFI	DMEM 1 % v/v Glutamax + 10 % w/v FBS + 1 % w/v PS
EMFip ⁻	DMEM 1 % v/v Glutamax + 10 % w/v FBS + 1 % w/v PS, phenolrotfrei
Behandlungsmedium, ± Phenolrot	DMEM, 1 % v/v Glutamax, 1 % w/v FBS, 1 % w/v PS, ± Phenolrot
Lysogeny broth (LB) Medium	2 % w/v LB-Medium in H ₂ O
Lyse Zellen und Gewebe	
NP-40-Lysepuffer	150 mM NaCl, 1 % v/v Nonidet P-40, 50 mM Tris HCl pH8
RIPA-Lyse-Puffer	150 mM NaCl, 1 % v/v Nonidet P-40, 0,5 % v/v Sodium deoxycholate, 0,1 % v/v SDS in 50 mM Tris pH8 (+1 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Aprotinin)
Zellysepuffer 1	100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM TrisCl
Zellysepuffer 2	100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100, 50 mM TrisCl
SDS Page & Western Blot	
SDS-Page 5x Ladepuffer	250 mM Tris HCl pH 6,8, 10 % v/v SDS, 30 % v/v Glycerol, 0,1 % v/v Bromphenol blue, 100 mM DTT
SDS-Page 10x Laufpuffer	1,92 M Glycine, 1 % v/v SDS, 0,25 M Tris HCl pH 8,3
Transferpuffer	45 mM Tris, 39 mM Glycine, 20 % v/v Methanol, 5 % v/v SDS in H ₂ O
Blockpuffer	5 % w/v Milchpulver, 0,2 % v/v Tween 20 in PBS
TBS-T Wasch-Puffer	137 mM NaCl, 0,1 % v/v Tween 20, 20 mM Tris HCl pH 7,6

Ponceau Lösung	0,1 % v/v Ponceau-S in 5 % v/v Essigsäure
Protein Purifikation	
Purifikations Puffer	50 mM Tris, 50 mM NaCl
E.c.-Lyse-Puffer-1	5 mM EDTA, 0,15 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptin, 1 mg/ml Lysozym in Purifikations Puffer
E.c.-Lyse-Puffer-2	0,2 % Triton X-100, 5 mM MgCl ₂ , 5 µg/ml DNase I, 5 µg/ml RNase A
Niedrig pH Eluierungspuffer	0,5 M NaCl, 10 mM HCl pH2
Hochsalzpuffer	1 M NaCl, 0,05 M Tris HCl 7,4
Bindungs/Waschpuffer	0,5 M NaCl, 0,05 M Tris HCl pH 7,8
Lagerlösung	20 % v/v Ethanol, 0,05 M Acetat
Coomassie Färbung	
Coomassie Fixationslösung	10 % v/v Essigsäure, 30 % v/v Methanol
Coomassie Blue Lösung	0,1 % v/v Brilliant Blue R, 10 % v/v Essigsäure
Coomassie Entfärbelösung	10 % v/v Essigsäure
Immunfärbung	
Antikörperverdünnung	1 % w/v BSA, 0,1 % v/v Triton X-100 in 1x PBS
Immunfärbung	
Permeabilisierungslösung	10 % w/v BSA, 0,1 % v/v Triton X100 in 1x PBS
Mowiol Lösung	10 % v/v Mowiol Polyvinyl Alcohol 4-88 in 12 mM Tris pH 8,51, 1,4 M Glycerol
Poly-L-Lysin (PLL)-Lösung	0,001 % v/v PLL in H ₂ O

Tabelle 2: Verwendete Puffer und Lösungen , aufgelistet nach ihrem Verwendungszweck im ELISA, LDH Assay, der Lyse von Zellen und Gewebe, der SDS-Page und dem Westernblot, der Protein Purifikation, der Coomassie Färbung und dem Medium für die Zellkulturen

3.1.3 Antikörper

Antikörper	Antigen	Spezies Isotyp	Firma / Bestellnummer
300	Calbindin D28k (Huhn)	Monoklonal, Maus	Swant AG, Burgdorf, Schweiz
Cb38	Calbindin D28k (Ratte)	Polyklonal, Hase	Swant AG, Burgdorf, Schweiz
7699/13	Calretinin (Mensch)	Polyklonal, Hase	Swant AG, Burgdorf, Schweiz
Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked (HRP-anti-rabbit-IgG)	IgG (Hase)	Polyklonal, Esel	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA / NA934

Amersham ECL Mouse IgG, HRP-linked anti-mouse-IgG	IgG (Maus)	Polyklonal, Schaf	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA / NA931
Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG	IgG (Maus)	Polyklonal, Ziege	Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

3.1.4 Plasmide

Plasmid	Protein	Firma / Bezug
TH3.2	Calbindin D28k (Maus)	AG Meyer
SKNSEiCbA	Calbindin D28k (Maus)	Matti Airaksinen / Michael Meyer, MPI Psychiatrie Theoretisches Institut, Martinsried
EGFPN3	EGFP – Enhanced-Green-Fluorescent-Protein	Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA
RSV-CR	Calretinin (Mensch)	Prof Beat Schwaller, Universität Fribourg, Schweiz

Tabelle 4: Verwendete Plasmide

3.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte	Firma
Milli-Q	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
pH-Meter	
FiveEasy pHmeter	Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA
InLab® Easy BNC	Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA
Pufferlösung pH 4,01; 7,00; 10,00	DM Messtechnik, Seeon, Deutschland
	DM4PH2 DM7PH5 DM10PH8
Elektrolytlösung KCl 3mol/l mit AgCl	DM Messtechnik, Seeon, Deutschland
	DM3MKAGCL24
Waage	
Adventurer™	OHAUS, Nänikon, Schweiz
Feinwaage Sartorius	vwr, Radnor, Pennsylvania, USA
Wägebapier	vwr, Radnor, Pennsylvania, USA
	611-9420
Zentrifuge	

Biofuge pico	Heraeus, Hanau, Deutschland	
Mega Star 600	vwr, Radnor, Pennsylvania, USA	
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
Megafuge 8R Heraeus Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	
Mikroskop		
Durchlichtmikroskop	Leica, Wetzlar, Deutschland	
Konfokalmikroskop LSM710	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	
Sterilbank		
B-[MaxPro] ² -160	Berner International GmbH, Elmshorn, Deutschland	
Horizontal Laminar Flow Cabinet	BioAir Instruments, Siziano, Italien	
Inkubator Galaxy 170 S	New Brunswick, Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
Sonstiges		
Zählkammer (Neubauer improved)	LO Laboroptik Ltd, Lancing, England	
Ultra-Turrax T25, Homogenisator	Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik, Staufen, Deutschland	
Universal Hood II Gel Doc System	Bio rad, München, Deutschland	
Wasserbad	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland	
PRIM Spektralphotometer	Schott instruments, Mainz, Deutschland	
Rocker 2D digital	IKA®, Staufen im Breisgau, Deutschland	
RH-KT/C Magnetrührer	IKA®, Staufen im Breisgau, Deutschland	
Laboport® Mini-Laborpumpe	Knf, Freiburg im Breisgau, Deutschland	
Fireboy eco Bunsenbrenner	Integra biosciences, Zizers, Schweiz	
Rotilabo®-Block-Heater H 250	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	
Epoch Spektrophotometer	Biotek®, Winooski, Vermont, USA	
Gefäße und Abdeckmaterial		
Cellstar® Cell Culture Dish	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich	664160
10 cm, 6 cm, 3 cm		628160
		627160
HiTrap™ Benzamidine FF 1 ml	Cytiva, Marlborough, Massachusetts, USA	17514302
Protein LoBind Tube 1,5 ml, Eppendorf Tubes®	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland	0030108116
Reaction Tubes 2 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich	623201
Cryo Tube® Nunc® 2 ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	V7634-500EA
Preparation Tube 5ml, conical, natural	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland	E1450-1100
Cellstar® Tubes	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich	188261
15 ml, 50 ml		210261
Einmalspritze Omnifix 5 ml, 10 ml, 20 ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland	4616057V 4616103V

		4616200V
Spritzenfilter Filtropur S 0.2	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	83.1826.001
Selecta Faltenfilter Nr 595 ½	Schleicher und Schuell, Düren, Deutschland	HMDf595320
nunc™ F96 Maxisorp Nunc-Immuno Plate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	44-2404-21
F16 Maxisorp Nunc-Immuno Plate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	10174811
ThermalSeal® films classic	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Z369683
SealPlate™	Excel Scientific, Victorville, Kalifornien, USA	100-SEAL-PLT
Amsheram™ Hybond™ PVDF Blotting Membrane 0,2 µm	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA	10600021
Parafilm "M" Laboratory Film	Bemis, Neenah, USA	11762644
Deckgläser Durchmesser 30 mm x 0.17 mm	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland	100044
Deckgläser Durchmesser 12 mm Menzel-Gläser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	631-0713
Pipetten und Pipettenspitzen		
Pipette ErgoOne® 2,5 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland	S7100-0125, S7100-0220, S7100-2200, S7110-1000
8-Kanal-Pipette ErgoOne®, 30 – 300 µl	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland	S7108-3300
GraduatedTip TipOne® 10 µl	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland	S1110-3710
Yellow Bevelled Tip TipOne® 200 µl	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland	S1111-1716
GraduatedTip TipOne® 1000 µl	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland	S1112-1730
Serologische Pipette steril 2 ml, 5 ml, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	86.1252.001, 86.1253.001, 86.1254.001

Tabelle 5: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

3.1.6 Software

Software	Firma	Version
EndNote	Clarivate Analytics	20.2.1
Fiji	Open Source	2.9.0
Gen5	BioTek	2.0
Image Lab	Bio rad	5.2
Microsoft® Excel® 365	Microsoft Corporation	2210
Microsoft® Word® 365	Microsoft Corporation	2210
SPSS®	IBM	25

Tabella 6: Verwendete Software

3.2 Zellkultur

3.2.1 Zelllinie Hn10e

Verwendet für die Experimente wurde die adhären wachsende HN10e Zelllinie. Diese Hybrid Zellen wurden 1990 von Lee et al. aus 18 Tage-alten embryonalen hippocampalen Zellen und N18TG2-Neuroblastom Zellen fusioniert. Wenngleich eine Membran-Exzitation nicht getestet wurde, zeigt diese Zellreihe neben Neuriten-Bildung auch eine NGF-Expression (Lee et al., 1990).

Die Zelllinie wurde bei 37 °C und 10 % CO₂ in EMFI-Medium kultiviert. Davon abweichend wurde für die Experimente ein langsames Zellwachstum angestrebt, weshalb die Zellen mit 1 % FBS im Medium gehalten wurden. Darüberhinaus wurde phenolrot-freies Medium verwendet, um die nachfolgende LDH-Bestimmung zu ermöglichen.

Die Zellpassage erfolgte in Abhängigkeit der Zelldichte ungefähr alle zwei bis drei Tage, mindestens jedoch alle vier Tage. Nach Abnahme des Mediums wurde die Schale mit vorgewärmten PBS-EDTA gespült und für acht Minuten mit Trypsin behandelt. Nach vorsichtigem Transfer in 15 ml Tubes in einer 2 + 5 Verdünnung (zwei Teile Zellmedium, fünf Teile Medium) wurden die Zellen bei 300 g für fünf Minuten schonend zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet behutsam in vorgewärmten Vollmedium resuspendiert. Die Zellauszählung erfolgte mit der improved Neubauer Zählkammer.

3.2.2 Zellrevitalisierung aus Glycerol Stock

Die Zellreihe wurde aus der Lagerung in Flüssigstickstoff entnommen und in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Nach Zugabe von 5 ml EMFI wurde die Zellsuspension für fünf Minuten bei

300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Pellet in 2 ml EMFI resuspendiert. Die revitalisierten Zellen wurden ausgesät und unter normalen Wachstumsbedingungen inkubiert.

3.2.3 Zellzählung

3.2.3.1 *Improved Neubauer Zählkammer*

Das vor allem für die Anwendung in der Hämatologie zur Auszählung von Leukozyten und Erythrozyten entwickelte Hämozytometer ist eine weitverbreitete und einfache Methode der Zellzählung. Der zentrale Abschnitt der Zählkammer mit einer Tiefe von 0,100 mm weist ein graviertes Netz auf, bestehend aus 3 x 3 Quadraten mit je einer Fläche von 1 mm². Beispielhaft dargestellt ist dies in Abbildung 1.

Die vier Eckquadrate, die auch für die Leukozytenzählung verwendet werden, wurden für die Auszählung der Zellkultur verwendet. Durch Aufbringen eines Deckglases entsteht bei sichtbaren Newton-Ringen die funktionsfähige Zählkammer.

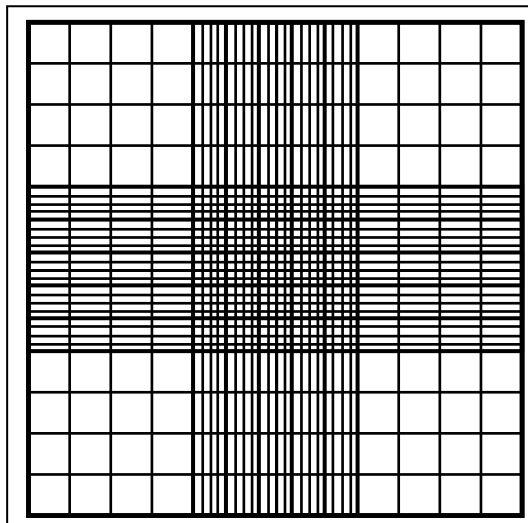


Abbildung 1: Graviertes Netz der Neubauer Zählkammer. Die vier 4 x 4 Eckquadrate wurden für die Zellzählung verwendet.

3.2.3.2 *Zählverfahren*

Die Zählung erfolgte lichtmikroskopisch mithilfe des 10x Objektivs und folgte einem standardisierten Ablauf. Die zu zählende Zell-Suspension wurde 1:10 in Medium verdünnt und anschließend durch die Kapillar-Wirkung mit einer Pipette in die Zählkammer gegeben. Ausgezählt wurden die vier Eckquadrate nach folgendem Schema: begonnen wurde die Zählung im linken oberen Unterquadrat eines Eckquadrates in einem S-förmigen Verlauf. Zellen die auf der linken oder oberen Begrenzungslinie des Eckquadrates lagen, wurden gezählt. Zellen die auf der unteren oder rechten Begrenzungslinie zu liegen kamen, dagegen nicht.

$$N_{/ml} = \frac{N_{E1} + N_{E2} + N_{E3} + N_{E4}}{4} * 10^4 * \frac{1}{\text{Verdünnung}} /ml$$

Formel 1: Berechnung der Zellzahl nach Auszählung in der Neubauer Zählkammer. Der Mittelwert der Zählungen der vier 4x4 Eckquadrate multipliziert mit 10^4 /ml und dividiert mit der Verdünnung ergibt die Zellzahl /ml.

Die Gesamtzellkonzentration pro Milliliter ergibt sich aus den Mittelwerten der vier Eckquadraten, multipliziert mit dem Kehrwert der Verdünnung und dem Volumen. In diesem Fall ergibt sich der Faktor 10^4 , bei einer Fläche von 1 mm^2 pro Eckquadrat und Tiefe von 1 mm.

3.2.4 Proteinexpression durch Lipofektion

Die spezifische Proteinexpression in der HN10e-Zellreihe erfolgte durch Lipofektion der entsprechenden Plasmide. Verwendet wurde das MACSfectin Reagenz (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). Verfahren wurde gemäß den Vorgaben des Herstellers. Abweichend vom Hersteller-Protokoll erfolgte die Transfektion jedoch bereits zwei Stunden nach der Zell-Aussaat. Die gemäß Hersteller empfohlenen Zellzahlen der jeweiligen Kulturschalengröße sowie die einzusetzende DNA Menge sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Kulturschale	Zellzahl	DNA (μg)	DNA Volumen (μl)	MACSfectin Reagent (μl)	Volumen	Zellkultur Volumen
100 mm	$10 - 30 \times 10^5$	12	250	24	250	8
60 mm	$5 - 10 \times 10^5$	6	150	12	150	3
30 mm	$2 - 5 \times 10^5$	3	100	6	100	2

Tabelle 7: Vorgaben des MACSfectin Protokoll für Zellzahl und Volumina je Kulturschale (Miltenyi Biotec, 2021).

Das MACSfectin Reagenz wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und gevortext. In separaten Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurde die entsprechende Menge DNA, beziehungsweise die Menge MACSfectin Reagenz in vorgewärmtem nativen DMEM Medium verdünnt. Die beiden Ansätze wurden nachfolgend zusammengeführt und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren vermischt. Das Gemisch wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur belassen, um die nachfolgende Komplexbildung zu ermöglichen. Danach wurde das Gemisch tropfenweise auf der vorbereiteten Zellkulturschale verteilt. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden in EMFI Medium.

3.2.5 Plasmide

Für die durch Lipofektion erfolgte Proteinexpression wurden unterschiedliche Plasmide eingesetzt. Native HN10e Zellen exprimieren kein Calbindin D28k in relevant nachweisbaren

Konzentrationen. Für die Untersuchungen im Zellmodell wurden zwei unterschiedliche Plasmide getestet. Im Direktvergleich wurde nachfolgend das expressionsstärkere Plasmid für das Zellbehandlungsexperiment eingesetzt werden. Die Expression von Calretinin erfolgte im Rahmen der ELISA Etablierung zum Ausschluss einer Kreuzerkennung. Enhanced green fluorescent protein (EGFP) mit einer Größe von 26,9 kDa (FPbase, 2023) diente zur Erfassung der zu verwendenden Konzentrationen der Noxen im Zellbehandlungsexperiment mittels Fluoreszenz-Mikroskopie.

3.2.5.1 TH3.2

Das Plasmid TH3.2 enthält die murine cDNA für Calbindin D28k (Calb1) in einem modifizierten pCMV5 Vektor, unter der Kontrolle des Cytomegalievirus (CMV) Promotors. Hergestellt wurde das Plasmid in der AG Meyer.

3.2.5.2 SKNSEiCbA

Das Plasmid SKNSEiCbA ist ein Expressionsplasmid. Es enthält in einem SK Blueskript Plasmid Gerüst die vollständige murine cDNA für Calbindin D28k (Calb1), unter der Kontrolle des Ratten NSE (neuron specific enolase) Promotors, des Ratten Insulin II Intron 2 und einer SV40 polyA Sequenz. Konstruiert wurde das Plasmid von Matti Airaksinen und Michael Meyer am MPI Psychiatrie Theoretisches Institut, Martinsried.

3.2.5.3 EGFPN3

Das kommerziell erworbene Plasmid codiert eine Variante des Green Fluorescent Protein mit einer stärkeren Fluoreszenz und höhere Expression in Säugetierzellen. Das Maximum der Anregung liegt bei 488 nm, das Maximum der Emission bei 507 nm. Das Plasmid bietet darüber hinaus auch die Möglichkeit über die MCS ein EGFP-Fusionsprotein zu erzeugen, das auch dem CMV Promotor unterliegt. Die zusätzliche SV40-Polyadenylierung ermöglicht die korrekte Verarbeitung des 3'-Endes der EGFP mRNA.

3.2.5.4 RSV-CR

Das Expressionsplasmid enthält humane cDNA für Calretinin (Calb2) in einem Plasmid Vektor, der Rous-Sarcoma-Virus als Promotor verwendet. Es enthält eine Ratten PreProInsulin pA Sequenz, sowie eine Neomycin-Resistenz. Das Plasmid wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Beat Schwaller, Universität Fribourg, Schweiz.

3.2.6 Vorbereitung der Cover Slips

Die verwendeten 30 mm Cover Slips wurden unter sterilen Bedingungen mit Wasser und Ethanol gewaschen. Anschließend wurden bis zu drei Cover Slips in eine 3 cm Schale transferiert und

erneut zweimalig mit sterilem Wasser gewaschen. Die Schalen wurden nach dem Absaugen bis zum vollständigen Lufttrocknen in der Sterilbank belassen. Auf jeden Cover Slip wurden 100 µl PLL 0,01 % gegeben und die verschlossene Schale für 24 Stunden unter Standardbedingungen bei 37 °C und 9,9 % CO₂ inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit H₂O und erneutem Lufttrocknen waren die Cover Slips einsatzbereit.

Auf jeden Cover Slip wurden 100 µl einer Zell-Medium-Suspension mit zuvor definierter Zellzahl aufgegeben. Nach zwei Stunden im Inkubator unter Standard-Wachstumsbedingungen wurde die Schale mit Medium auf 2 ml Gesamtvolumen gebracht.

3.3 Immunfärbung

Vorbereitend zur Färbung wurden die Zellen auf den Cover Slips zunächst fixiert. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Schale mit PBS gespült. Anschließend wurde für 15 Minuten 4 % PFA aufgegeben. Eingesetzt wurden für eine 3 cm Schale ein Milliliter der PFA-Lösung. Eine Lagerung der fixierten Zellen erfolgte in 0,5 % PFA bei 4 °C in Parafilm verschlossenen Schalen.

Für die Färbung wurden die Cover Slips auf der Färbepalette verteilt und zunächst je mit 200 µl PBS gewaschen. Nach 15 minütiger Behandlung mit der Permeabilisierungslösung wurde für 15 Minuten der Blockpuffer aufgebracht. Eingesetzt wurden je 200 µl pro Well. Die Verdünnung des ersten Antikörpers erfolgte in der Antikörper-Lösung. Je 200 µl wurden über Nacht bei 4 °C eingesetzt.

Am nächsten Tag wurden die Cover Slips zunächst mit PBS gespült und anschließend für 3 x 15 Minuten in je 200 µl PBS gewaschen. Die Cover Slips wurden mit 200 µl der Verdünnung des 2. Antikörpers in Antikörper-Lösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Cover Slips erneut mit PBS gespült und anschließend 3 x 15 Minuten in PBS gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Cover Slips bis zum eindeckeln in PBS belassen.

Jeder Cover Slip wurde mit Wasser gespült und auf einem gereinigten Objektträger mit 5 µl Moviol fixiert. Die Objektträger wurden über Nacht zum Erhärten belassen.

Um ein Austrocknen der Cover Slips zu verhindern, erfolgte jeder Arbeitsschritt und insbesondere die Inkubationen in einer Feuchtkammer.

3.4 BCA Assay

Die allgemeine Bestimmung von Gesamtproteinkonzentrationen erfolgte mittels des kommerziell erworbenen BCA Assay Set von Uptima (Interchim, Montluçon, Frankreich). Verwendet wurde das sensitive Protokoll des Herstellers mit dem Messbereich 500 – 2 µg/ml. Abbildung 2 zeigt die Standardleiter des Protokolls. Das zugrundeliegende Prinzip zur Detektion der Proteine beinhaltet die Protein-vermittelte Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ Ionen in alkalischem Milieu. Das BC Assay Reagenz chelatiert dabei die Cu^+ Ionen und ermöglicht durch eine lila Farbentwicklung die colorimetrische Auswertung.

Das Ausmaß der Farbentwicklung ist dabei direkt proportional zu der Proteinkonzentration (Uptima, o. D.). Die Standard-Verdünnung aus dem 2 mg/ml BSA-Stock erfolgte in einem Proben adaptierten Puffer. Von den letztlich im gleichen Pufferverhältnis vorliegenden Proben wurden in Triplikaten zu je 25 µl in eine 96-Well-Platte gegeben. Gemäß Herstellervorgaben wurden dazu 200 µl/Well des (A+B 50:1) BC Assay Reagenz gegeben.

S1	500
S2	250
S3	125
S4	50
S5	15
S6	5
S7	2
S8	0
	µg/ml

Abbildung 2: Darstellung der BC Assay Standardleiter. Links die Standardränge mit der zugehörigen Konzentration des Gesamtproteins in µg/ml rechts. Dies entspricht gleichzeitig dem vom Hersteller angegebenen linearen Messbereich.

Die Farbentwicklung erfolgte für 30 Minuten bei 60 °C. Nach Abkühlen wurde die optische Dichte bei 562 nm mittels Photospektrometer gemessen.

3.5 Gelelektrophorese

3.5.1 Probenvorbereitung

Das Volumen jeder Probe wurde mit Wasser auf 17,5 µl angepasst und anschließend 2,5 µl 1 M DTT und 5 µl 5x SDS-Ladepuffer zugegeben. Anschließend wurden die Proben bei 95 °C für fünf Minuten erhitzt. Während DTT Disulfid-Brücken reduziert (Cleland, 1964), lagert sich SDS in das

Hitze-denaturierte Protein ein und ermöglicht somit die eigenladungsabhängige Wanderung im Gel und die Auftrennung der Proteine nach Gewicht (Shapiro et al., 1967).

3.5.2 Durchführung der Elektrophorese

Die für die Gelelektrophorese verwendeten Acrylamid-Gele wurden selbst hergestellt. Verwendet wurden 15 % Trenngele. Die Gelzusammensetzung ist nachfolgend in Tabelle 8 aufgeführt.

Angaben für 2 Gele	Sammelgel 4 %	Trenngel 15 %
Wasser	6,1 ml	3,6 ml
Acrylamid 30 %	1,3 ml	7,5 ml
Gel-Puffer		
0,5 M pH 6,8	2,5 ml	
1,5 M pH 8,8		3,75 ml
SDS 5 %	200 µl	300 µl
APS 10 %	50 µl	75 µl
Temed	10 µl	15 µl

Tabelle 8: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für den SDS-Page. Angaben für zwei Gele. Das Trenngel wurde zuerst eingegossen und für 45 Minuten mit Isopropanol abgedeckt. Nach der Aushärtung wurde das Sammelgel eingegossen und der Taschenkamm eingesetzt. Nach weiteren 45 Minuten konnte das Gel bei 4 °C eingelagert werden.

Die innere Kammer der Elektrophorese-Apparatur wurde vollständig mit SDS-Laufpuffer gefüllt, die äußere Kammer bis auf eine Höhe von 2 cm. Neben den Proben wurde zusätzlich 5 µl des Proteinstandards in je eine leere Geltasche gegeben.

Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V bis zu Erreichen des Trenngels durch den führenden Farbstoff des Laufpuffers und anschließend bei 200 V bis zum vollständigen Durchlaufen des Trenngels.

3.5.3 Western Blot

Nach der abgelaufenen Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das getrimmte Trenngel für 15 Minuten in Transferpuffer geschwenkt. Die Membran wurde für zehn Sekunden in Methanol vorbehandelt und nach fünf-minütigem Waschen in Wasser für zehn Minuten in Transferpuffer geschwenkt.

Für das Blotten wurden zwischen je zwei in Transferpuffer angefeuchteten Whatman-Papieren die Membran und das Gel angebracht. Um Artefakte zu vermeiden, wurden etwaige Luftblasen in dem Blot-Sandwich vorsichtig ausgerollt. Entsprechend der angelegten Stromrichtung erfolgte das Blotten bei 260 mA vertikal von oben nach unten für eine Stunde. Bei gleichzeitigem Blotten von zwei Membranen wurde die Dauer auf 90 Minuten angepasst.

Nach dem Blotten wurde die Membran für fünf Minuten in Wasser gewaschen. Vor Auftragen der Antikörper wurden unspezifische Bindestellen der Membran für eine Stunde in Blockpuffer blockiert. Der erste Antikörper wurde verdünnt in Blockpuffer über Nacht bei 4 °C aufgebracht. Am nächsten Tag wurde die Membran mit TBS-T gespült und anschließend 15 Minuten in TBS-T bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach zehn-minütiger Behandlung mit RIPA-Lyse-Puffer wurde die Membran erneut für 15 Minuten mit dem Blockpuffer blockiert. Der zweite, HRP-gekoppelte Antikörper, der den FC-Teil des ersten Antikörpers erkennt, wurde in Blockpuffer verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetragen. Nachdem die Membran anschließend zunächst mit TBS-T gespült wurde, folgte ein 15-minütiger Waschschrift der Membran mit TBS-T. Nachfolgend erfolgte eine Waschung mit RIPA-Lyse-Puffer für zehn Minuten und TBS-T für fünf Minuten.

Die Detektion erfolgte mit dem ECL-Kit. Lösung A und B wurden gemäß Herstellerangaben 1:1 gemischt und für fünf Minuten auf die Membran gegeben. Die Auswertung der Chemilumineszenz und die Bildgebung erfolgte mit der Universal Hood II und der Gel Doc Software Image Lab von BioRad.

3.5.4 Coomassie-Färbung

Für das Anfärben von Protein mittels der Coomassie-Färbung wurde nach der Gelelektrophorese das Sammelgel entfernt und das Trenngel für 30 Minuten in Fixationslösung bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde das Gel für 30 Minuten in der Coomassie Blue Lösung angefärbt. Zur Kontrastentwicklung wurde das Gel in 10 % Essigsäure entfärbt. Initial wurde die Entfärbelösung nach zehn Minuten gewechselt. Eine erste Ablichtung war bereits nach sieben Wiederholungen möglich. Für die maximale Kontrastentwicklung wurde das Gel zusätzlich nach dem letzten Wechsel der Entfärbelösung über Nacht bei 4 °C entfärbt. Die Bildgebung erfolgte mit der Universal Hood II und der Gel Doc Software von BioRad.

Zur Abschätzung der Sensitivität der durchgeführten Coomassie-Färbung wurde eine BSA-Verdünnungsreihe auf einem Gel mitgeführt.

Im Direktvergleich konnte, wie dargestellt in Abbildung 3, unabhängig von der eingesetzten DTT Konzentration von 14 mM sowie 140 mM im Ladepuffer, BSA bis zu einer Menge von 0,1 µg in der Coomassie-Färbung sicher dargestellt werden. Für die in der Gelelektrophorese verwendete 140 mM DTT Variante stellten sich schärfer abgrenzbare Banden dar.

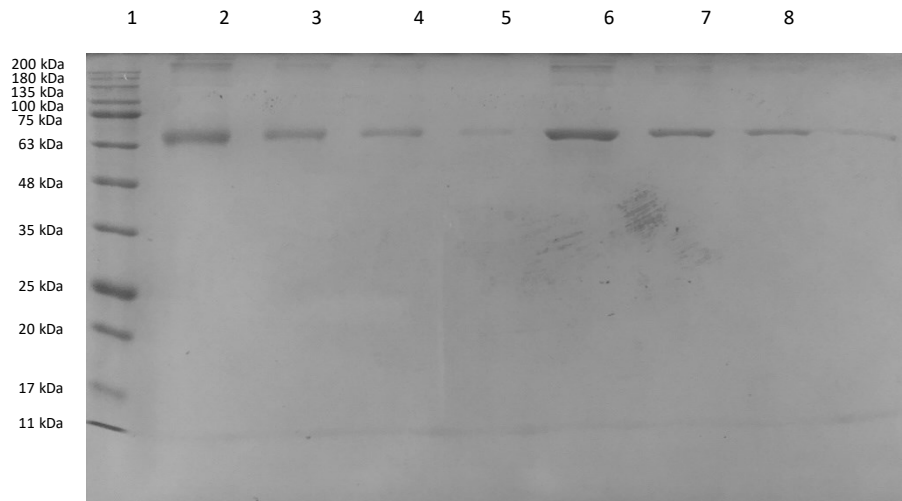


Abbildung 3: Coomassie-Färbung einer BSA-Verdünnungsreihe im SDS-Page. Standard 245 - 11 kDa. BSA 2 µg (1); BSA 1 µg (2); BSA 0,5 µg (3); BSA 0,1 µg (4); BSA 2 µg (5); BSA 1 µg (6); BSA 0,5 µg (7); BSA 0,1 µg (8). (1) – (4) 14 mM DTT Ladepuffer, (5) – (8) 140 mM DTT Ladepuffer.

3.6 Purifikation rekombinanten Calbindins nach Molecular Cloning Third Edition

3.6.1 Protein Expression

Rekombinantes Calbindin sollte in Bakterien Kulturen als Fusionsprotein an Glutathion-S-Transferase (GST) gekoppelt exprimiert werden. Nach Extraktion aus den Zelllysaten erfolgte die Aufreinigung mittels des GST-Tag und letztlich die Abspaltung des rekombinanten Calbindin mittels Thrombin (Sambrook & Russell, 2000).

3.6.1.1 LM1E1 Kultur

Die für die Proteinexpression verwendete Escherichia Coli Kultur basiert auf dem Wildtyp E. coli – Stamm JM109, der mit einem Plasmid zur Expression murinen Calbindin D28k cDNA transformiert wurde. Das Zielprotein ist dabei direkt an ein GST-Tag gekoppelt. Die Struktur des Plasmids fußt auf dem pGEX-4T1 Gerüst. Die Selektion erfolgt via einer Ampicillin-Resistenz.

Von dem bereits etablierten Escherichia Coli Stamm LM1E1 wurde eine Pipettenspitze aus dem Glycerol-Stock zunächst in einer Vorkultur in LB-Medium und 0,1 % Ampicillin bei 37 °C über Nacht angesetzt.

Am Folgetag wurde die Vorkultur unter gleichen Wachstumbedingungen in einer Verdünnung von 1/20 auf 500 ml Gesamtvolumen eingesetzt. Das Wachstum der Kultur wurde mittels der optischen Dichte bei 550 nm erfasst. Die Messung erfolgte in einstündigem Intervall. Bei Erreichen des mid-log-Wachstums bei einer optischen Dichte $> 0,7$ erfolgte die Zugabe von 1 mM IPTG zur Induktion der Expression des rekombinanten Calbindins. Das weitere Wachstum wurde erneut mittels der optischen Dichte kontrolliert.

Der cut-off der optischen Dichte $> 0,7$ und damit das exponentielle Wachstum wurde nach 2,5 Stunden erreicht. Die Inkubation mit 1 mM IPTG erfolgte anschließend für weitere drei Stunden.

Bei Erreichen eines Extinktionswertes $> 1,3$ wurde die Kultur in 50 ml Tubes aliquotiert und bei 4500 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Die Pellets der Kultur wurden in die nachfolgende Purifikation überführt.

3.6.2 Protein Purifikation

3.6.2.1 Vorbereitung Glutathion-Sepharose Resin

Die Aufreinigung erfolgte mittels Glutathion-Sepharose, an die das GST-Calbindin gebunden und dadurch aus dem Proteingemisch zentrifugiert werden konnte. Vor Verwendung wurde die Glutathion-Sepharose im Behälter durch Schwenken resuspendiert und in 15 ml Tubes aliquotiert. Pro 100 ml Bakterienkultur wurden 2 ml Glutathion-Sepharose angesetzt. Das Gemisch wurde bei 500 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand – bestehend aus der Lagerlösung – vorsichtig entfernt und das zehnfache Volumen des Pellets als 4 °C kaltes PBS zugegeben. Das Pellet wurde behutsam resuspendiert und anschließend erneut bei 500 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 1:1 mit kaltem PBS vermischt. Die Suspension wurde bis zur Zugabe des Zelllysates auf Eis gelagert.

3.6.2.2 Vorbereitung Zellextrakt

Das Zellpellet aus je 100 ml Bakterienkultur wurde in 4 ml E.c.-Lyse-Puffer-1 resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. 10 ml des E.c.-Lyse-Puffer-2 wurden zugegeben und die Inkubation für weitere zehn Minuten auf Eis fortgesetzt. Nach der Zentrifugation bei 3000 g und 4 °C für 30 Minuten wurde der Überstand in ein neues Tube transferiert und 1 mM DTT zugegeben.

3.6.2.3 *Aufreinigung Fusionsprotein*

Der Überstand des Zellslysats von 100 ml Bakterienkultur wurde zu 2 ml der 50 % Glutathion-Sepharose-Suspension gegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten vorsichtig geschwenkt und anschließend bei 500 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt. In dreimaliger Wiederholung wurde ungebundenes Fusionsprotein aus dem Glutathion-Sepharose Pellet ausgewaschen. Das Pellet wurde durch das zehnfache Volumen Purifikationspuffer behutsam resuspendiert und anschließend bei 500 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig entfernt und das Pellet für die Fusionsprotein-Eluierung sowie die Fusionsproteinspaltung überführt.

3.6.2.4 *Fusionsprotein-Eluierung*

Zur Ablösung des rekombinanten Calbindin-GST-Fusionsproteins von den Glutathion-Sepharose-Beads wurde das Pellet 1:1 mit Eluierungspuffer für zehn Minuten bei Raumtemperatur vermischt und anschließend bei 500 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal durchgeführt und die Überstände mit dem enthaltenen Fusionsprotein in neue Tubes überführt.

3.6.2.5 *Fusionsproteinspaltung*

Die Spaltung des rekombinanten Calbindins vom GST-Anhang erfolgte mittels Thrombin. Hier wurden 50 u Thrombin je 1 ml PBS in gleichem Volumen zu dem Fusionsprotein-Glutathion-Sepharose Pellet gegeben und vorsichtig vermischt. Nach einer Inkubation von 16 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 500 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Tube transferiert und mit 0,3 mM PMSF versetzt.

Das in der Probe verbliebene Thrombin wurde mittels einer „Thrombin-Trap“ Benzamidin-Säule entfernt. Aus der Säule von 1 ml Volumen wurde zunächst gemäß der Anleitung von Cytiva (Marlborough, Massachusetts, Vereinigte Staaten) mit 5 ml Wasser die Lagerungslösung ausgewaschen und anschließend die Säule mit 5 ml PBS equilibriert. Mit einer 2 ml Spritze wurde 1 ml des Überstands auf die Säule aufgetragen. Die nun frei durchlaufenden Fraktionen wurden zu je 0,5 ml in Tubes gesammelt. Auf die Säule wurden 5 ml PBS und zuletzt 2 ml Hochsalz Puffer aufgegeben.

Die Eluierung der Säule erfolgte mit 10 ml Niedrig-pH-Puffer und anschließender Equilibrierung mit der Lagerlösung. Die bei 4 °C gelagerte Säule konnte somit auch wiederverwertet werden.

3.6.2.6 *Beads Recycling*

Zur Wiederverwendung wurden die, an den Beads verbliebenen, Proteinreste abgelöst. Dreimal wurden die Beads hierzu 1:1 über zehn Minuten mit Glutathion Eluierungspuffer vermischt.

Anschließend wurde das Gemisch bei 500 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert und die Überstände vorsichtig entfernt. Nach der dritten Wiederholung wurde das Pellet in 3 M NaCl bei 4 °C gelagert.

3.6.2.7 Qualitätskontrolle

Proben aus den unterschiedlichen Arbeitsschritten wurden zur Überprüfung im BCA Protein Assay, Western Blot und in der Coomassie-Färbung entnommen. Neben der Kontrolle des rekombinanten Fusionsproteins, sollte die Purifikation hinsichtlich Reinheit, aber auch Verlust beurteilt werden. Die für die Verwendung als ELISA-Standard geeigneten Fraktionen der Benzamidin-Säule wurden in der Coomassie-Färbung auf ihre Reinheit untersucht.

3.6.3 Beeinflussung von Calbindin durch Calcium und EDTA im Gellauf

Zur Untersuchung der im Coomassie, sowie im Western Blot auftretenden Doppelbande in Lysaten TH3.2, sowie SKNSEiCbA transfizierter HN10e Zellen, wurde der Ladepuffer mit 10 mM CaCl₂ oder EDTA versetzt. Aufgetragen wurden 1 µg einer murine Kleinhirn-Lysatprobe, je 20 µg der Zell-Lysate TH3.2 beziehungsweise SKNSEiCbA transfizierter HN10e Zellen sowie 0,1 µg rekombinantes Calbindin. Die Mengenangaben bezogen auf das mittels BCA-Assay bestimmte Gesamtprotein. Verteilt wurden die Proben je auf zwei Gele. Der Western Blot erfolgte mit dem ersten Antikörper CB38 und dem zweiten Antikörper HRP-anti-rabbit-IgG je 1:10.000.

3.7 Calbindin ELISA

Das Verfahren des Enzyme-linked Immunosorbent Assay kurz ELISA wurde erstmalig als Nachweis an Testgefäß-gebundenes Antigen durch Antikörper beschrieben und ermöglichte eine Erfassung mit hoher Sensitivität (Engvall & Perlmann, 1971). Eine weitere Signal-Amplifikation konnte durch die Verwendung mehrerer Antikörper erzielt werden (Butler et al., 1978). Bei einer Vielzahl unterschiedlicher ELISA Verfahrensweisen soll nur näher auf das Sandwich-ELISA Verfahren eingegangen werden, das hier verwendet wurde.

3.7.1 Sandwich-ELISA

Diese Variante des ELISAs verwendet mit Antikörper vorbeschichtete Wells. An diesen Antikörper, den Beschichtungsantikörper bindet das Antigen. Das Antigen wird dann im nachfolgenden Schritt von dem Detektions-Antikörper erkannt. Der Antikörper-Antigen-

Antikörper-Komplex wird durch Zugabe eines Enzyms quantifizierbar. Hier können zwei Varianten unterschieden werden: einerseits kann das Enzym direkt an einen, durch beispielweise Biotinylierung, modifizierten Detektions-Antikörper gebunden werden. Andererseits kann das Enzym, gebunden an einen dritten Antikörper, den Detektionsantikörper erkennen. Die letztere Variante setzt voraus, dass sich die Spezies des Beschichtungsantikörper und des Detektionsantikörper unterscheiden, damit ausschließlich das Fc-Fragment des Detektions-Antikörpers erkannt wird (Crowther, 2000).

Für den Nachweis eines spezifischen Proteins im pg/ml-Bereich aus einer inhomogenen Probe gilt es zunächst die Hintergrundsignale zu minimieren und gleichzeitig die Positiv-Signale zu amplifizieren. Der Beschichtungsantikörper filtert hierfür das zu messende Protein aus der jeweiligen Lösung. Andere Proteine, sowie weitere verunreinigende Substanzen werden in nachfolgenden Waschschrritten entfernt. Die unspezifische Bindung von Proteinen an Plastik variiert und ist auch Abhängig von der Größe des Proteins (Cantarero et al., 1980). Durch vorherige Blockierung mit BSA soll diese unspezifische Bindung durch vollständige Sättigung des Materials der Well auf ein Minimum reduziert werden. Ionische Bindungen können durch die Verwendung von Detergenzien wie Tween 20 oder Triton X-100 vermieden werden (Hansted et al., 2011).

Nach den Waschungen liegen ausschließlich die Antikörper-Antigen-Komplexe, sowie etwaige unbesetzte Antikörper-Schnittstellen vor. Die Erkennung des Antigens durch den Detektionsantikörper muss nun an einem anderen Epitop erfolgen. In diesem Ansatz wurde ein monoklonaler Beschichtungsantikörper mit einem polyklonalen Detektionsantikörper gepaart. Während sich der Beschichtungsantikörper ausschließlich gegen dasselbe Epitop richtet, bietet die Vielfalt des polyklonalen Antikörpers – wenngleich eines anzunehmenden höheren Hintergrundes – trotzdem eine Antigen-Bindung.

Die Amplifizierung des Signals erfolgt durch das jeweilige Enzym. Wird ein markierter Detektions-Antikörper verwendet, kann das Enzym direkt an den Antikörper gebunden werden und zeigt mit dem entsprechenden Substrat ein Signal an. Die alternative Verwendung von Enzym-gepaarten-Antikörpern, die sich gegen das Fc-Fragment der Immunglobuline einer Spezies richten, ermöglichen eine breitere und damit ökonomischere Anwendung.

3.7.2 Vorversuch Protokoll

Im Rahmen der Etablierung des ELISAs kamen unterschiedliche Abwandlungen des Protokolls zum Einsatz (Tabelle 9). Das erste Test-Protokoll basierte in weiten Teilen auf der ELISA-

Anleitung von Thermo Scientific (Thermo Scientific, 2010) und zeichnete sich durch kürzere Inkubationszeiten, sowie ein Phosphat-Puffer-System aus. Die entsprechend vom späteren finalen Protokoll abweichend verwendeten Puffer-Zusammensetzungen sind in Tabelle 10 vollständig aufgeführt. Die Anzahl der Waschschrte blieb unverändert, erste Waschungen erfolgten mit nur 200 µl/Well, sowie auf einem Orbitalschüttler. Inkubationsschritte erfolgten stets unter Folienabdeckung und Lichtausschluss.

3.7.3 Erprobung der Konzentrationen des ersten und zweiten Antikörpers

Das verwendete Antikörperpaar des monoklonalen Antikörpers 300 als Beschichtungsantikörper und des polyklonalen Antikörpers CB38 als Detektionsantikörper wurde hinsichtlich der Spezifität unterschiedlicher Proben im Western Blot untersucht. Neben rekombinatem Calbindin sowie Kleinhirn-Lysat wurden auch Zell-Lysate TH3.2, SKNSEiCbA, EGFPN3 oder RSV-CR transfizierter Zellen untersucht. Die einzusetzende Antikörperkonzentration wurde durch Verdünnungsreihen erprobt. Verglichen wurde hierbei die Signal-to-Noise-Ratio der 450 nm Messwerte.

Die Beschichtung erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur, gefolgt von einer Blockierung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Der Blockierungspuffer enthielt hier zusätzlich 0,05 % Tween 20. Die Bindung der Probe an den Beschichtungsantikörper erfolgte in Blockierungspuffer ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Antikörper-Verdünnung erfolgte in Waschpuffer mit 0,4 % BSA und wurde zu je einer Stunde auf der Platte inkubiert.

Die erste Überprüfung des Testsystems erfolgte mit einer Protein-Konzentration von 1000 ng/ml gegen den Nullwert. Eingesetzt wurden variierende Konzentrationen des Beschichtungsantikörpers. Der zweite Antikörper CB38 wurde in einer Verdünnung von 1:1000, der dritte Antikörper HRP-anti-rabbit-IgG in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Die Erprobung geeigneter Antikörper-Konzentrationen erfolgte zunächst orientiert an den Empfehlungen des Herstellers. Die eingesetzten Antikörperkonzentrationen wurden nachfolgend isoliert angepasst. Modifiziert wurde zunächst der Beschichtungsantikörper. Anschließend wurde der zweite Antikörper variiert bei nun eingesetztem Beschichtungsantikörper in einer Verdünnung von 1:400, die sich initial als geeigneteste Konzentration zeigte. Diese Testungen erfolgten mit 100 ng/ml rekombinatem Protein.

In einem Kreuzvergleich wurden die Antikörper-Konzentration des Beschichtungsantikörper gegen die Konzentrationen des zweiten Antikörpers aufgetragen, jeweils im Vergleich von 100 pg/ml rekombinanten Proteins gegen den Nullwert. In diesem Ansatz entsprach das

Protokoll weitestgehend der finalen Version, lediglich abweichend davon wurde der zweite Antikörper für zwei Stunden inkubiert.

Der dritte Antikörper wurde als Letztes optimiert und nach vorherig erwähntem Protokoll und adaptierten Waschvolumen von 300 µl/Well in den Verdünnungen 1:1000, 1:2000 und 1:4000 abgebildet.

Eine abschließende Anpassung des Protokolls erfolgte zur ökonomischen Optimierung. Im finalen Protokoll und Puffer-System wurde in einem orientierenden Ansatz nach erfolgter Beschichtung die verwendete Verdünnung des monoklonalen Antikörpers 300 in Eppendorff-Gefäße transferiert und die somit recycelten Verdünnungen in einem neuen ELISA zur Beschichtung eingesetzt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe des Beschichtungsantikörper durchgeführt.

Die maximale Lagerungszeit der abgedeckten, beschichteten ELISA-Platte bei 4 °C wurde mittels in Eppendorff-Gefäßen bei 4 °C gelagerten Antikörper-Verdünnungen, die zur Beschichtung verwendet wurden, abgeschätzt.

3.7.4 Blockierung und Puffer

Basierend auf dem Protokoll mit abweichender Inkubationszeit des zweiten Antikörpers wurden unterschiedliche Blockierungspuffer getestet. Als Basis wurde der 2 % BSA-Blockierungspuffer mit einem 5 % Milchpulver-Puffer verglichen, sowie gegen 10 % Seren von Schwein, Pferd, Schaf und Ziege abgebildet. Verwendet wurden für diese Ansätze der Beschichtungsantikörper in einer Verdünnung von 1:400, sowie der zweite und dritte Antikörper in einer Verdünnung von je 1:2000.

Verglichen wurde der Hintergrund einer kürzeren Inkubation der Antikörper mit zwei Stunden der Beschichtung bei Raumtemperatur und je einer Stunde des zweiten und dritten Antikörpers mit einer Beschichtung über Nacht bei 4 °C und einer Inkubation des zweiten Antikörpers für zwei Stunden und des dritten Antikörpers für eine Stunde.

Die Antikörperverdünnung wurde mit 0,4 % BSA, 2 % BSA, sowie 5 % Milchpulver getestet.

3.7.5 Relevanz von Calcium

Bei hoher intra- und inter-Test-Varianz, nicht messbarem Standardprotein, aber weiterhin detektierbaren Signalen in Kleinhirn-Lysaten, sowie problemloser Anwendung der Antikörper im

Western Blot, erfolgten gezielte Versuche zur Notwendigkeit der Anwesenheit von Calcium-Ionen. Die Bindung von Antikörpern an Calcium-bindende Proteine ist bekanntermaßen abhängig von dem Calcium-Bindungsstatus und damit von der Anwesenheit von Calcium-Ionen (Winsky & Kuznicki, 1996). Verglichen wurde daher ein neu angesetzter Phosphatpuffer mit einem zusätzlich mit 1 mM CaCl₂ versetzten Puffer. Im Zuge der weiteren Puffer Anpassung, sowie des Umstiegs auf das Tris-Puffer-System bei ausfallenden Calcium-Phosphat-Salzen wurde die Tween 20 Konzentration erhöht.

Version 1 <i>Initiale Testung, Erstanpassung 1. Antikörper</i>	Version 2 <i>Anpassung 1. Antikörper, Auslassversuch</i>
➤ 1. Ak MAb "300" in Beschichtungspuffer 100 µl/Well 2 h RT	➤ 1. Ak MAb "300" in Beschichtungspuffer 100 µl/Well 2 h RT
➤ 3 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 200 µl/Well bei RT	➤ 3 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 200 µl/Well bei RT
➤ 300 µl/Well Blockierungspuffer für 1 h RT	➤ 300 µl/Well Blockierungspuffer bei 4 °C ü.N.
➤ Probe, Verdünnung in Blockpuffer, 100 µl/Well 1 h bei RT	➤ Probe, Verdünnung in Blockpuffer, 100 µl/Well 1 h bei RT
➤ 3 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 200 µl/Well bei RT	➤ 3 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 200 µl/Well bei RT
➤ 2. Ak Pab "Cb38" 1:100 in Waschpuffer + 0,4 % BSA 100 µl/Well für 1 h bei RT	➤ 2. Ak Pab "Cb38" 1:100 in Waschpuffer + 0,4 % BSA 100 µl/Well für 2 h bei RT
➤ 3 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 200 µl/Well bei RT	➤ 3 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 200 µl/Well bei RT
➤ 3. Ak HRP-anti-Rabbit-IgG 1:2000 in Waschpuffer + 0,4 % BSA 100 µl/Well für 1 h bei RT	➤ 3. Ak HRP-anti-Rabbit-IgG 1:2000 in Waschpuffer + 0,4 % BSA 100 µl/Well für 1 h bei RT
➤ 6 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 200 µl/Well bei RT	➤ 6 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 200 µl/Well bei RT
➤ TMB 100 µl/Well für 30 min bei RT	➤ TMB 100 µl/Well für 30 min bei RT
➤ 2 M Schwefelsäure 100 µl/Well	➤ 2 M Schwefelsäure 100 µl/Well
➤ Messung bei 450 nm	➤ Messung bei 450 nm
Version 3 <i>Anpassung 2. Antikörper</i>	Version 4 <i>Kreuzanpassung Antikörper, Auswahl Blockpuffer</i>
➤ 1. Ak MAb "300" 1:400 in Beschichtungspuffer 100 µl/Well 2 h RT	➤ 1. Ak MAb "300" in Beschichtungspuffer 100 µl/Well 4 °C ü.N.
➤ 3 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 200 µl/Well bei RT	➤ 3 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 200 µl/Well bei RT
➤ 300 µl/Well Blockierungspuffer bei 4 °C ü.N.	➤ 300 µl/Well Blockierungspuffer 2,5 h RT
➤ Probe, Verdünnung in Blockpuffer, 100 µl/Well 1h bei RT	➤ Probe, Verdünnung in Blockpuffer, 100 µl/Well 4 °C ü.N.
➤ 3 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 200 µl/Well bei RT	➤ 3 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 200 µl/Well bei RT

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ➤ 2. Ak Pab "Cb38" in Waschpuffer + 0,4 % BSA 100 µl/Well für 2 h bei RT ➤ 3 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 200 µl/Well bei RT ➤ 3. Ak HRP-anti-Rabbit-IgG 1:2000 in Waschpuffer + 0,4 % BSA 100 µl/Well für 1 h bei RT ➤ 6 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 200 µl/Well bei RT ➤ TMB 100 µl/Well für 30 min bei RT ➤ 2 M Schwefelsäure 100 µl/Well ➤ Messung bei 450 nm | <ul style="list-style-type: none"> ➤ 2. Ak Pab "Cb38" in Waschpuffer + 0,4 % BSA 100 µl/Well für 2 h bei RT ➤ 3 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 200 µl/Well bei RT ➤ 3. Ak HRP-anti-Rabbit-IgG 1:2000 in Waschpuffer + 0,4 % BSA 100 µl/Well für 1 h bei RT ➤ 6 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 200 µl/Well bei RT ➤ TMB 100 µl/Well für 30 min bei RT ➤ 2 M Schwefelsäure 100 µl/Well ➤ Messung bei 450 nm |
|--|--|

Version 5

Anpassung 3. Antikörper

- 1. Ak MAb "300" 1:400 in Beschichtungspuffer 100 µl/Well 4 °C ü.N.
- 3 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 300 µl/Well bei RT
- 300 µl/Well Blockierungspuffer 2,5 h RT
- Probe, Verdünnung in Blockpuffer, 100 µl/Well 4 °C ü.N.
- 3 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 300 µl/Well bei RT
- 2. Ak Pab "Cb38" 1:2000 in Blockpuffer 100 µl/Well für 2 h bei RT
- 3 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 300 µl/Well bei RT
- 3. Ak HRP-anti-Rabbit-IgG in Blockpuffer 100 µl/Well für 1 h bei RT
- 6 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 300 µl/Well bei RT
- TMB 100 µl/Well für 30 min bei RT
- 2 M Schwefelsäure 100 µl/Well
- Messung bei 450 nm

Version 6

Ausschluss Erkennung Calretinin

- 1. Ak MAb "300" 1:400 in Beschichtungspuffer 100 µl/Well 4 °C ü.N.
- 3 x 5min Waschung mit Waschpuffer 300 µl/Well bei RT
- 300 µl/Well Blockierungspuffer 2,5h RT
- Probe, Verdünnung in Blockpuffer, 100 µl/Well 4 °C ü.N.
- 3 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 300 µl/Well bei RT
- 2. Ak Pab "Cb38" 1:2000 in Blockpuffer 100 µl/Well für 1,5 h bei RT
- 3 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 300 µl/Well bei RT
- 3. Ak HRP-anti-Rabbit-IgG 1:1000 in Blockpuffer 100 µl/Well für 1 h bei RT
- 6 x 5 min Waschung mit Waschpuffer 300 µl/Well bei RT
- TMB 100 µl/Well für 30 min bei RT
- 2 M Schwefelsäure 100 µl/Well
- Messung bei 450 nm

Version 7

Anpassung Inkubationszeiten

- 1. Ak MAb "300" 1:400 in Beschichtungspuffer 100 µl/Well 4 °C ü.N.
- 3 x Waschung mit Waschpuffer 300 µl/Well bei RT
- 300 µl/Well Blockierungspuffer 2,5 h RT
- Probe, Verdünnung in Blockpuffer, 100 µl/Well 4 °C ü.N.
- 3 x Waschung mit Waschpuffer 300 µl/Well bei RT

Version 8

Finales Protokoll der Vorversuche

- 1. Ak MAb "300" 1:400 (1:800) in Beschichtungspuffer 100 µl/Well 4 °C ü.N.
- 3 x Waschung mit Waschpuffer 300 µl/Well bei RT
- 300 µl/Well Blockierungspuffer 2,5 h RT
- Probe, Verdünnung in Verdünnungspuffer, 100 µl/Well 4 °C ü.N.
- 3 x Waschung mit Waschpuffer 300 µl/Well bei RT

➤ 2. Ak Pab "Cb38" 1:2000 in Blockpuffer 100 µl/Well für 1,5 h bei RT	➤ 2. Ak Pab "Cb38" 1:2000 in Verdünnungspuffer 100 µl/Well für 1,5 h bei RT
➤ 3 x Waschung mit Waschpuffer 300 µl/Well bei RT	➤ 3 x Waschung mit Waschpuffer 300 µl/Well bei RT
➤ 3. Ak HRP-anti-Rabbit-IgG 1:1000 in Blockpuffer 100 µl/Well für 1 h bei RT	➤ 3. Ak HRP-anti-Rabbit-IgG 1:1000 in Verdünnungspuffer 100 µl/Well für 1 h bei RT
➤ 6 x Waschung mit Waschpuffer 300 µl/Well bei RT	➤ 6 x Waschung mit Waschpuffer 300 µl/Well bei RT
➤ TMB 100 µl/Well für 30 min bei RT	➤ TMB 100 µl/Well für 30 min bei RT
➤ 2 M Schwefelsäure 100 µl/Well	➤ 2 M Schwefelsäure 100 µl/Well
➤ Messung bei 450 nm	➤ Messung bei 450 nm

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten ELISA-Protokolle.

	Beschichtungspuffer	Waschpuffer	Blockierungspuffer	Verdünnungspuffer
V1	0,2 M NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃ , pH 9,4	0,1 M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , 0,15 M NaCl, pH 7,2	0,1 M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , 0,15 M NaCl, pH 7,2	0,1 M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , 0,15 M NaCl, pH 7,2
V2		+ 0,05 % v/v Tween 20	+ 0,05 % v/v Tween 20	+ 0,05 % v/v Tween 20
V3		+ 0,05 % v/v Tween 20	+ 2 % w/v BSA	+ 0,4 % w/v BSA
V4				
V5				0,1 M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , 0,15 M NaCl, pH 7,2
V6				+ 0,05 % v/v Tween 20
V7				+ 2 % w/v BSA
V8		0,1 M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , 0,15 M NaCl, 1 mM CaCl ₂ , pH 7,2	0,1 M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , 0,15 M NaCl, 1 mM CaCl ₂ , pH 7,2	0,1 M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , 0,15 M NaCl, 1 mM CaCl ₂ , pH 7,2
		+ 0,05 % v/v Tween 20	+ 2 % w/v BSA	+ 2 % w/v BSA
final	0,2 M NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃ , pH 9,4	25 mM Tris/HCl, 0,15 M NaCl, 1 mM CaCl ₂ , pH 7,2	25 mM Tris/HCl, 0,15 M NaCl, 1 mM CaCl ₂ , pH 7,2	25 mM Tris/HCl, 0,15 M NaCl, 1 mM CaCl ₂ , pH 7,2
		+ 0,1 % v/v Tween 20	+ 2 % w/v BSA	+ 0,05 % v/v Tween 20 + 2 % w/v BSA

Tabelle 10: Übersicht der eingesetzten Puffer in den ELISA-Protokollen.

3.7.6 Der finale Calbindin ELISA

3.7.6.1 Puffer

Die verwendeten Carbonat- und Tris-Puffer wurden aus höher molaren Stock-Lösungen angesetzt. Die Stock-Puffer-Lösungen waren bei 4 °C mehrere Monate haltbar. Die Zugabe von Tween 20 und BSA zu den jeweiligen Puffern erfolgte erst am Tag des Tests. Die Lagerung der Test-Puffer für die Dauer des Tests erfolgte ebenfalls bei 4 °C.

3.7.6.2 *Pipettierschritte*

Die Zugabe der entsprechenden Lösungen erfolgt durch eine 8-Kanal Multipipette. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden die Pipettenspitzen nicht an der Wand der Well angesetzt und kamen somit nicht mit deren Inhalt in Berührung.

Das Auftragen der Proben erfolgte mit einer Einzelpipette. Hierbei wurde die Pipette behutsam an der Wand der Well angesetzt.

Um Austrocknungseffekte zu vermeiden, wurde zügig pipettiert. Etwaige, durch BSA oder Tween 20 bedingte, Luftblasen konnten durch vorsichtige Luftstöße der Pipette reduziert werden.

3.7.6.3 *Waschschritte*

In den Waschschritten wurden die Wells mit je 300 µl Waschpuffer gefüllt. Anschließend wurde die Platte schwunghaft entleert und auf Zellstoff oder Papiertüchern sorgfältig abgetropft. Bei der Auswahl der Trocken-Tücher wurde darauf geachtet, staubendes Material oder die Kontamination durch Fasern zu vermeiden.

Waschschritte erfolgten zwischen jedem Arbeitsschritt. Wiederholt wurde die Waschung dabei regulär dreimal, sowie vor Zugabe des Substrates insgesamt sechsmal. Eine Ausnahme bildete lediglich die Probenaufgabe nach der Blockierung, bei der keine Waschung notwendig war.

3.7.6.4 *Beschichtung*

Im ersten Schritt wird der monoklonale Antikörper 300 (Swant Inc., Burgdorf, Schweiz) 1:800 in Beschichtungspuffer verdünnt und jede Well mit 100 µl für mindestens 20 Stunden bei 4 °C inkubiert. Der für die Beschichtung verwendete Carbonat-Puffer besitzt einen alkalischen pH-Wert (pH = 9,4), für diese Milieu bereits die Bindung von Antikörper an Plastik beschrieben wurde (Catt & Tregear, 1967). Die Verwendung eines alkalischen Beschichtungspuffers ist dabei in vielen ELISA Protokollen zu finden.

3.7.6.5 *Blockierung*

Für die Blockierung wurden die Wells mit 300 µl Blockierungspuffer gefüllt und die Platte für 2,5 Stunden unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert.

3.7.6.6 *Proben und Standard*

Die Aliquots des rekombinanten Calbindin-Standards wurden bei -80 °C gelagert. Vor Verwendung wurden alle Proben zehn Minuten bei 4 °C und 15.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Verdünnung als Reihenverdünnung in Verdünnungspuffer angefertigt. Die Proben wurden ebenfalls in Verdünnungspuffer verdünnt. Für sehr hohe Verdünnungsansätze wurde als Basis ein 10 x Verdünnungspuffer eingesetzt.

Je 100 µl wurden pro Well als Triplikate der Standard- oder Probenverdünnung aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Triplikate ausschließlich aus Verdünnungspuffer als Blank-Wert mitgeführt. Die Inkubation erfolgt bei 4 °C über Nacht unter Lichtausschluss.

3.7.6.7 Antikörper

Der für die Detektion verwendete polyklonale Antikörper CB38 (Swant Inc., Burgdorf, Schweiz) sowie der Sekundär-Antikörper HRP-anti-Rabbit-IgG (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Vereinigte Staaten) wurden in Verdünnungspuffer verdünnt. Die Inkubation mit dem Detektionsantikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:2000 für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur. Nach dreimaliger Waschung wurden die Wells mit dem Sekundärantikörper in einer 1:1000 Verdünnung für eine Stunde inkubiert.

3.7.6.8 Farbreaktion

Nach sechsmaligem Waschen mit Waschpuffer wurde für die Farbreaktion 100 µl TMB Ultra in jede Well gegeben. Die für den Test benötigte Menge Substrat wurde vor Verwendung im Dunkeln auf Raumtemperatur equilibriert. Die Farbentwicklung erfolgt für 30 Minuten unter Lichtausschluss, wobei die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 2 M Schwefelsäure gestoppt wurde.

3.7.6.9 Messung

Die Absorptions-Messung erfolgt bei 450 nm mittels Spektrophotometer. Zur Korrektur von Materialunregelmäßigkeiten wurde zusätzlich bei 550 nm gemessen. Für die Konzentrationsberechnung wurde die Differenz des 450 nm und des 550 nm - Wertes gebildet und davon der Material-korrigierte Blank-Wert abgezogen.

$$M_{CB} = (M(450 \text{ nm}) - M(550 \text{ nm})) - (BLK(450 \text{ nm}) - BLK(550 \text{ nm}))$$

Formel 2: Berechnung der für die Konzentrationsberechnung des ELISA verwendeten Absorptionswerte. Von der Differenz der 450 nm und der 550 nm Messwerte wird die Differenz der 450 nm und 550 nm Hintergrundwerte abgezogen.

Auf einer doppelt logarithmierten Skalierung wurden die Messwerte M_{CB} der Standardleiter auf der y - Achse gegen die Konzentrationswerte auf der x - Achse abgebildet. Anhand eines Polynom 3. Grades als Standardkurve wurden die Konzentrationen der Proben berechnet.

Um Austrocknungseffekte zu verhindern, sowie Kontaminationen zu vermeiden, wurde die ELISA-Platte für jeden Inkubationsschritt mit einer Folie abgedeckt. Die Inkubationen erfolgten unter Licht-Ausschluss.

3.7.7 Statistische Validierung

Zur Validierung des beschriebenen ELISA Verfahrens sollten zunächst die Standarddränge der Standardleiter signifikant von einander unterschieden werden und insbesondere ein Korrekturbedingter Informationsverlust ausgeschlossen werden. Im Weiteren wurde die Intra- und Inter-Test-Varianz anhand der eingesetzten Triplikate bestimmt.

Die Standardleiter wurde hinsichtlich der Unterscheidung der unterschiedlichen Standarddränge statistisch untersucht. Verwendet wurden die Daten von 79 durchgeführten ELISA-Testungen. Die Varianzhomogenität wurde mittels des Levene-Tests für jedes der Datensets individuell ausgeschlossen. Als Testverfahren wurde der Mediantest gewählt. Zusätzlich zu der Boxplot-basierten grafischen Auswertung erfolgte dabei zu jedem Standardrang ein Paarvergleich in Bonferroni-Korrektur. Als geprüfte Nullhypothese wurde eine Gleichwertigkeit der Standarddränge angenommen. Das korrigierte Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ angesetzt.

Die Berechnung der Intra-Test-Varianz erfolgte mit den errechneten Konzentrationswerten von 525 Triplikaten – wobei für jedes Triplikat der konzentrationsunabhängige Variationskoeffizient berechnet wurde – unter Einbeziehung der untersuchten Proben sowie der Standardwerte. Die getesteten Negativ-Proben wurden in die Berechnung der Gesamtvarianz nicht miteingeschlossen. Ein relevanter Einfluss der Position der jeweiligen Probe auf der Testplatte sollte mittels einer Kovarianzanalyse mittels ANCOVA ausgeschlossen werden.

Die Inter-Test-Varianz wurde aus den Variationskoeffizienten von 21 verschiedenen Proben bestimmt, die jeweils in mindestens zwei unterschiedlichen und unabhängigen Test-Ansätzen bestimmt wurden.

3.7.8 Ausschluss der Erkennung anderer Calcium-bindender Proteine

Die Möglichkeit der Erkennung anderer, Struktur-ähnlicher Proteine, insbesondere anderer Calcium-bindender Proteine sollte ausgeschlossen werden.

3.7.8.1 Ausschluss einer Erkennung von Calretinin

HN10e Zellen einer Generation wurden auf drei 10 cm Schalen zu je 2×10^6 Zellen ausgesät und entsprechend des MACSfectin Protokolls transfiziert. Eingesetzt wurden die Plasmide TH3.2 (Calbindin), RSV-CR (Calretinin) und EGFPN3 (EGFP). EGFP wurde als unspezifisches Protein ähnlicher Größe zu den eingesetzten CaBP aufgrund der visuellen Nachweisbarkeit verwendet. Die drei unterschiedlichen Transfektion-Ansätze wurden zwei Tage nach der Transfektion mit NP-40-Lyse Puffer nach zweimaligem Waschen mit PBS auf Eis lysiert. Eingesetzt wurde 1 ml Lyse-Puffer je 10 cm Schale. Das Lysat sowie das Medium wurden bei 10.000 g und 4 °C für zehn

Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden jeweils sowohl Pellet als auch Überstand bei -80 °C eingelagert.

Die Proben aus dem Transfektions-Ansatz wurden im BCA-Protein Assay hinsichtlich ihrer Proteinkonzentration getestet und im ELISA V6-Protokoll untersucht.

3.7.8.2 *Untersuchung von Mausorganen*

Die Gewebe von neun Tieren des Stamms Calb1^{tm1Mpin} mit dem genetischen Hintergrund C57Bl/6N im Alter von zwei bis zwölf Monaten wurden untersucht. Neben Wildtyp (wt/wt) Tieren, wurden auch heterozygote (wt/ko) sowie ein homozygotes (ko/ko) Knockout-Tier betrachtet. Hierdurch sollte die Spezifität des ELISA hinsichtlich Kreuzreaktivitäten mit anderen Proteinen des Gewebelysats stringent untersucht werden.

Die Organe, die nach der Entnahme sofort in Flüssigstickstoff eingefroren wurden, wurden mit 1 ml RipaLysePuffer je 40 mg Gewebe versetzt. Gebettet auf Eis wurden die Proben für zehn Sekunden mit dem Polytron Kinematica auf Stufe 5, beziehungsweise dem Ultra Turrax T25 homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden bei -80 °C eingefroren.

Nach jeder Probe wurde der Homogenizer für zweimal 30 Sekunden in 200 ml H₂O gespült.

3.8 Calbindin Halbwertszeit

Die Halbwertszeit von Calbindin in vitro ist bislang nicht beschrieben worden. Zum Ausschluss zufallsbedingter Verfälschungen der gemessenen Calbindin-Konzentrationen im Zellbehandlungsexperiment sollte daher zuerst die Halbwertszeit im Zellmedium bei 37 °C bestimmt werden.

Die Messung der Halbwertszeit erfolgte bei den allgemeinen Testbedingungen durch die Zugabe von 1 ng/ml rekombinanten Calbindins in phenolrotfreiem Behandlungsmedium. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 10 % CO₂. Eingesetzt wurden 500.000 HN10e Zellen in 1,5 ml Medium. Im Falle der vitalen Zellen, als auch der lysierten Zellen erfolgte die Inkubation in 3 cm Schalen. Die Lyse erfolgte durch 1 % Triton X-100 versetztes Medium.

Die Halbwertszeit im Medium wurde bei gleichem Verhältnis – 1 ng/ml rekombinanten Calbindin und 1,5 ml Medium – in Eppendorff-Gefäßen getestet.

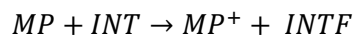
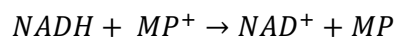
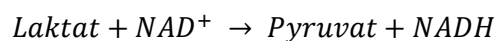
Die Probenentnahme von je 0,5 ml erfolgte zwischen 0 und 24 Stunden in zwölf Stunden-Schritten und anschließend bis 72 Stunden in 24 Stunden-Schritten. Bis zur Testung wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

3.9 LDH Assay

3.9.1 Prinzip

Das Enzym Laktatdehydrogenase ist ein 35 kDa großes, ubiquitär vorkommendes, intrazelluläres Protein, das aus vier Sub-Einheiten besteht, die in zwei unterschiedlichen Varianten, H und M, auftreten können (Khan et al., 2020). Folglich ergeben sich fünf mögliche unterschiedliche Isoenzyme, deren Auftreten Zelltyp-abhängig ist: so enthält das Myokard beispielsweise vorwiegend LDH-1 (H₄), die Hepatozyten dagegen LDH-5 (M₄) (Heinrich et al., 2014). Auch hinsichtlich des pH-Optimums und der Reaktionsgeschwindigkeit bestehen Unterschiede zwischen den Isoenzymen (Gay et al., 1968).

Als Standard wurde die kommerziell erworbene Laktatdehydrogenase aus Kaninchen-Skelettmuskulatur (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) verwendet, in der laut Herstellerangaben hauptsächlich M₄, sowie kleinere Mengen M₃H und M₂H₂ enthalten seien. Entsprechend der Bezeichnung des Herstellers für dieses LDH-Gemisch, wird es auch nachfolgend als „Typ XI“ bezeichnet. Die gemessene Enzym-Aktivität der Proben wurde somit auf „Typ XI“ standardisiert und als solche wiedergegeben.



Formel 3: Grundprinzip des LDH Assays. In Gegenwart von NAD⁺ als Elektronenakzeptor wird Laktat durch die Laktatdehydrogenase in Pyruvat umgesetzt. NADH dient als Elektronendonator an PMS. Die Elektronen von PMS werden letztlich an INT abgegeben und dieses in die reduzierte Formazan Struktur umgewandelt (Nachlas et al., 1960).

Das Reaktionsprinzip basiert auf der Bildung einer Formazan-Struktur und dadurch bedingter Farbentwicklung und ist dabei schneller als der ⁵¹Cr-Chrom-Assay (Korzeniewski & Callewaert, 1983). Das Enzym Laktatdehydrogenase katalysiert die Reaktion von L-Laktat und NAD⁺ zu Pyruvat und NADH/H⁺. Dabei weist die Laktatdehydrogenase eine Enantioselektivität auf (Holbrook et al., 1975). Das im Menschen und anderen Säugetieren vorkommende Enzym erkennt ausschließlich das links-drehende Racemat L-Laktat als Substrat (Holbrook et al., 1975; Simon et al., 1989). D-Laktat als Substrat der D-Laktatdehydrogenase wird hingegen

beispielsweise in Wirbellosen gefunden. PMS dient als Elektronenakzeptor, das die Elektronen von NADH/H⁺ übernimmt und nachfolgend an INT abgibt. INT wird somit zu seiner reduzierten Formazan-Struktur umgesetzt, was sich makroskopisch durch eine intensive rot-Färbung mit einem Absorptionsmaximum bei 490 nm zeigt (Nachlas et al., 1960).

Vor dem Test wurden alle eingesetzten Proben bei 15.000 g und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Die Verdünnung der Proben und der Standardleiter erfolgten mit dem selben Puffer beziehungsweise Medium, wobei abweichende Konzentrationen der eingesetzten Lösungen und insbesondere auch der Triton X-100 Konzentration ausgeglichen wurden. 50 µl der Proben und Standard-Verdünnung wurden in Triplikaten auf der 96-Well-Platte aufgetragen. Für den Blank-Wert wurde ausschließlich der Konzentrations-angeglichene Puffer, beziehungsweise das Medium eingesetzt.

Jede Well wurde mit 50 µl 2 x LDH Puffer versetzt und die Platte anschließend abgedeckt und unter Lichtabschluss bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1 M Essigsäure je Well gestoppt.

Die Absorptions-Messung erfolgte bei 490 nm mittels Photospektrometer. Von diesem Messwert wurde der Blank-Wert abgezogen.

$$M_{LDH} = M(490 \text{ nm}) - BLK(490 \text{ nm})$$

Formel 4: Hintergrundkorrektur der Messwerte im LDH Assay. Berechnung der für die Konzentrationsbestimmung verwendeten Werte. Von den 490 nm Messwerten werden die jeweiligen Hintergrundwerte subtrahiert.

Auf einer doppelt logarithmierten Skalierung wurden die Messwerte M_{LDH} der Standardleiter auf der y - Achse gegen die Konzentrationswerte auf der x - Achse abgebildet. Anhand einer linearen Funktion als Standardkurve wurden die Konzentrationen der Proben berechnet.

3.9.2 Erprobung LDH Assay

Erste Versuche erfolgten nach dem Protokoll von Chan et al. (2013), das nachfolgend als Chan-Protokoll bezeichnet wird. Im Verlauf wurde dieses im Rahmen der Etablierung des LDH Assays modifiziert und validiert. Insgesamt sechs unterschiedliche Protokolle wurden hinsichtlich der verwendeten Substanzen, des Puffer-pH-Wertes, sowie der eingesetzten Konzentrationen und Konzentrationsverhältnisse verglichen. Die unterschiedlichen Protokolle sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Festgelegt wurde, dass der Assay auf der Umwandlung von L-Laktat und NAD⁺ basieren und INT und PMS verwendet werden sollten. Als Stopp-Lösung wurde Essigsäure eingesetzt.

Ausgehend von Lysaten von HN10e-Zellen wurde vor der Etablierung der Standardleiter die detektierbare Zellzahl/ml als Maß der Sensitivität angenommen. Die verwendeten Zellen wurden in einer 6 cm Schale mit 1,5 ml des 1 % Triton X-100 haltigen phenolrotfreien Behandlungsmedium lysiert. Die beigefügte Menge FBS wurde aufgrund von Testinteraktionen und zur Gewährleistung eines langsameren Zellwachstums auf 1 % reduziert eingesetzt.

Neben dem Chan-Protokoll kam auch das Protokoll von Kaja et al. (2015) zum Einsatz. Bei ähnlichem Verhältnis von Laktat zu NAD⁺ sowie Laktat zu INT verwendeten Kaja et al. ungefähr die doppelten Konzentrationen. In den ersten vergleichenden Ansätzen wurden die Puffer mit dem Racemat DL-Laktat angesetzt. Die eingesetzte DL-Laktat-Racemat Menge wurde verdoppelt, um eine entsprechende L-Laktat Konzentration vorzuweisen. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Alle nachfolgenden Inkubationen erfolgten bei gleicher Inkubationszeit bei 37 °C.

Autoren	1x LDH-Buffer								Stopp		
	L-Laktat	NAD ⁺	INT	Nitro blue tetrazolium	PMS	Meldola Blue	Diaphorase	Tris-HCl	CH ₃ COOH	Oxamate in PBS	HCl
(Korzeniewski & Callewaert, 1983)	27 mM	0,65 mM	0,33 mM		0,14 mM			100 mM pH 8,2			
(Chan et al., 2013)	37 mM	0,9 mM	0,45 mM		0,2 mM			200 mM pH 8	1 M		
(Kaja et al., 2015)	80 mM	1,6 mM	1,0 mM		7,5 µM			200 mM pH 8	1 M		
(Burd & Usategui-Gomez, 1973)	100 mM	17,4 mM	3,96 mM			0,26 mM		200 mM pH 8,2			0,1 M
(Decker & Lohmann-Matthes, 1988)	50 mM	0,56 mM	0,5 mM				1,69 u/ml	1,25 mM pH 8,5		16,6 mg/ml	
(Zou et al., 2013)	25 mM	0,4 mM		0,25 mM			10 u/ml	5 mM pH 8,2			1 M

Tabelle 11: Vergleich der verwendeten Substanzen im LDH Assay unterschiedlicher Autoren.

3.9.2.1 INT in DMSO

Für die INT-Stock-Lösung wurde eine schlechte Löslichkeit in Wasser oder PBS beobachtet, basierend auf beschriebenen Stock-Ansätzen von 20 mg/ml Lösungen wurde ein 40 mg/ml INT-Stock in dem Lösungsmittel DMSO angesetzt (Decker & Lohmann-Matthes, 1988). Unter Verwendung von L-Laktat als Substrat wurde bei Verwendung des Chan-Protokolls die Signalentwicklung einer INT-Verdünnung in Wasser mit der in DMSO verglichen.

3.9.2.2 Konzentrationsanpassung der Reagenzien

Zur Verfeinerung des Messbereichs und mit Ziel einer höheren Sensitivität wurde die Kombination einzelner Pufferkomponenten in doppelter Konzentration getestet. Die

Unterschiedlichen Substanz-Verhältnisse sind in Tabelle 12 aufgeführt. Als Referenz-Standard wurde das Chan-Protokoll verwendet. Getestet wurden ein Puffer mit doppelter INT-Konzentration, ein Puffer mit doppelter Laktat/NAD⁺-Konzentration sowie ein Puffer mit doppelter Laktat/NAD⁺/INT-Konzentration. Als Probe verwendet wurde das Lysat von 1,5 x 10⁶ HN10e Zellen, die in 6 cm Schalen kultiviert und mit 1,5 ml 1 % Triton X-100 haltigem phenolrotfreiem DMEM lysiert wurden.

	L-Laktat/NAD ⁺	L-Laktat/INT	L-Lactate/PMS
(Korzeniewski & Callewaert, 1983)	41,54	81,82	192,86
(Chan et al., 2013)	41,11	82,22	185
(Kaja et al., 2015)	50	80	n.A.
(Burd & Usategui-Gomez, 1973)	5,75	25,25	n.A.
(Decker & Lohmann-Matthes, 1988)	89,29	100	n.A.
(Zou et al., 2013)	62,5		
Final	44,44	80	200

Tabelle 12: Verhältnis der eingesetzten Substanzen in den unterschiedlichen Protokollen.

3.9.2.3 Proben-Lagerung

Im Verlauf wiederholter Testungen traten schwankende Amplituden der Messwerte im Vergleich zum Nullwert insbesondere bei gelagerten Proben auf. Zur Überprüfung möglicher Einflüsse der Lagerungsbedingungen auf die Verwertbarkeit der Proben erfolgte eine genauere Testung. Die unterschiedlichen Lagerungsbedingungen der Proben wurden mit 6 x 10⁶ HN10e-Zellen/ml mit einer sehr hohen Zellzahl getestet. Für 24 Stunden wurden die gleichzeitig lysierten Zellen bei unterschiedlichen Temperaturen in Eppendorf-Gefäßen gelagert. Verglichen wurde die Lagerung bei Raumtemperatur mit 37 °C, 4 °C, -20 °C, sowie fünf 30-minütigen Gefrier-/Tau-Zyklen.

Die LDH-Testung vor der Lagerung (t_{0h}) und nach der Lagerung (t_{24h}) erfolgte dabei in unterschiedlichen Ansätzen.

3.9.2.4 Anpassung der Triton X-100 Konzentration

Im finalen Testsystem wurde, aufgrund des Einflusses auf die Farbreaktion, die zur Ermittlung von LDH_{max} notwendige Triton X-100 Konzentration sowie die Behandlungsdauer ermittelt.

Mit Ziel einer Zeit-effizienteren Triton X-100-Lyse Prozedur wurden 1 x 10⁶ HN10e in 6 cm Schalen für lediglich 15 oder 30 Minuten lysiert. Als Vergleich wurde die bislang erfolgte Lyse über 45 Minuten betrachtet. Die Lyse erfolgte EMFIp⁻ Medium.

Im Direktvergleich wurden TH3.2 transfizierte HN10e Zellen den unbehandelten HN10e Zellen gegenübergestellt. Bei der aus dem Chan-Protokoll vorgegebenen Zeit von 45 Minuten wurden 1×10^6 Zellen mit 0,5 ml Triton X-100 haltigen EMFlp⁻ lysiert. Eingesetzt wurden Konzentrationen von 1 %, 0,1 % und 0,01 %. Nach weiterer Verdünnung der Lysate ergaben sich äquivalent 200.000/ml sowie 20.000/ml.

Unterschiedliche Zeiten bis zur maximalen Lyse wurde mit 1×10^6 HN10e Zellen in 0,5 ml Triton X-100 haltigen EMFlp⁻, getestet. Die Lyse erfolgte für fünf, zehn, 15, 30 und 45 Minuten. Die Triton X-100 Konzentration wurde variiert. Als Referenz wurde das 1 % Triton X-100-haltige EMFlp⁻ Medium betrachtet. Verglichen wurde es mit 0,1 %, 0,05 % und 0,01 % Triton X-100.

3.9.2.5 Medium Entnahme bedingte LDH-Freisetzung

Zum Ausschluss falsch hoher LDH-Messwerte durch extraktionsbedingten Zelluntergang wurden zwei Varianten der Medium Extraktion verglichen. Neben der Zentrifugation wurde als alternatives Verfahren die Filtration betrachtet. Unter gleichen Wachstumsbedingungen wurden die Zellen in 1 %, 0,1 % oder 0,01 % Triton X-100 haltigem Behandlungsmedium für fünf, zehn oder 15 Minuten lysiert. Anschließend wurde eine Gruppe mittels Pipette in ein Eppendorf-Gefäß transferiert, zwei Minuten bei 300 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß transferiert. Das Medium der anderen Gruppe wurde durch einen 0,2 µm Filter vorsichtig in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Beide Gruppen wurden bei 15.000 g und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Gefäße transferiert.

3.9.2.6 Etablierung der Standardkurve

Im Gegensatz zu einer Standardisierung der gemessenen LDH-Werte auf die Maxima der Lyse einer gegebenen Zellzahl, sollten die Messwerte auf eine bekannte LDH-Aktivität standardisiert werden. Verwendet wurde kommerziell erworbene L-LDH Typ XI aus Kaninchenmuskel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Das Enzym wurde in Wasser gelöst und aliquotiert auf eine Konzentration von 10 u/µl gebracht. Der Standard wurde zunächst in Duplikaten getestet. Verglichen wurde die Verdünnung in Wasser mit einer 1 % Triton X-100 Lösung. Nach einem orientierenden Versuch der Farbentwicklung wurde eine Standardleiter beginnend bei 500 mU/ml bis 0,5 mU/ml aufgestellt. Zur weiteren Sensitivierung der Standardskala erfolgte bei Beginn von 200 mU/ml (S1) eine Abstufung um je 63 % auf zuletzt 0,52 mU/ml (S7).

3.9.2.7 LDH-Standard Halbwertszeit.

Für die Reliabilität des LDH Assays galt es die Haltbarkeit des LDH-Standards zu ermitteln. Hierfür wurden drei LDH-Stock-Aliquots unterschiedlichen Alters verwendet. Neben einer neu angesetzten Verdünnung wurden eine 51 und eine 127 Tage alte Verdünnung verwendet. Basierend auf dem Messwert des 200 mU/ml Standardwertes wurden die Messwerte auf die

Werte der neu angesetzten Verdünnung standardisiert. Die Halbwertszeit wurde näherungsweise aus der graphischen Darstellung bestimmt.

3.9.2.8 Protokoll Ablauf

Einen Überblick der unterschiedlichen eingesetzten Protokolle gibt Tabelle 13. Variiert wurde dabei insbesondere die genaue Zusammensetzung des LDH Puffers.

➤ Zentrifugation der Proben bei 15.000 g und 4 °C für 10 Minuten	
➤ Zugabe von 50 µl Standard / Probe / BLK / Well	
➤ Zugabe 50 µl 2 x LDH Puffer / Well	
DL-Laktat	1 x LDH Puffer
Chan et al.	37 mM DL-Laktat, 0,9 mM NAD ⁺ , 0,4 mM INT, 0,2 mM PMS, 200 mM TrisHCl pH 8
Kaja et al. (mod)	160 mM DL-Laktat, 1,6 mM NAD ⁺ , 1 mM INT, 7,5 mM PMS, 200 mM TrisHCl pH 8
L-Laktat	
Chan et al.	37 mM L-Laktat, 0,9 mM NAD ⁺ , 0,4 mM INT, 0,2 mM PMS, 200 mM TrisHCl pH 8
Chan et al. (2 x)	74 mM L-Laktat, 1,8 mM NAD ⁺ , 0,9 mM INT, 0,2 mM PMS, 200 mM TrisHCl pH 8
Final	80 mM Laktat, 1,8 mM NAD ⁺ , 1 mM INT, 0,4 mM PMS, 200 mM TrisHCl pH 8
➤ Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C	
➤ Stopp mit 1 M Essigsäure, 50 µl / Well	
➤ Messung bei 490 nm	

Tabelle 13: Übersicht der verwendeten LDH Assay Protokolle.

3.9.3 Statistische Validierung

Zur Etablierung eines Standardleiter basierten LDH Assays sollte diese zunächst in ihren Standardrängen signifikant von einander zu unterscheiden sein. Im Levene-Test wurde eine Varianzhomogenität ausgeschlossen. Die Auswertung der Standardleiter auf Unterschiede der Standardränge erfolgte mittels Mediantest. Verwendet wurde die N = 231 Standardkurvenwerte aller durchgeführten LDH-Testungen. Der Standardrang S8 der dem Nullwert entspricht wurde nicht miteinbezogen. Zusätzlich erfolgte zu jedem Standardrang ein Paarvergleich. Die geprüfte Nullhypothese nahm an, dass zwischen beiden Standardrängen kein Unterschied bestand. Das korrigierte Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ angesetzt.

Die Hintergrund Korrektur mit Abzug des Nullwerts von den 490 nm Messwerten der Standardverdünnungen und der Proben sollte hierbei keinen Informationsverlust bewirken.

Die Berechnung der Intra-Test-Varianz erfolgte mittels der Konzentrationswerte (in mU/ml) aller 452 getesteten Positiv-Proben. Die Standardwerte wurden in die Berechnung der Intra-Test-Varianz mit einbezogen. Verglichen wurden die Variabilitätskoeffizienten der Triplikate.

Die Variationskoeffizienten der Konzentrationswerte von 32 unterschiedlichen Proben, die je in mindestens zwei unabhängigen Testansätzen getestet wurden, wurde zur Berechnung der Inter-Test-Varianz verwendet.

3.10 Calbindin und LDH-Freisetzung aus HN10e Zellen unter Einfluss von Noxen

3.10.1 Eingesetzte Noxen

Um die Calbindin-Freisetzung der behandelten Zellen untersuchen zu können wurde eine Apoptose mittels zweier verschiedener Noxen, Staurosporin und Ionomycin, induziert.

3.10.1.1 *Staurosporin*

Staurosporin ist ein Alkaloid, das 1977 erstmals aus *Streptomyces* isoliert wurde und eine antifugale Wirkung zeigte (Omura et al., 1977). Als Noxe interessant ist die inhibierende Wirkung von Staurosporin auf die Phospholipid/ Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase, Proteinkinase C (Tamaoki et al., 1986). Dabei induziert Staurosporin nicht nur die Caspase-bedingte Apoptose, sondern wirkt auch Caspase-unabhängig apoptotisch (Belmokhtar et al., 2001). Hierbei konnten Untersuchungen an Melanom-Zellreihen zeigen, dass Staurosporin im sekundären Weg die Apoptose über Mitochondrien aktiviert (Zhang et al., 2004). Der genaue Weg, der sekundär ausgelösten Apoptose ist bislang noch nicht vollständig geklärt, scheint aber in allen kernhaltigen Zellen von Säugetieren auslösbar (Jacobsen et al., 1996). Und so konnte die apoptotische Wirkung in einer Vielzahl unterschiedlicher Zellreihen gezeigt werden. Unter anderem konnte auch in HL-60 und CA46-Zellen eine Apoptose typische morphologische Veränderung und eine DNA-Fragmentation beobachtet werden (Bertrand et al., 1994). In Kulturen gemischter kortikaler Zellen, die sowohl Neurone als auch Glia enthielten, zeigten sich bei kontinuierlicher Behandlung mit 100 nM Staurosporin eine schrittweise Degeneration der Zellen über 48 Stunden ohne begleitende Zellschwellung (Koh et al., 1995).

3.10.1.2 *Ionomycin*

Die Fähigkeit, Metallionen zu binden und über eine Barriere transportieren zu können, zeichnet Ionomycin als Ionophor aus. Dabei ist das aus *Streptomyces conglobatus* isolierte Antibiotikum der Polyether-Gruppe hochspezifisch für Calcium-Ionen, kann jedoch auch andere zweiwertige Metallionen binden (Liu & Hermann, 1978). In Untersuchungen mit LCLC 103H Zellen kam es bei

Zugabe von 2 μM Ionomycin zu einem starken Anstieg intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration und nachfolgender Induktion von Calpain-Proteinen und des intrinsischen Apoptoseweges (Gil-Parrado et al., 2002). Die bei 5 - 10 μM Ionomycin auftretenden raschen Membranpotenzialentladungen, die mit einer Zunahme der Membranpermeabilität einhergingen, konnten bei Versuchen mit Endothel-Zellen bei einer Konzentration von 1 μM Ionomycin nicht beobachtet werden (Garcia et al., 1997).

3.10.2 Vorversuch Dosisfindung

Zur Findung einer geeigneten Testkonzentration erfolgte aufgrund Zellreihen-spezifischer Vulnerabilität gegenüber der eingesetzten Noxen zunächst eine Fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Zellen bei Einsetzen unterschiedlichen Dosen.

Zur genaueren Dosisfindung der einzusetzenden Noxen wurden HN10e Zellen mit dem Plasmid EGFPN3 transfiziert, um eine Beobachtung der Zellen während der Behandlung zu ermöglichen. Zusätzlich erfolgte zur quantitativen Beurteilung der Zellvitalität eine Untersuchung des Mediums nach 20 Stunden im LDH Assay. Zwischenbeobachtungen im Fluoreszenzmikroskop erfolgten nach zehn Minuten, 30 Minuten und 20 Stunden.

2×10^6 transfizierte HN10e Zellen des Vortages wurden gleichmäßig auf zwei 24-Well-Platten verteilt. Um eine ausreichende Zelladhäsion zu gewährleisten wurde die Behandlung am Folgetag begonnen. Um eine valide Erfassung der LDH Werte im Medium zu gewährleisten wurde das Vollmedium abgenommen, die Zellen kurz mit PBS-EDTA gewaschen und anschließend 200 μl /Well phenolrotfreies Medium mit der jeweiligen Noxe aufgegeben. Eingesetzt wurden Staurosporin in Konzentrationen 10 nM – 1 μM und Ionomycin 100 nm – 10 μM .

3.10.3 Ablauf des Behandlungsexperiments

Als Maß der Zellschädigung durch die eingesetzten Noxen wurde die im Medium freigesetzte LDH-Aktivität mittels des LDH Assays bestimmt. Gegenüber gestellt wurde die im ELISA bestimmte Konzentration von Calbindin D28k der Medium-Proben. Die Expression erfolgte nach Lipofektion von HN10e Zellen mit dem TH3.2 Plasmid.

An Tag 0 erfolgte die Transfektion von HN10e Zellen in 10 cm Schalen à 3×10^6 Zellen mit dem TH3.2 Plasmid gemäß dem Macsfectin Protokoll. Nach 24 Stunden wurden die Zellen erneut ausgezählt und in 3 cm Schalen zu je 500.000 Zellen mit 1,5 ml Vollmedium ausplattiert.

Das Behandlungsexperiment wurde an Tag 2 begonnen. Das als vollwertiges Wachstumsmedium verwendete EMFI-Medium wurde hierzu entfernt und die Schale kurz mit PBS-EDTA gespült, um Phenolreste sowie etwaiges vermehrtes Calcium zu entfernen. Die Schalen wurden umgehend mit 1,5 ml des Behandlungsmediums versehen. Die jeweilige Noxe wurde in phenolrotfreiem Behandlungsmedium verdünnt eingesetzt. Die Kontrolle erhielt das gleiche Medium ohne die jeweilige Noxe. Die bereits erprobten Noxen wurden für Staurosporin in einer Konzentration von 500 nM eingesetzt, für Ionomycin in einer Konzentration von 1 μ M. Die Behandlung erfolgte über 28 Stunden. Die zwei Stunden und 28 Stunden Kontrolle wurde nach Abnahme des Mediums mit 1,5 ml 1 % Triton X-100 in Behandlungsmedium für zehn Minuten lysiert. Gearbeitet wurde je in biologischen Duplikaten. Zu jedem Zeitpunkt wurde das gesamte Medium vorsichtig mit einer Pipette in ein Eppendorf-Gefäß transferiert. Die Entnahme erfolgte nach zwei, drei, vier, sechs, acht, zwölf, 20 und 28 Stunden. Die Proben wurden anschließend für zwei Minuten bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Die übertragenen Überstände wurden anschließend für zehn Minuten bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Bis zur Testung wurden die Proben bei 4 °C gelagert. Das Behandlungs-Experiment wurde nach diesem Schema insgesamt dreimal wiederholt.

3.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 25 (IBM). Die technische Messgrenze des Epoch (Biotek®) lag bei 4,000. Höhere Messwerte > 4,000 wurden als „OVRFLW“ ausgegeben. Um eine Verzerrung der Berechnung zu vermeiden, wurde für Messwerte über der Messgrenze 4,000 angenommen. Die daraus resultierend beeinträchtigten Ergebnisse wurden in den betreffenden Fällen im Einzelnen diskutiert. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten erfolgte nach Pearson wenn nicht anders gekennzeichnet. Als Signifikanzniveau wurde ein $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

Die Untergliederung der nachfolgend aufgeführten Ergebnisse folgt dabei der inhaltlichen Unterteilung der Experimente. Beginnend dargestellt ist die Purifikation des rekombinanten Calbindin. Gesondert soll dabei zunächst die Expression rekombinanten Calbindins und die testrelevanten Untersuchungen zu Calbindin sowie das Verhalten in variierenden Testbedingungen betrachtet werden. Isoliert sind die Etablierung und Validierung des CB-ELISA und des LDH Assay dargestellt. Die Calbindin Bestimmung in Gewebeproben ist dabei über die ELISA Etablierung hinaus als eigenständiger Punkt zu finden. Als etablierte Testverfahren wurden beide Systeme im Zellbehandlungsexperiment zusammengeführt.

4.1 Expression rekombinanten Calbindins

Für den ELISA wurde zunächst das rekombinante Protein für die Standardleiter exprimiert. Die Anreicherung und Reinheit des rekombinanten Calbindins nach der Glutathion Affinitätschromatographie und Thrombinspaltung in der weiterzuverarbeitenden Fraktion wurde mittels der Coomassie-Färbung im Rahmen der Qualitätssicherung ermittelt. Diese ist in Abbildung 4 dargestellt. In der Eluierung des GST-Fusionsproteins zeigte sich die erste Fraktion als besonders hoch konzentriert (Abbildung 4: Bahn 6, Pfeil). Ein relevanter Verlust rekombinanten Proteins durch die Wasch-Schritte stellte sich in der Coomassie-Färbung hingegen nicht dar (Abbildung 4: Bahn 3 – 5).

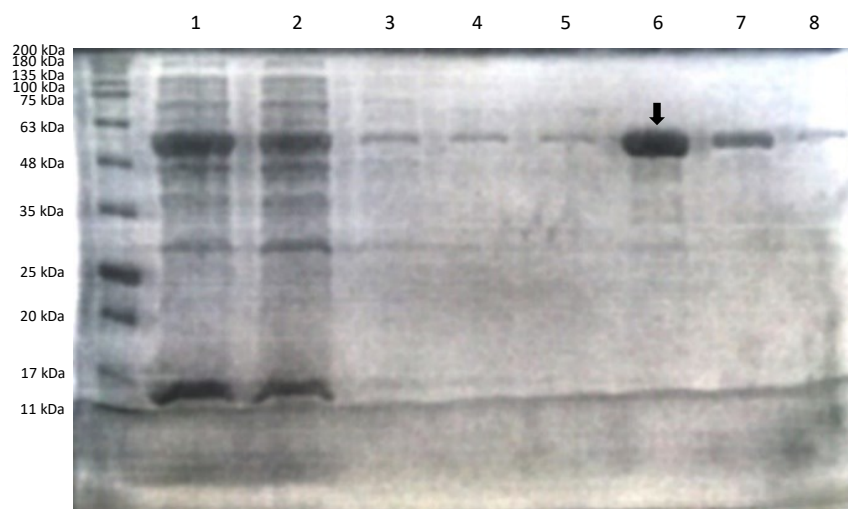


Abbildung 4: Darstellung einer Coomassie-Färbung der Proteinpurifikation. SDS-Page. Standard 245 - 11 kDa; Überstand Lyse (1); Überstand Beads (2); Überstand Waschschrte (3-5); Überstand Eluier-Schritte (6-8). Pfeil: rekombinantes Fusionsprotein.

Die Wahl einer adäquaten Inkubationsdauer der Thrombinspaltung erfolgte nach Beurteilung der Proben unterschiedlicher Inkubationszeiten in der in Abbildung 5 zu sehenden Coomassie-Färbung. Die Thrombinspaltung des rekombinanten Proteins von dem GST-Rests zeigte hier in der Messung nach 4 $\frac{3}{4}$ Stunden noch Reste des ungespaltenen Fusionsproteins (Abbildung 5: Bahn 6, Pfeil). Nach einer gesamt Inkubationsdauer von 16 Stunden konnte in der Coomassie-Färbung kein GST-Calbindin mehr nachgewiesen werden. In der unmittelbaren Eluierung der Beads nach der Thrombinspaltung über 4 $\frac{3}{4}$ Stunden zeigten sich auch hier noch große Anteile ungespaltenen Fusionsproteins (Abbildung 5: Bahn 8, Stern). Die Inkubationsdauer von 16 Stunden für die Thrombinspaltung wurde für die weitere Aufreinigung in der Benzamidin-Säule gewählt. Gleichzeitig konnte im Speziellen auch für die Proben der Thrombinspaltung im Vergleich der Lysat-Proben vor den Waschschrinen mit den nachfolgend weiterverarbeiteten Proben eine gute Aufreinigungen gezeigt werden.

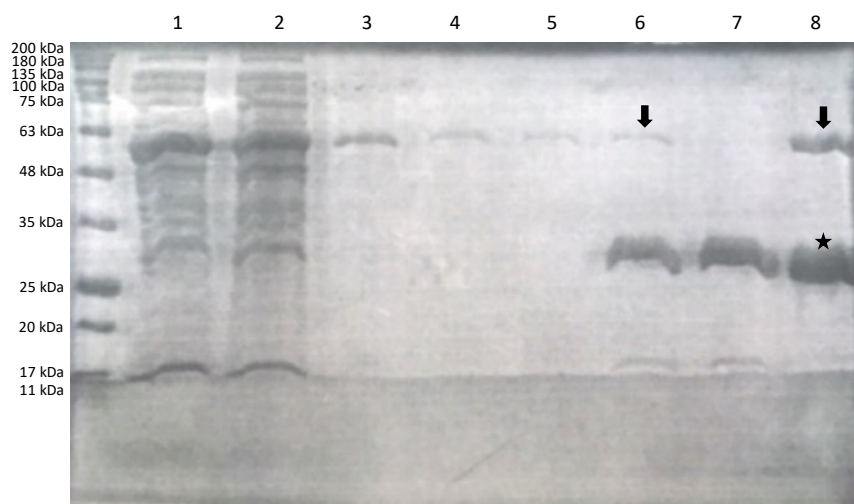


Abbildung 5: Darstellung einer Coomassie-Färbung der Thrombinspaltung. SDS-Page. Standard 245 - 11 kDa; Überstand Lyse (1); Überstand Beads (2); Überstand Waschschrine (3-5); Thrombinspaltung 4 $\frac{3}{4}$ h (6); Thrombinspaltung 16 h (7); Eluierung nach Thrombinspaltung 4 $\frac{3}{4}$ h (8). Pfeil: ungespaltenes Fusionsprotein. Stern: rekombinantes Protein.

4.1.1 Aufreinigung mittels Benzamidin-Säule

Für die Auftrennung von Thrombin und rekombinanten Calbindin mittels Benzamidin-Säule wurden zwei unterschiedliche Puffer eingesetzt. Im BCA-Assay zeigten die Proben der Hochsalz-Waschung bei einer ungefähr zehnfachen NaCl-Konzentration gegenüber der eingesetzten PBS-Waschung besonders hohe Proteinkonzentration. Aufgeteilt in 0,5 ml Fraktionen lagen dabei die Konzentrationswerte der drei Fraktionen der Hochsalz-Waschungen im Mittel bei einem zwölffachen der übrigen vorangegangenen 13 Fraktionen der PBS-Waschungen ($M_{HS} = 164,06 \pm 71,3 \mu\text{g/ml}$; $M_{PBS} = 13,38 \pm 16,7 \mu\text{g/ml}$). Die gesammelten Fraktionen, sowie die ebenfalls höher

konzentrierten Proben der PBS-Waschung sind in der nachfolgenden Coomassie-Färbung in Abbildung 6 (A) dargestellt.

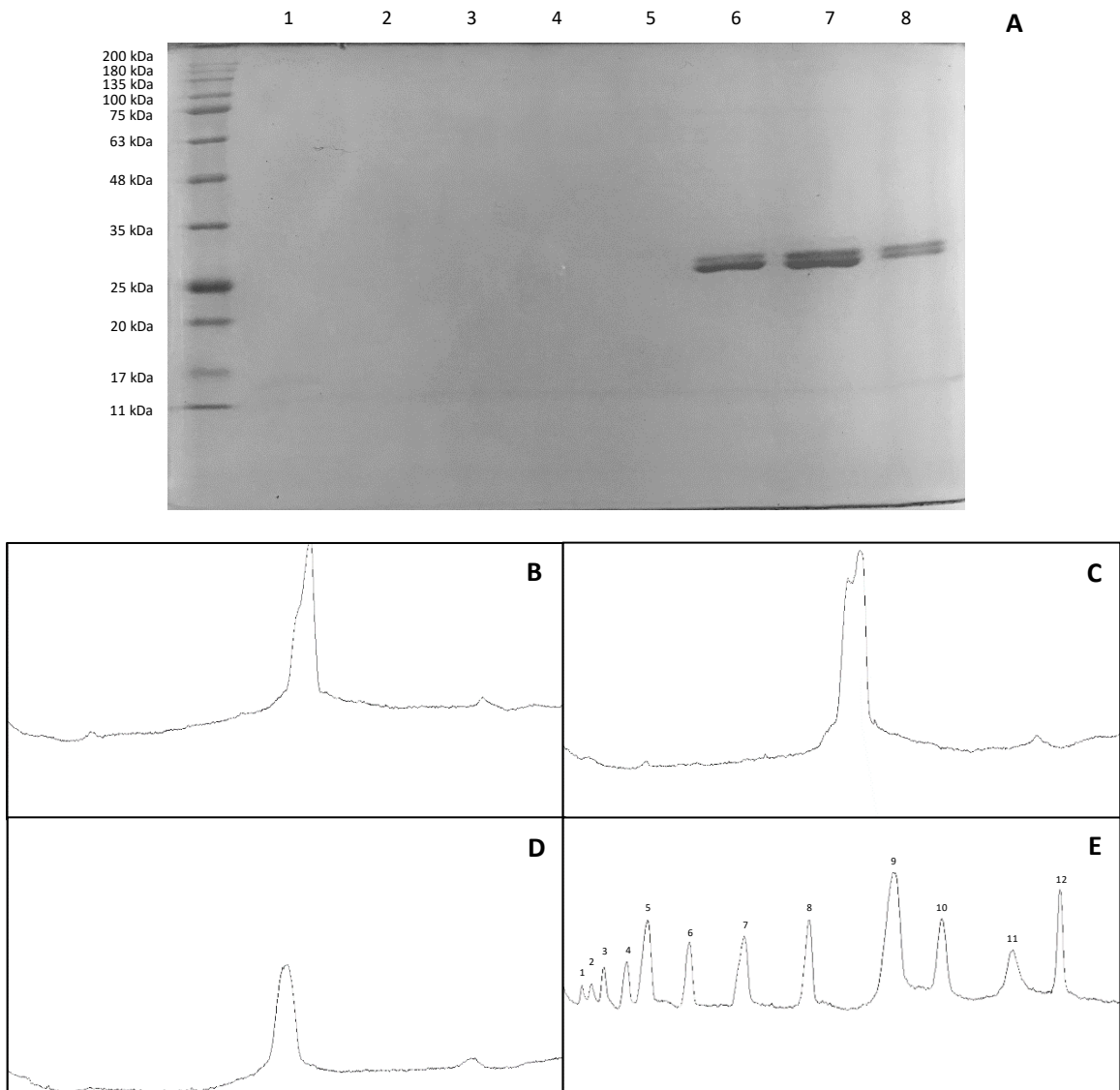


Abbildung 6: Darstellung der Extraktion aus der Benzamidin-Säule. Die Coomassie-Färbung des SDS-Page (A) und das Histogramm der Banden 6-8 (B-E). Standard 245 – 11 kDa. Banden der SDS-Page: Fraktion PBS 1-5 (1-5); Fraktion Hochsalz 1-3 (6-8). In der Histogramm-Darstellung die Hochsalzfraktionen 1-3 (B-D) zeigt sich der Peak zwischen der 35 kDa und der 25 kDa Bande. Das Histogramm E zeigt zur Orientierung die Standardkurve: 245 kDa (1), 180 kDa (2), 135 kDa (3), 100 kDa (4), 75 kDa (5), 63 kDa (6), 48 kDa (7), 35 kDa (8), 25 kDa (9), 20 kDa (10), 17 kDa (11), 11 kDa (12).

Für die drei am höchsten konzentrierten Fraktionen (14, 15, 16) zeigten sich keine in der Coomassie-Färbung darstellbaren Verunreinigungen. Bei gleichen eingesetzten Volumina entsprach die Menge rekombinanten Calbindins der Banden bei unterschiedlichen Konzentrationen 3,5 µg (Fraktion 14), 5,2 µg (Fraktion 15) und 2,1 µg (Fraktion 16). Dargestellt in Abbildung 6 ist neben der Coomassie-Färbung das Histogramm der Bahnen der Hochsalz-Fraktionen 6 – 8 (Abbildung 6 B – D). Abbildung 6 (E) zeigt orientierend den Verlauf der Standardleiter. Die Auswertung des Histogramms ergab neben der Calbindin Bande zwischen dem 35 und 25 kDa Standard keine weiteren relevanten Banden für alle drei untersuchten

Fraktionen. In allen Fällen ist ein Peak auf Höhe der 11 kDa Bande zu sehen, die dabei im Gel selbst Bahnen überschreitend sichtbar als durch den Ladepuffer-bedingte Artefakte gewertet wurden. Die drei ertragreichen Hochsalz-Fractionen wurden gepoolt und als Calbindin-Proteinstandard eingesetzt. Erzielt wurde eine Konzentration von 154 µg/ml.

Eine zusätzliche Bestätigung von rekombinantem Calbindin D28k in der Hochsalzfraktion der Thrombinspaltung erfolgte als Auftragsleistung durch die AG Imhof mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie. Relevante Verunreinigungen wurden nicht beschrieben.

4.1.2 Verzögerung von Calbindin durch EDTA im Gellauf gegenüber CaCl₂

Experiment übergreifend zeigte das durch das TH3.2 Plasmid exprimierte Calbindin stets eine deutliche Doppelbande im Gellauf des SDS-Page. Es erfolgte daher die Untersuchung auf eine Calcium-Abhängigkeit des Laufverhaltens in der Gelelektrophorese.

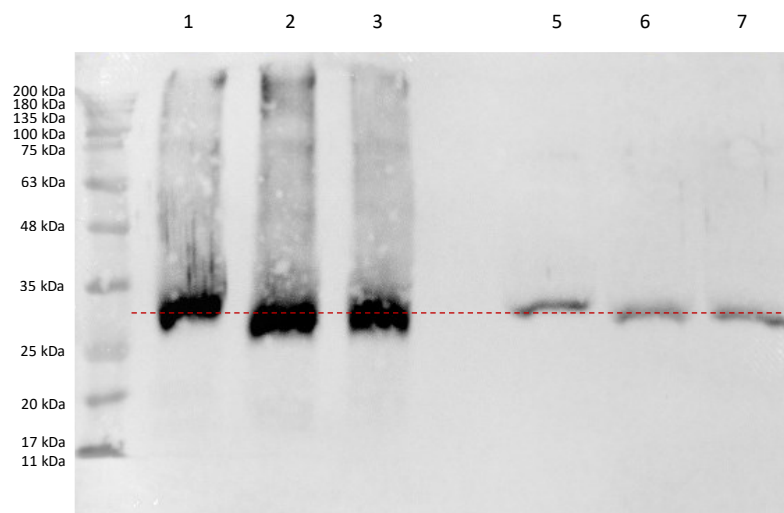


Abbildung 7: Western Blot von Cerebellum- und HN10e-Lysat mit CaCl₂/EDTA. Standard 245 - 11 kDa. Darstellung der Proben in Triplikaten. 1 µg Murines-Cerebellum-Lysat (1-3), 20 µg SKNSEiCbA -transfizierte HN10e-Zellen (5-7). Im Triplikat links die mit 10 mM EDTA versetzte Probe, rechts die mit 10 mM CaCl₂ versetzte Probe, mittig unbehandelt. 1. Antikörper CB38 und 2. Antikörper HRP-anti-Rabbit-IgG. Belichtung 20 Sekunden.

Zum Binden freier Calcium-Ionen wurde vergleichend EDTA beigefügt. Bei Zugabe von 10 mM EDTA zeigten alle untersuchten Proben einen verzögerten Gellauf im Vergleich zu der jeweiligen nativen Kontrolle und der mit 10 mM CaCl₂ versetzten Probe. Die Breite der Bande blieb unverändert.

Für alle eingesetzten Proben zeigte sich bei Zugabe von EDTA ein verzögerter Gellauf im Vergleich zu der nativen Probe. Die Zugabe von CaCl₂ hingegen führte zu einem der Kontrolle gegenüber gleichwertigen bis beschleunigten Gellauf im Falle der Zell-Lysate.

Der beobachtete Effekt war in allen eingesetzten Proben unabhängig von Gewebe-Mischlysat oder rekombinantem aufgereinigtem Protein zu erkennen wie in Abbildung 7 und Abbildung 8 zu sehen ist. Die Doppelbande des TH3.2 exprimierten Calbindins bestand unverändert fort, beide Banden zeigten die beschriebenen Veränderungen im Laufverhalten unter Zugabe von EDTA oder CaCl_2 .

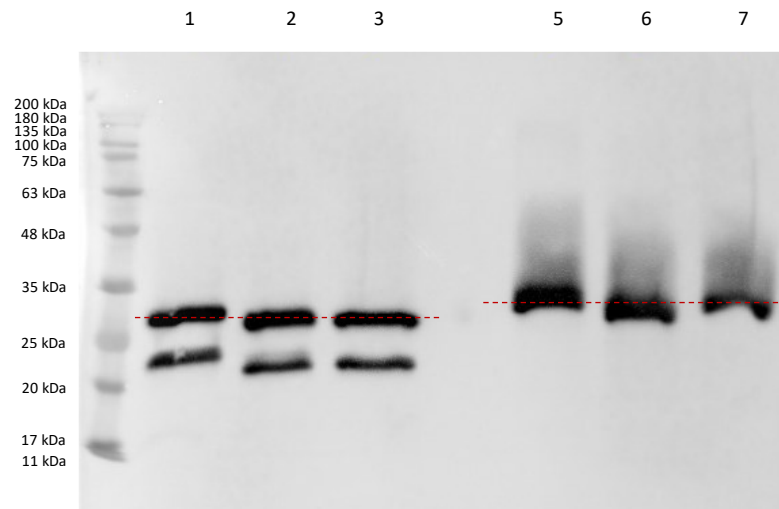


Abbildung 8: Western Blot von HN10e-Lysat und rekombinantes Calbindin mit CaCl_2 /EDTA. Darstellung der Proben in Triplikaten. 20 μg TH3.2-transfizierte HN10e-Zellen (1-3), 0,1 μg rekombinantes Calbindin aus *E. coli* (5-7). Im Triplikat links die mit 10 mM EDTA versetzte Probe, rechts die mit 10 mM CaCl_2 versetzte Probe, mittig unbehandelt. 1. Antikörper CB38 und 2. Antikörper HRP-anti-Rabbit-IgG. Belichtung fünf Sekunden.

Eine weiterführende Untersuchung der Doppelbande wurde nicht angeschlossen. Bei ertragreichem Plasmid wurde die schneller laufende Sekundärbande in den aus HN10e gewonnenen Proben akzeptiert. Das rekombinante Calbindin zeigte zu keinem Zeitpunkt eine Doppelbande.

4.2 Calbindin ELISA

Für den Calbindin ELISA sollte zunächst ein passendes Antikörper-System etabliert werden. Nach Anpassung der Konzentrationen sowie der Inkubationszeiten konnte die statistische Validierung des finalen Protokolls erfolgen.

4.2.1 Auswahl des plattengebundenen 1. Antikörpers

Für die beiden Antikörper CB38 und 300 bestanden gute Daten zum Verhalten im Western Blot.

Im Vergleich der selben eingesetzten Proteinmengen zeigte sich für den monoklonalen Antikörper 300 im Western Blot eine weniger Hintergrund belastete Signalentwicklung bei wengleich geringerer Sensitivität wie die Abbildungen 9 und 10 darstellen.

Sowohl der monoklonale, als auch der polyklonale Antikörper zeigten für das, durch das Plasmid TH3.2-exprimierte, Calbindin eine Doppelbande (Bahn 3 in Abbildung 9 & 10).

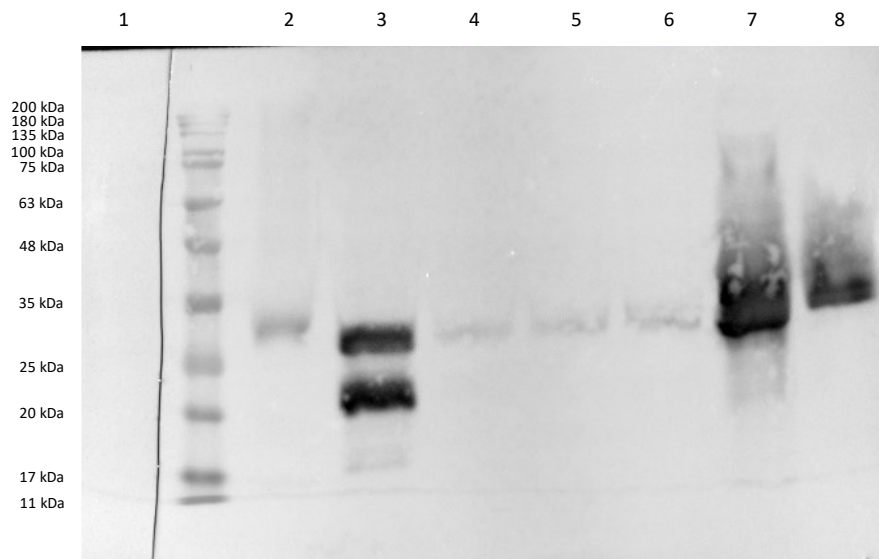


Abbildung 9: Vergleich unterschiedlicher Antikörper im Western Blot (PAb CB38). Standard 245 - 11 kDa. 1 μ g rekombinantes Calbindin (1), 1 μ g murines Cerebellum (2), 20 μ g TH3.2 HN10e-Zellen (3), 20 μ g SKNSEiCBA HN10e-Zellen (4), 20 μ g RSV-CR HN10e-Zellen (5), 20 μ g pEGFP-N3 HN10e-Zellen (6), 1 μ g rekombinantes Calbindin (7), 0,1 μ g rekombinantes Calbindin (8). Rekombinantes Calbindin aus *E. coli*, die übrigen Proben bezeichnen Lysate. 1. Antikörper 769913-H rba Calretinin und 2. Antikörper HRP-anti-Rabbit-IgG (1), 1. Antikörper CB38 und 2. Antikörper HRP-anti-Rabbit-IgG (2-8). Belichtung eine Sekunde.

Der polyklonale Antikörper CB38 zeigte in allen Zell-Lysaten der HN10e Zellreihe eine Bande auf Höhe der 28 kDa im Sinne einer endogenen Calbindin Produktion. Die SKNSEiCbA vermittelte Calbindin Expression schien nicht über die endogene Calbindin Expression hinaus zu gehen wie Bahn 4 im Vergleich zu Bahn 5 & 6 in Abbildung 9 zeigen. Eine Darstellung von Calretinin, bei gleicher eingesetzter Proteinmenge, war im Western Blot nicht ersichtlich.

Die Testung zum Ausschluss der Erkennung von Calretinin im ELISA erfolgte im V8 Phosphatpuffer-System. Bei einer eingesetzten Proteingesamtkonzentration von 2000 μ g/ml wurde für die Lysate Calbindin exprimierender mit dem Plasmid HN10e lipofizierter HN10e Zellen 75 μ g/ml gemessen, die Proben Calretinin exprimierender, mit dem Plasmid RSV-CR transfizierter Zellen verblieben negativ.

Für den ELISA sollte der monoklonale Antikörper als Beschichtungsantikörper durch das Erkennen eines spezifischen Epitops Calbindin mit einer hohen Spezifität binden.

Die erste orientierende Testung des ELISA-Systems mit 1 μ g/ml rekombinantem Calbindin bei varrierender Konzentration des Beschichtungsantikörpers (Protokoll V1) zeigte eine konsequente Unterscheidung zwischen positiv-Signal und Nullwert. Auch bei fehlender Beschichtung mit dem ersten Antikörper wurde in einer Einzelmessung eine Signalzunahme von 3 % beobachtet.

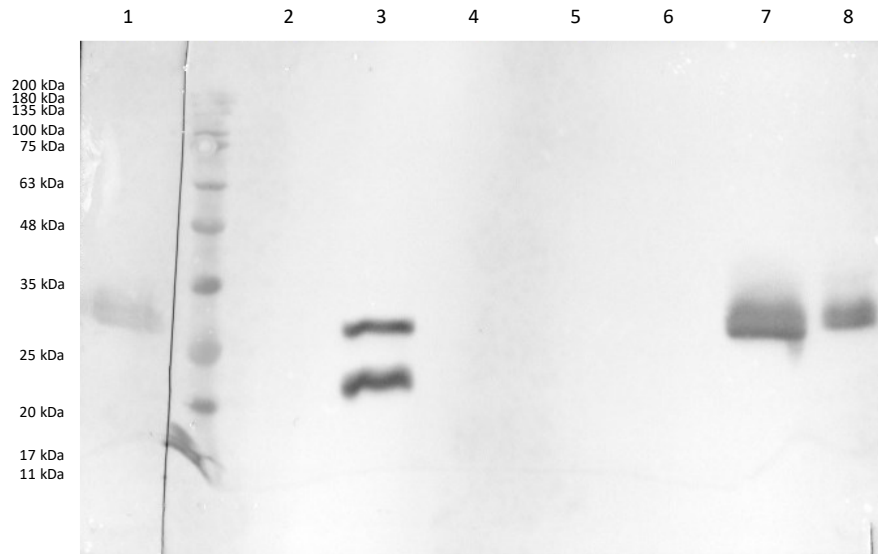


Abbildung 10: Vergleich unterschiedlicher Antikörper im Western Blot (MAb 300). Standard 245 - 11 kDa. 20µg RSV-CR HN10e-Zellen (1), 1 µg murines Cerebellum (2), 20 µg TH3.2 HN10e-Zellen (3), 20 µg SKNSEiCbA HN10e-Zellen (4), 20 µg RSV-CR HN10e-Zellen (5), 20 µg pEGFP-N3 HN10e-Zellen (6), 1 µg rekombinantes Calbindin (7), 0,1 µg rekombinantes Calbindin (8). Rekombinantes Calbindin aus *E. coli*, die übrigen Proben bezeichnen Lysate. 1. Antikörper 769913-H rba Calretinin und 2. Antikörper HRP-anti-Rabbit-IgG (1), 1. Antikörper 300 und 2. Antikörper HRP-anti-Mouse-IgG (2-8). Belichtung eine Sekunde.

Bei einer eingesetzten Verdünnung von 1:1000 lag die Signalzunahme dagegen bei 74 % bei gleichzeitig niedrigerem Nullwert. Bei einer Verdünnung von 1:200 lag der Messwert der Proteinprobe sogar bei dem vierfachen des Nullwerts bei gleichzeitig ansteigendem Nullwert. Für höhere Konzentrationen zeigte sich dagegen keine Verbesserung der Signalzunahme bei fortbestehenden Werten der Positivprobe im Bereich der Sättigung außerhalb des Messbereichs. Gegenübergestellt sind die 450 nm Messwerte in Tabelle 14.

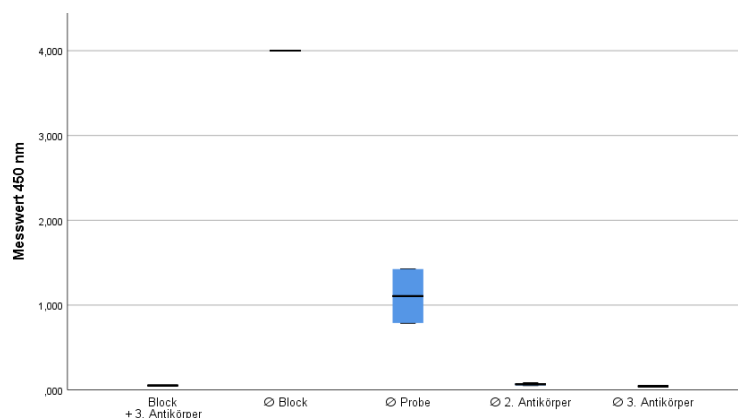


Abbildung 11: Boxplot-Darstellung der ELISA 450 nm Duplikat-Messwerte im Auslassversuch. Dargestellt wurden die 450 nm Messwerte auf der y-Achse. Eingesetzt wurden 10 ng/ml rekombinantes Calbindin.

In der Erprobung der Auslassversuche zeigte sich, wie dargestellt in Abbildung 11, im Falle eines fehlenden Proteins – dem Nullwert entsprechend – ein Hintergrund, der 25 % des maximalen Signals im Messbereich betrug ($M_{\emptyset Probe} = 1,107 \pm 0,450$). Eine Signalentwicklung wurde nur bei gleichzeitigem Einsatz von zweitem und drittem Antikörper beobachtet. Bei fehlender

Blockierung wurden bei 10 ng/ml rekombinanten Calbindin Messwerte erzielt, die im Bereich der Sättigung lagen.

Konzentration 1. Antikörper	Nullwert	Rekombinantes Calbindin 1 µg/ml
0	0,844	0,877
1:1000	0,691	1,200
1:200	0,839	4,000
1:100	1,005	4,000
1:50	0,882	4,000

Tabelle 14: Einzelmesswerte bei 450 nm für variierende Konzentrationen des 1. Antikörpers. Gegenübergestellt sind die Messwerte von 1 µg/ml Calbindin den korrespondierenden Nullwerten.

Der, in der Beschichtung im Bereich von 0 – 5 µg/ml eingesetzte, MAb 300 Antikörper zeigte im V1-Protokoll bei 100 ng/ml, ab einer Verdünnung von 1:1000 Messwerte im Sättigungsbereich, wie die Boxplot Darstellung in Abbildung 12 (A) zeigt. Die Messwerte der Ansätze mit dem 1. Antikörper lagen 58 – 68 % über den Werten des fehlenden Beschichtungsantikörpers.

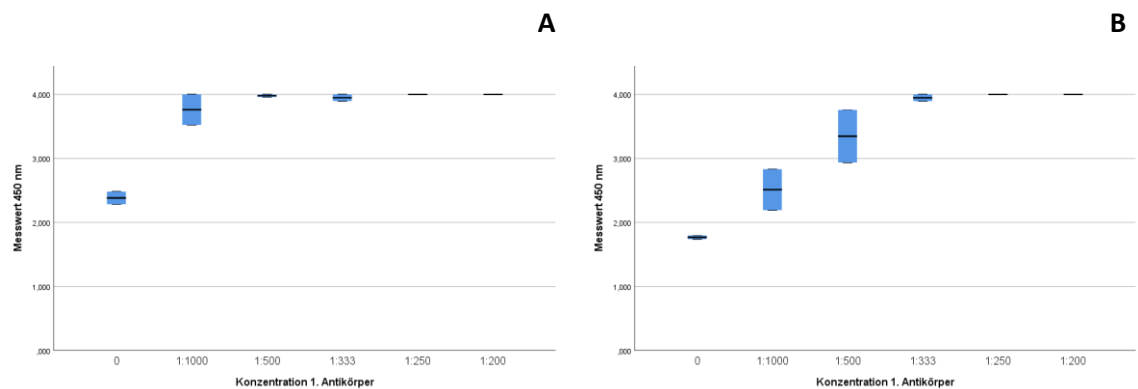


Abbildung 12: Boxplot-Darstellung der ELISA 450 nm Duplikat-Messwerte verschiedener Konzentrationen des 1. Antikörpers. Auf der y-Achse die Messwerte. Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Konzentrationen des 1. Antikörpers dargestellt. Hier eingesetzt wurden je 100 ng/ml rekombinanter Calbindin-Standard unter Anwendung des V1-Protokolls (A) und des V2-Protokolls (B).

Die ergänzende Betrachtung im V2-Protokoll zeigte für Verdünnungen des ersten Antikörpers ab einer Verdünnung von 1:500 Werte im Bereich der Sättigung. Dabei lagen die Messwerte der 1:1000 Antikörper-Verdünnung 42 % und die der 1:500 Verdünnung 89 % über den Messwerten ohne Beschichtungsantikörper. Die Messwerte aus dem V1 und dem V2 Protokoll zeigt Tabelle 15. Im Direktvergleich zeigte das V2-Protokoll gegenüber dem V1-Protokoll bis zu einer Antikörper-Konzentration von 1:333 eine niedrigere Signalentwicklung (Abbildung 12, B). Die Messwerte des unbeschichteten Ansatzes lagen dabei im Durchschnitt 26 % unter den entsprechenden Werten des V1-Protokolls (Tabelle 15). Für die 1:1000 Verdünnung wurden um 33 % reduzierte Messwerte bestimmt.

Konzentration 1. Antikörper	V1 Protokoll	V2 Protokoll
0	2,383 ± 0,139	1,768 ± 0,040
1:1000	3,762 ± 0,337	2,512 ± 0,451
1:500	3,981 ± 0,028	3,348 ± 0,580
1:333	3,949 ± 0,073	3,948 ± 0,074

Tabelle 15: 450 nm Messwerte variierender Konzentrationen des 1. Antikörpers im V1 und V2 Protokoll. Eingesetzt wurden je 100 ng/ml rekombinanten Calbindins.

Die ersten Testversuche im ELISA System zeigten noch große Schwankungen zwischen den einzelnen Testansätzen mit hohen Nullwerten. Als Antikörperkonzentration wurde basierend auf den Testungen aus dem V1 und V2 Protokoll eine Konzentration des Beschichtungsantikörpers von 1:400 festgelegt.

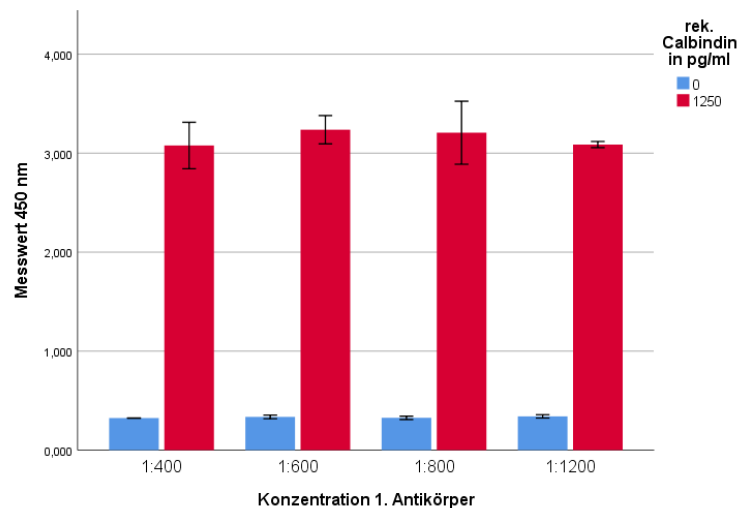


Abbildung 13: Säulendiagramm der ELISA 450 nm Duplikat-Messwerte verschiedener Konzentrationen des 1. Antikörpers. 1250 pg/ml rekombinantes Calbindin in rot und der dazugehörige Nullwert in blau. Die Fehlerbalken zeigen ± 2 Standardabweichungen.

Eine abschließend erfolgte Verdünnungsreihe des Beschichtungsantikörpers im finalen ELISA Testsystem zeigte für Konzentrationen von 1:400 bis 1:1200 annähernd gleichwertige Ergebnisse der Signal-Noise-Ratio in den Duplikaten. Eine signifikante Korrelation der Antikörperkonzentration bestand für die untersuchten 0 pg/ml ($p = 0,148$) und 1250 pg/ml ($p = 0,774$) nicht. Wie in Abbildung 13 zu sehen lagen die Messwerte der unterschiedlichen Antikörper Verdünnungen mit 1250 pg/ml rekombinatem Calbindin im oberen Messbereich und beim Zehnfachen der Hintergrundwerte, wie auch in Tabelle 16 ersichtlich ist.

Aufgeführt in Abbildung 14, zeigten die korrespondierenden Variationskoeffizienten keinen von der Antikörper-Konzentration abhängigen Trend. Eine signifikante Korrelation bestand für die betrachteten 0 pg/ml ($p = 0,168$) und 1250 pg/ml ($p = 0,544$) nicht.

Konzentration 1. Antikörper	Nullwert	Rekombinantes Calbindin 1250 pg/ml
1:400	0,324 ± 0,001	3,077 ± 0,117
1:600	0,335 ± 0,009	3,237 ± 0,071
1:800	0,326 ± 0,008	3,207 ± 0,159
1:1200	0,341 ± 0,008	3,087 ± 0,016

Tabelle 16: 450 nm Messwerte variierender Konzentrationen des 1. Antikörpers. Darstellung des Nullwerts und 1250 pg/ml Calbindin.

Der 1. Antikörper wurde abschließend bei gleichwertiger Sensitivität in einer Konzentration von 1:800 zur Beschichtung der Platten eingesetzt. Eine geringere Konzentration von 1:1200 wurde trotz der zuletzt gesehenen gleichwertigen Sensitivität basierend auf den Voruntersuchungen und nachgewiesenen geringeren Messwerten nicht eingesetzt.

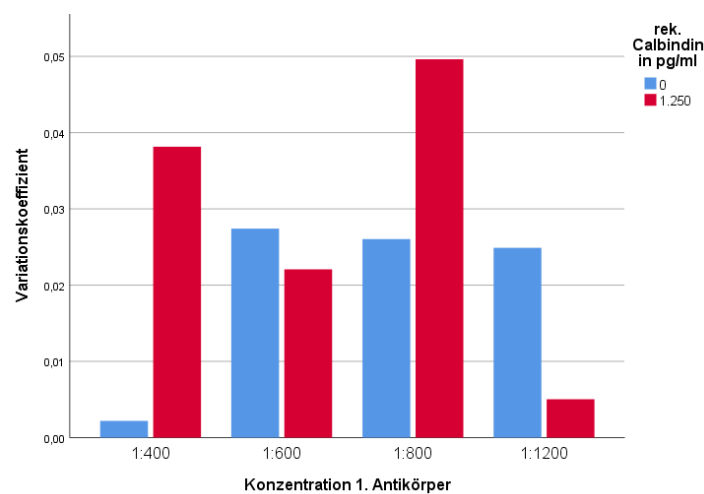


Abbildung 14: Säulendiagramm der ELISA Variationskoeffizienten verschiedener Konzentrationen des 1. Antikörpers. Aufgeteilt nach der Konzentration des ersten Antikörpers auf der x-Achse. In Rot die Werte für 1250 pg/ml rekombinantes Calbindin, in blau der dazugehörige Nullwert.

4.2.2 Ökonomisierung der Antikörper

Ein alternativer Ansatz der Kosteneinsparung konnte durch Wiederverwendung der eingesetzten Antikörperbeschichtung erfolgen. Die frische 1:400 Verdünnung des Beschichtungsantikörper zeigte im Vergleich zu den drei recycelten Verdünnungen aus unabhängigen Ansätzen im finalen ELISA Testsystem für 1250 pg/ml rekombinantes Calbindin mit $M_{1:400} = 3,378 \pm 0,008$ und $M_{1:400'} = 3,362 \pm 0,086$ nach Spearman-Rho keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,547$).

Als weiterer Faktor konnte die mögliche Lagerungsdauer und damit sichere Verwendbarkeit der Antikörperlösung erfasst werden. Die Messwerte von 1250 pg/ml rekombinantes Calbindin für unterschiedliche Lagerzeiträume des MA b 300 – verdünnt in Beschichtungspuffer – bei 4 °C in Eppendorff-Gefäßen sind in Abbildung 19 aufgetragen. Die Messwerte lagen bis zu einer

Aufbewahrungsdauer von 19 Tagen bei > 93 % der Messwerte der frisch angesetzten Antikörper-Verdünnung. Die anhand Abbildung 19 graphisch ermittelte Halbwertszeit lag bei 101 Tagen.

Die ELISA Platten wurden stets frisch beschichtet. Eine Verwendung innerhalb von maximal zwei Wochen nach Beschichtung und bei Lagerung bei 4 °C konnte noch verwertbare 450 nm Messwerte erzielen.

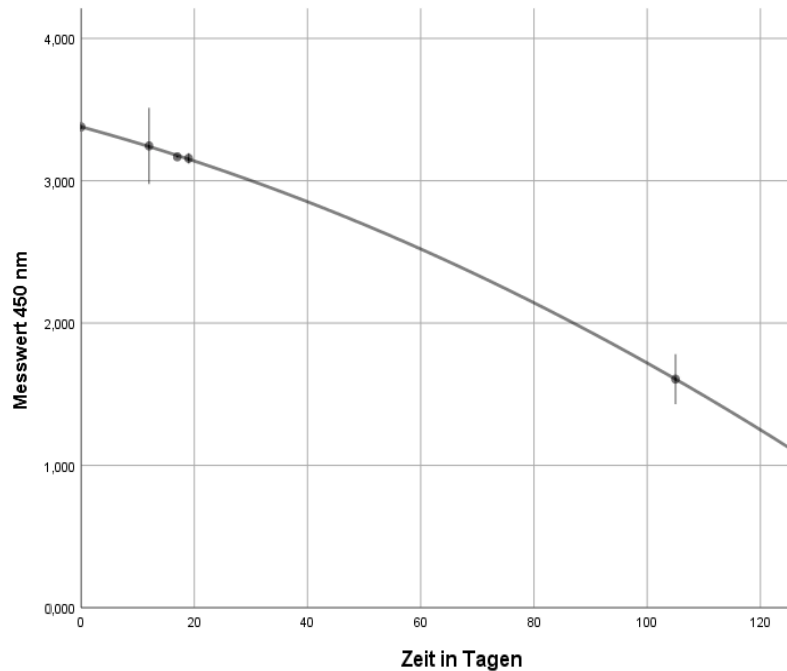


Abbildung 15: Graph der ELISA 450 nm Messwerte unterschiedlich alter Verdünnungen des 1. Antikörpers. 1250 µg/ml rekombinanten Proteins auf der y-Achse gegen die Aufbewahrungsdauer bei 4°C der jeweiligen 300 Antikörperverdünnung in Beschichtungspuffer. Näherungsweise wurde eine quadratische Funktion mit $R^2=1,000$ als Vorhersagegraph angepasst. Die Fehlerbalken zeigen ± 2 Standardabweichungen.

4.2.3 Anpassung des detektierenden 2. Antikörper

Der polyklonale Antikörper CB38 konnte durch die Erfassung unterschiedlicher Epitope das maximale, an den Beschichtungsantikörper gebundene Calbindin erfassen.

Unter Anwendung des V3-Protokolls zeigte die Variation des zweiten Antikörpers in der Unterscheidung von 10 ng/ml rekombinanten Calbindins gegenüber dem Nullwert eine signifikante Konzentrationsabhängigkeit ($p = 0,009$). Grafisch ist dies in Abbildung 16 (A) anhand des Balkendiagramms der 450 nm Messwerte zu sehen. Für eine Antikörperkonzentration von 1:100 lag der Messwert der Probe mit 10 ng/ml rekombinantes Calbindin in der Sättigung und somit 2,2-fach über dem Nullwert (Tabelle 17). Für die 1:1000 Verdünnung lag das Verhältnis

bereits bei dem 13-fachen. Fortlaufend steigerte sich das Verhältnis über 19-fach (1:2000) bis zu 24-fach (1:5000).

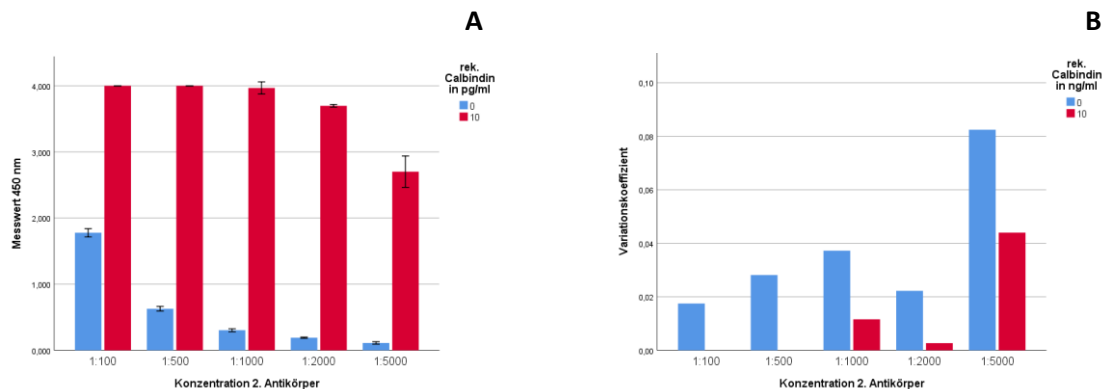


Abbildung 16: Darstellung der ELISA 450 nm Duplikat-Messwerte für unterschiedliche Konzentrationen des 2. Antikörpers. Das Säulendiagramm (A) und der entsprechenden Variationskoeffizienten des jeweiligen Wertepaares (B). Die Messwerte auf der y-Achse. Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Konzentrationen des 2. Antikörpers dargestellt. Hier eingesetzt wurden je 10 ng/ml (rot) sowie 0 ng/ml (blau) rekombinanter Calbindin-Standard unter Anwendung des V3-Protokolls. Die Fehlerbalken zeigen ± 2 Standardabweichungen.

Antikörper-Konzentrationen von größer 1:1000 lieferten Messwerte in der Sättigungsgrenze. Der in der 1:5000 Verdünnung niedrigste gemessene Wert lag bei 67,55 % des Maximums. Bei abnehmender maximaler Signalstärke konnte für eine geringere Konzentration zusätzlich ein abnehmender Hintergrund verzeichnet werden. Im Vergleich zu den Positiv-Proben zeigte sich für die 1:1000 Verdünnung ein Hintergrund der 17,1 % des Hintergrunds der 1:100 Verdünnung entsprach. Im Fall der 1:5000 Antikörper-Verdünnung lag dies anteilig bei 6,27 %. Eine suffiziente Bestimmung der Variationskoeffizienten der Positiv-Proben der Antikörper-Verdünnungen 1:100 und 1:500 war bei Messwerten im Sättigungsbereich nicht möglich (Abbildung 16, B).

Konzentration 2. Antikörper	Nullwert	Rekombinantes Calbindin 10 ng/ml
1:100	1,778 \pm 0,031	4,000 \pm 0,000
1:500	0,629 \pm 0,018	4,000 \pm 0,000
1:1000	0,304 \pm 0,011	3,968 \pm 0,046
1:2000	0,191 \pm 0,004	3,698 \pm 0,010
1:5000	0,112 \pm 0,009	2,702 \pm 0,119

Tabelle 17: Messwerte bei 450 nm für variierende Konzentrationen des 2. Antikörpers. Darstellung des Nullwerts und 10 ng/ml Calbindin.

Mit Ausnahme der 1:2000 Verdünnung nahm mit abnehmender Antikörperkonzentration der Variationskoeffizient der Hintergrundmessung zu und lag für die 1:5000 Verdünnung bei CV = 0,082.

Für den geringsten Hintergrund bei gleichzeitig fast maximaler Signalentwicklung wurde für die fortlaufenden Testungen für den 2. Antikörper eine 1:2000 Verdünnung gewählt.

4.2.4 Signal-to-Noise Maximierung

Zur Maximierung der Signalentwicklung und zur Minimierung des Hintergrundes erfolgte der direkte Abgleich des ersten und des zweiten Antikörpers. In den Versuchen mit Protokoll V4 – das sich durch längere Beschichtungs-, Blockierungs- und Protein-Bindungszeiten auszeichnet – zeigten sich bei Verwendung des ersten Antikörpers in einer Konzentration von 1:800 (Abbildung 17, A) für alle eingesetzten Verdünnungen des zweiten Antikörpers Hintergrund-Werte die 30 – 60 % über den respektiven Messwerten der Ansätze der 1:400 Verdünnung (Abbildung 17, B) sowie der 1:200 Verdünnung (Abbildung 17, C) des ersten Antikörpers lagen. Wie in Tabelle 18 ersichtlich, lagen die Mittelwerte der Positiv-Proben der 1:800 Verdünnung des ersten Antikörpers dabei 1 – 6 % über den jeweiligen Nullwerten. Für die 1:400 Verdünnung lagen die Werte 2 – 10 % über den Hintergrundmesswerten. Im Fall der 1:200 Verdünnung des ersten Antikörpers lagen die Werte der Positiv-Probe 7 – 14 % über den jeweiligen Nullwerten.

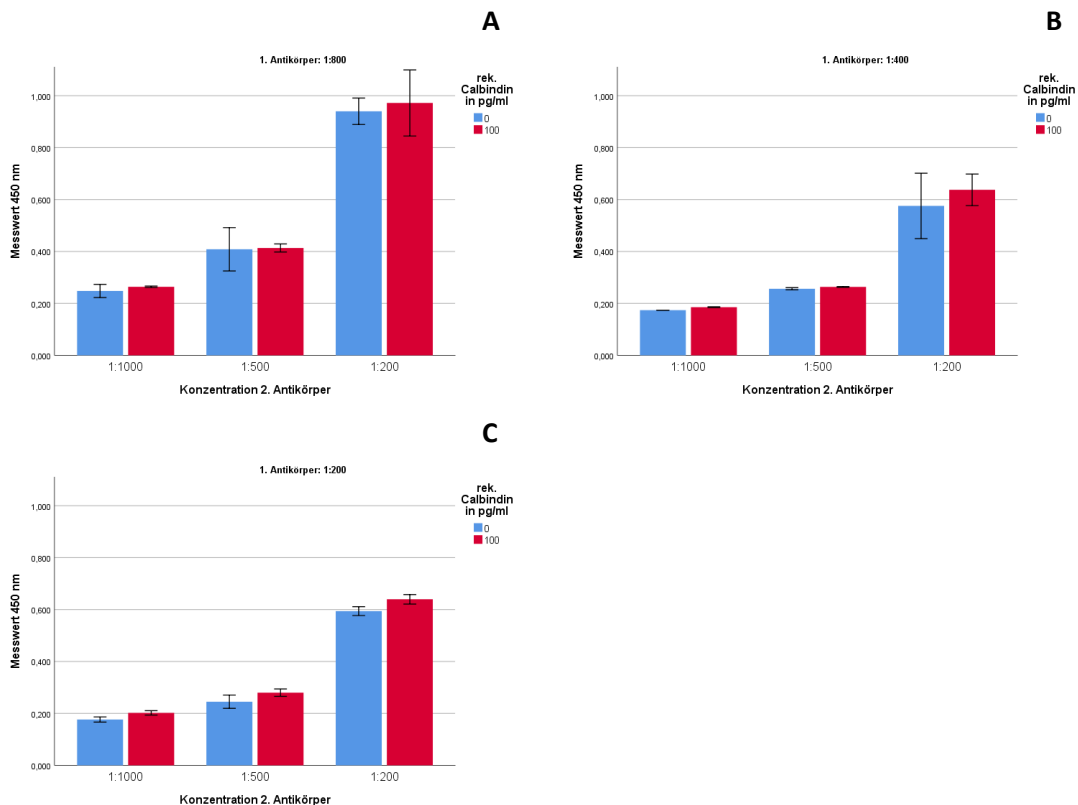


Abbildung 17: Säulendiagramm der ELISA 450 nm Duplikat-Messwerte der Anpassung des 2. Antikörpers. 0 pg/ml (blau) sowie 100 pg/ml (rot) rekombinanten Calbindins, aufgeteilt nach der Konzentration des 1. Antikörpers 1:800 (A), 1:400 (B) und 1:200 (C). Aufteilung der Säulenpaare nach der Konzentration des zweiten Antikörpers (von links nach rechts: 1:1000, 1:500 und 1:200). Die Messwerte auf der y-Achse. Die Fehlerbalken zeigen ± 2 Standardabweichungen.

Mit steigender Konzentration des 2. Antikörpers zeigte sich unabhängig von der Konzentration des ersten Antikörpers für die Messwerte der 100 pg/ml rekombinanten Calbindins wie auch der Nullwerte eine Zunahme auf das Dreifache (Tabelle 18).

	Konzentration 2. Antikörper	Nullwert	Rekombinantes Calbindin 100 pg/ml
1. Antikörper 1:800	1:1000	0,248 ± 0,013	0,264 ± 0,001
	1:500	0,409 ± 0,042	0,414 ± 0,008
	1:200	0,940 ± 0,025	0,972 ± 0,064
1. Antikörper 1:400	1:1000	0,174 ± 0,000	0,186 ± 0,001
	1:500	0,257 ± 0,002	0,264 ± 0,001
	1:200	0,576 ± 0,063	0,638 ± 0,030
1. Antikörper 1:200	1:1000	0,177 ± 0,005	0,202 ± 0,004
	1:500	0,245 ± 0,013	0,280 ± 0,007
	1:200	0,594 ± 0,008	0,640 ± 0,009

Tabelle 18: 450 nm Messwerte variierender Konzentrationen des 1. und des 2. Antikörpers. Gegenübergestellt der Nullwert und 10 ng/ml Calbindin.

Die Erfassung der Streuung der Messwerte erfolgte mittels der Variationskoeffizienten, die gesondert in Abbildung 18 dargestellt sind. Für die Positiv Proben zeigte sich bei Verwendung der 1:800 Verdünnung des ersten Antikörpers eine Zunahme der Variationskoeffizienten mit steigender Konzentration des zweiten Antikörpers. Bei gleichzeitig niedrigeren Variationskoeffizienten im Falle einer 1:400 Verdünnung des ersten Antikörpers, waren diese für die 1:200 Verdünnung des Antikörpers bei geringeren Konzentrationen des zweiten Antikörpers deutlich höher (Tabelle 19).

	Konzentration 2. Antikörper	Nullwert	Rekombinantes Calbindin 100 pg/ml
1. Antikörper 1:800	1:1000	0,0513	0,0054
	1:500	0,1021	0,0188
	1:200	0,0271	0,0655
1. Antikörper 1:400	1:1000	0,0000	0,0038
	1:500	0,0083	0,0027
	1:200	0,1094	0,0477
1. Antikörper 1:200	1:1000	0,0280	0,0210
	1:500	0,0520	0,0253
	1:200	0,0143	0,0144

Tabelle 19: Variationskoeffizienten der 450 nm Messungen variierender Konzentrationen des 1. und 2. Antikörpers im ELISA. Abbildung der Nullwerte und der Werte für 10 ng/ml Calbindin.

Die Hintergrundwerte der unterschiedlichen Kombinationen der Antikörperverdünnungen zeigten bei Verwendung der 1:400 Verdünnung des ersten Antikörpers in den geringen Konzentrationen des zweiten Antikörpers Variationskoeffizienten die deutlich unter den Vergleichsansätzen der 1:800 und der 1:200 Verdünnungen lagen.

Eine Konzentrationssteigerung des ersten Antikörpers war zur Signalmaximierung nicht notwendig. Eine Erhöhung der Konzentration des zweiten Antikörpers wurde bei gleichzeitig ansteigenden Hintergrundwerten und rückläufiger Signal-to-Noise-Ratio zurückgestellt. Eine weiterführende Anpassung der Antikörperkonzentration des ersten und zweiten Antikörpers zur Sensitivitätsmaximierung wurde nicht weiterverfolgt.

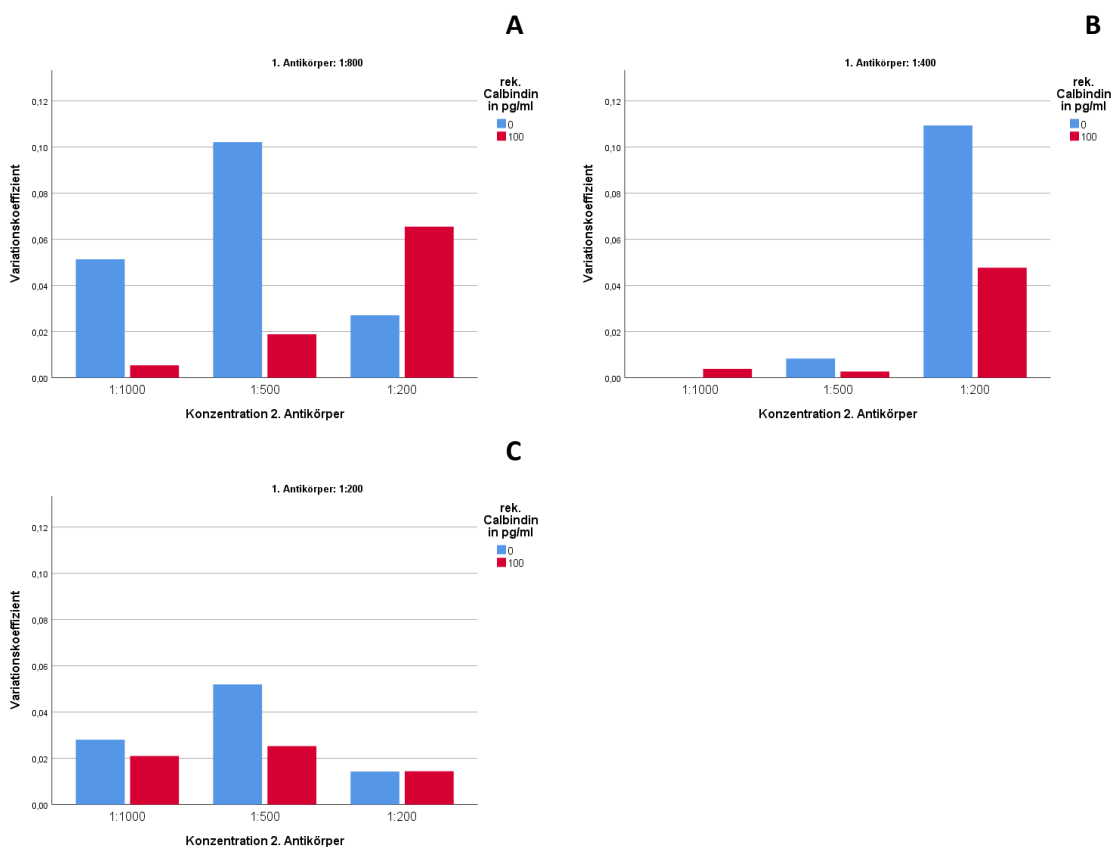


Abbildung 18: Säulendiagramm der Variationskoeffizienten der Anpassung des 2. Antikörpers im ELISA. Messwertpaare der 450 nm Messungen für 0 pg/ml sowie 100 pg/ml rekombinanten Calbindins, aufgeteilt nach der Konzentration des 1. Antikörpers 1:800 (A), 1:400 (B) und 1:200 (C). Im Diagramm sind die Balkenpaare nach der Konzentration des zweiten Antikörpers aufgeteilt. Auf der y-Achse der Variationskoeffizient.

4.2.5 Abstimmung des signalentwickelnden 3. Antikörper

Die entscheidende Anpassung der Signalentwicklung erfolgte durch den 3. Antikörper. Der die Farbreaktion ermöglichende HRP-Anti-Rabbit-IgG Antikörper wurde im V5-Protokoll in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Es zeigte sich, wie im Balkendiagramm in Abbildung 18 dargestellt eine signifikante Abhängigkeit der Signalentwicklung der Proteinprobe aber auch des Hintergrunds von der eingesetzten Konzentration des dritten Antikörpers ($p < 0,001$). Für eine Konzentration von 1:1000 lag der Messwert der eingesetzten Proteinkonzentration von 1000 pg/ml in der Mitte des messbaren Bereichs wie die 450 nm Messwerte in Tabelle 20 zeigen.

Rekombinantes Calbindin in pg/ml	Konzentration des 3. Antikörpers		
	1:1000	1:2000	1:4000
0	0,181 ± 0,030	0,114 ± 0,002	0,078 ± 0,002
100	0,267 ± 0,016	0,163 ± 0,008	0,112 ± 0,016
1000	1,980 ± 0,056	1,122 ± 0,044	0,607 ± 0,027

Tabelle 20: Darstellung der Messwerte der 450 nm Messungen verschiedener Konzentrationen des 3. Antikörpers im ELISA. Eingesetzt 0, 100 und 1000 pg/ml rekombinantes Calbindin.

Eine Unterscheidung des Hintergrundes von 100 sowie 1000 pg/ml rekombinanten Proteins war für jede betrachtete Antikörper-Konzentration möglich. Die Signalzunahme lag für die 1:1000 Verdünnung bei 147 % für 100 pg/ml rekombinanten Calbindins und einer Zunahme auf das elffache bei 1000 pg/ml rekombinanten Proteins gegenüber dem Nullwert.

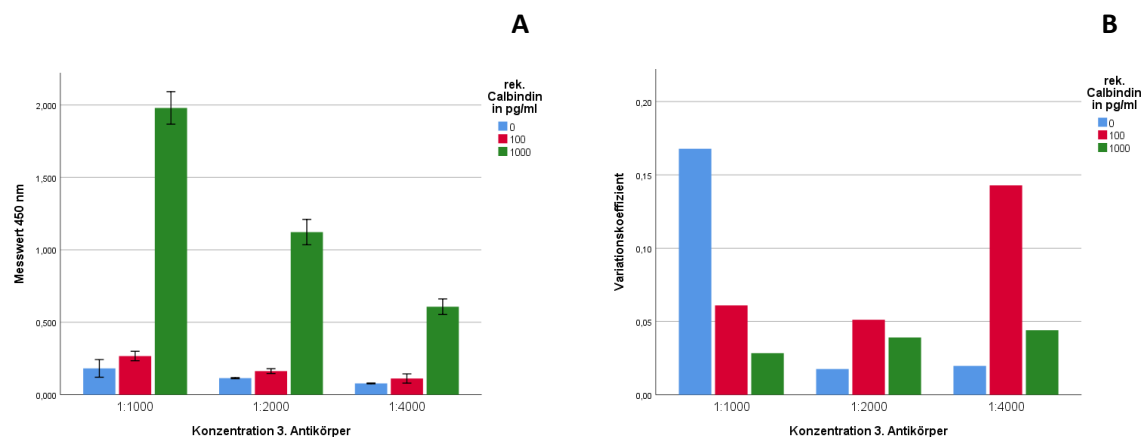


Abbildung 19: Säulendiagramm der ELISA 450 nm Duplikat-Messwerte der Anpassung des 3. Antikörpers. Die Messwerte (A) und der entsprechenden Variationskoeffizienten (B) für 0, 100 und 1000 pg/ml, unterteilt nach der Konzentration des 3. Antikörpers auf der x-Achse. Die Fehlerbalken zeigen ± 2 Standardabweichungen.

Im Vergleich hierzu zeigte sich bei der 1:2000 Verdünnung eine Signalzunahme auf 143 % des Nullwerts für 100 pg/ml rekombinanten Calbindins und für 1000 pg/ml rekombinantes Calbindin das zehnfache Signal des Nullwerts. Die Antikörperverdünnung von 1:4000 zeigte gegenüber dem Nullwert eine Signalsteigerung auf 144 % für 100 pg/ml rekombinanten Calbindins und auf das achtfache des Nullwerts für 1000 pg/ml rekombinantes Protein. Eine signifikante

Abhängigkeit der Variationskoeffizienten von der Antikörper-Konzentration bildete sich nicht ab ($p = 0,598$). Für die Antikörper-Konzentration von 1:1000 zeigte sich bei 1000 pg/ml rekombinanten Calbindins der niedrigste Variationskoeffizient ($CV = 0,028$) im Vergleich zu den anderen Verdünnungen 1:2000 ($CV = 0,039$) und 1:4000 ($CV = 0,044$) des HRP-Anti-Rabbit-IgG (Tabelle 21).

Im Vergleich der eingesetzten Konzentrationen zeigte sich für eine Verdünnung von 1:1000 die größte Signalentwicklung. Der 3. Antikörper wurde abschließend in einer Konzentration von 1:1000 eingesetzt.

Rekombinantes Calbindin in pg/ml	Konzentration des 3. Antikörpers		
	1:1000	1:2000	1:4000
0	0,1678	0,0175	0,0197
100	0,0610	0,0512	0,1428
1000	0,0284	0,0390	0,0440

Tabelle 21: Darstellung der Variationskoeffizienten der 450 nm Messungen verschiedener Konzentrationen des 3. Antikörpers im ELISA. Eingesetzt 0, 100 und 1000 pg/ml rekombinantes Calbindin.

4.2.6 Erprobung des Blockpuffers

Neben der maximalen Signalentwicklung sollte auch der Hintergrund möglichst gering gehalten werden. Über die Anpassung der Antikörperkonzentrationen hinaus, sollte die Minimierung des Hintergrundes durch unspezifische Proteinbindungen durch eine bestmögliche Blockierung erzielt werden. Für die Blockierung konnten unterschiedliche Ansätze verglichen werden. Neben den allgemeinen BSA- und Milchpulver-basierten Systemen wurden auch spezifische Seren eingesetzt. Die Messwerte der 450 nm Messungen sind als Balkendiagramm für unterschiedliche Proteinkonzentrationen sowie den Nullwert in Abbildung 20 aufgetragen. Im Vergleich unterschiedlicher Blockpuffer im V4-Protokoll zeigten hier BSA-basierte Systeme niedrige Hintergrundwerte mit im Vergleich guter Signalentwicklung der Proteinproben.

Die Signalzunahme der Probe mit 100 pg/ml rekombinanten Calbindin lag bei Verdünnung des Antikörpers in 0,4 % BSA bei 26 % gegenüber dem Signal des Nullwerts. Im Fall der Antikörperverdünnung in 2 % BSA entsprach das Signal bei 100 pg/ml rekombinanten Calbindin 112 % des Hintergrundes. Für die 500 pg/ml rekombinanten Calbindin Probe entsprach das Signal für die Antikörperverdünnung mit 0,4 % BSA einer Zunahme von 58 % gegenüber dem Nullwert und einer Signalsteigerung um 62 % bei der 2 % BSA Antikörperverdünnung (Tabelle 22). In diesem System wurde die größte Korrelation $r = 0,986$ ($p < 0,001$) bestimmt.

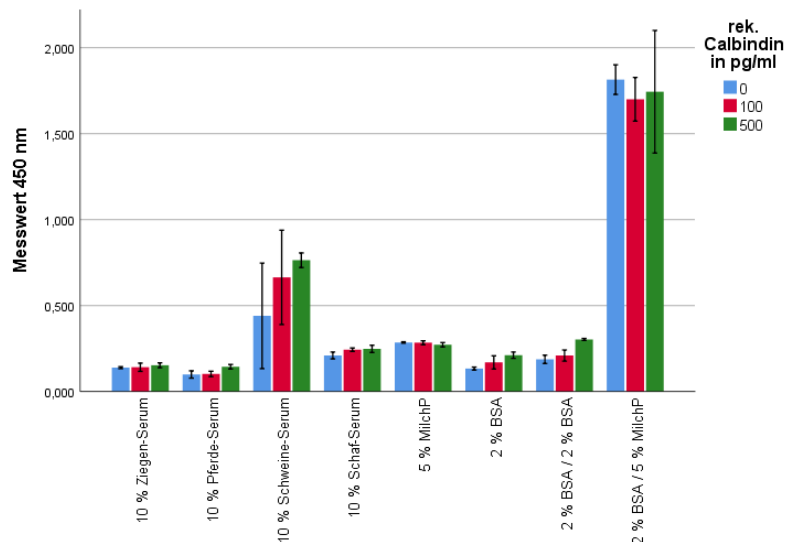


Abbildung 20: Säulendiagramm der ELISA 450 nm Messwerte unterschiedlicher Blockierungspuffer. 500 pg/ml, 100 pg/ml, sowie 0 pg/ml rekombinanten Calbindins auf der y-Achse aufgeteilt nach dem eingesetzten Blockierungspuffer auf der x-Achse. Die Antikörperverdünnung erfolgte dabei in 0,4 % BSA. Für einen Ansatz erfolgte die Blockierung sowie die Antikörperverdünnung in 2 % BSA (2 % BSA / 2 % BSA), in einem weiteren Ansatz die Antikörperverdünnung in 5 % Milchpulver (2 % BSA / 5 % MilchP). Die Fehlerbalken zeigen ± 2 Standardabweichungen.

Die ergänzende Kontrolle in einem Milchpulver-basierten System als Antikörper-Verdünnungsmittel – entsprechend eines Western Blots – ergab Messwerte die bis zu zehnfach über den Messwerten anderer Puffersysteme lagen, jedoch ohne signifikante Differenzierung des Nullwerts ($p = 0,759$). Dargestellt ist die Signal-to-Noise-Ratio in Abbildung 21.

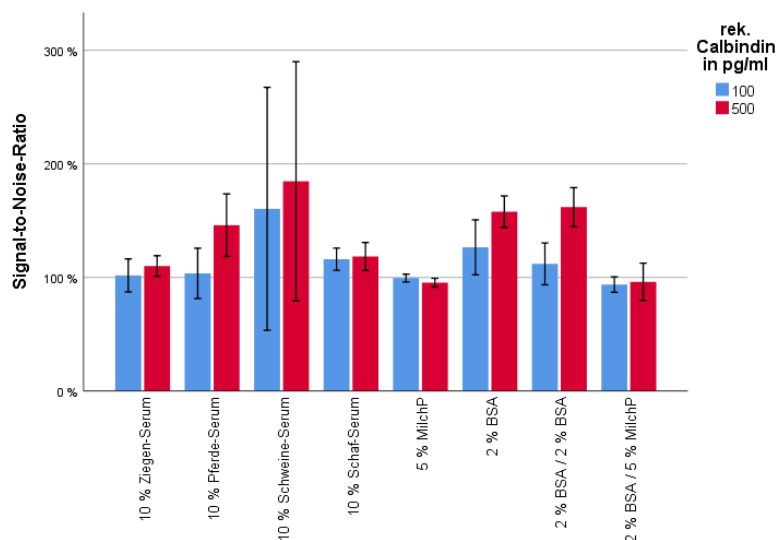


Abbildung 21: Säulendiagramm der Signal-to-Noise-Ratio der ELISA 450 nm Messungen. 500 pg/ml und 100 pg/ml rekombinanten Calbindins in Bezug auf den jeweiligen Nullwert auf der y-Achse aufgeteilt nach dem eingesetzten Blockierungspuffer auf der x-Achse. Die Fehlerbalken zeigen ± 2 Standardabweichungen.

Bei Verwendung einer Milchpulver-basierten Blockierung zeigte sich eine negative Korrelation der Messwerte mit steigender Konzentration $r = -0,848$ ($p = 0,033$). Bei 100 pg/ml rekombinanten Calbindin lag das Signal bei 0,5 % und bei 500 pg/ml rekombinanten Calbindin bei 4,5 % unter dem Nullwert.

Die Blockierung mit 10 % Pferde-Serum zeigte von allen untersuchten Ansätzen den niedrigsten Hintergrund. Die Konzentration korrelierte signifikant mit steigenden Messwerten $r = 0,952$ ($p = 0,003$). Der Unterschied von 100 pg/ml rekombinanten Calbindin gegenüber dem Nullwert zeigte dabei lediglich eine Signalzunahme von 3 %.

Für die Blockierung mit 10 % Ziegen-Serum lag die Signalzunahme der Probe 100 pg/ml rekombinanten Calbindin ebenfalls bei nur 1,8 % gegenüber dem Nullwert. Eine signifikante Korrelation war nicht gegeben ($p = 0,104$).

Blockpuffer	Nullwert	Rekombinantes Calbindin	
		100 pg/ml	500 pg/ml
10 % Ziegen-Serum	0,139 ± 0,002	0,142 ± 0,010	0,153 ± 0,006
10 % Pferde-Serum	0,100 ± 0,009	0,103 ± 0,006	0,145 ± 0,005
10 % Schweine-Serum	0,441 ± 0,125	0,664 ± 0,112	0,764 ± 0,017
10 % Schaf-Serum	0,210 ± 0,008	0,244 ± 0,004	0,249 ± 0,009
5 % Milchpulver	0,286 ± 0,002	0,284 ± 0,005	0,273 ± 0,005
2 % BSA	0,134 ± 0,003	0,170 ± 0,016	0,212 ± 0,008
2 % BSA (2 % BSA in Antikörper-Verdünnung)	0,188 ± 0,010	0,210 ± 0,013	0,303 ± 0,002
2 % BSA (5 % Milchpulver in Antikörper-Verdünnung)	1,815 ± 0,035	1,700 ± 0,052	1,744 ± 0,145

Tabelle 22: 450 nm Messungen unterschiedlicher ELISA-Blockpuffervarianten. Messwerte für 0, 100 und 500 pg/ml rekombinantes Calbindin.

Nicht nur die Beschaffenheit des Blockpuffers, sondern auch die Dauer der Inkubation waren entscheidend für niedrige Hintergrundwerte. Die längere Blockierung im V2-Protokoll zeigte bei sehr hoher eingesetzter Proteinkonzentration eine deutlich Reduktion der Mittelwerte der Messungen bei 450 nm in Abhängigkeit der Dauer der Blockierung. Wie Abbildung 22 zeigt war ein Zusammenhang der Messwerte und der Dauer der Blockierung bis zu einer Antikörper-Konzentration von 1:500 zu sehen. Statistisch signifikant war die Korrelation nur bei fehlendem ersten Antikörper $r = -0,973$ ($p = 0,27$). Ab einer Antikörper-Verdünnung von 1:500 wurden Messwerte im Sättigungsbereichs bestimmt (Tabelle 23). Hierbei lag der Mittelwert der Messung der Über-Nachts-Blockierung bei 84 % der für eine Stunde blockierten Probe. Bei einer niedrigeren Antikörper-Konzentration von 1:1000 zeigte die Über-Nacht-Blockierung nur noch einen Messwert der 67 % der einstündigen Blockierung entsprach. Bei fehlendem Beschichtungsantikörper lagen die Messwerte der Über-Nacht-Blockierung bei 74 % der Blockierung für eine Stunde.

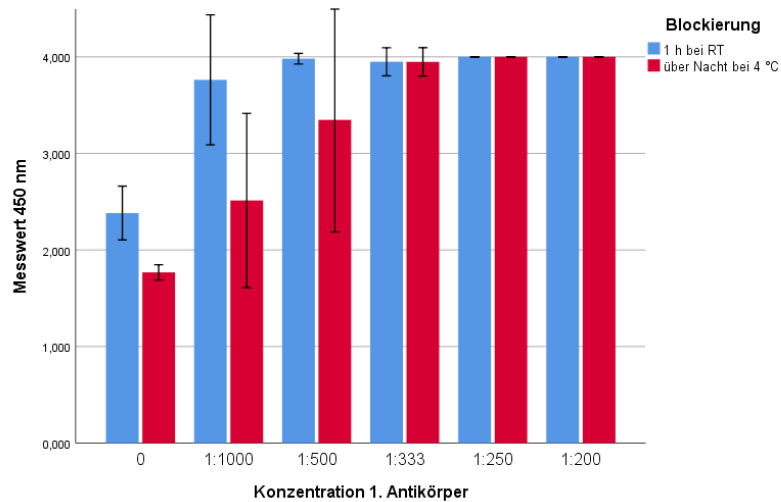


Abbildung 22: Säulendiagramm der ELISA 450 nm Messungen unterschiedlicher Konzentrationen des 1. Antikörpers und Variation der Blockierungsdauer. 10 ng/ml rekombinanten Calbindins auf der y-Achse aufgeteilt nach der eingesetzten Konzentration des ersten Antikörpers auf der x-Achse. Im Direktvergleich dabei eine Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur in blau gegen eine Inkubation über Nacht bei 4 °C in rot. Die Fehlerbalken zeigen ± 2 Standardabweichungen.

Final eingesetzt wurde sowohl zur Blockierung als auch zur Antikörper Verdünnung ein mit 2 % BSA versetzter Puffer. Bei einem deutlichen Vorteil der Blockierung bei Raumtemperatur, erfolgte die Inkubation für 2,5 Stunden.

Konzentration 1. Antikörper	1 h bei RT	ü.N. bei 4 °C
0	2,383 \pm 0,139	1,768 \pm 0,040
1:1000	3,762 \pm 0,337	2,512 \pm 0,451
1:500	3,981 \pm 0,028	3,348 \pm 0,581
1:333	3,949 \pm 0,073	3,948 \pm 0,735
1:250	4,000 \pm 0,000	4,000 \pm 0,000
1:200	4,000 \pm 0,000	4,000 \pm 0,000

Tabelle 23: Vergleich der 450 nm Messwerte unterschiedlicher Blockierungsdauer. Werte für 10 ng/ml Calbindin variierender Konzentrationen des 1. Antikörpers einer Blockierung über Nacht bei 4 °C mit einer Blockierung für eine Stunde bei Raumtemperatur.

4.2.7 Relevanz von Calcium im Puffersystem

In Zusammenhang mit deutlich schwankenden Messwerten und zum Teil ausbleibender Signalentwicklung sollte die Testreliabilität gewährleistet werden. Eine deutlich ausgeprägtere Signalentwicklung wurde bereits in einer Milchpulver-basierten Antikörperverdünnung gesehen. Bei einer damit deutlich Calcium-reicheren Testumgebung erfolgte die Erprobung der Calcium-Abhängigkeit der Antigen-Detektion. In der Untersuchung unterschiedlicher Proben bestanden in einem Calcium freien Puffersystem deutliche Schwankungen der Messwerte. Die

Calcium-Abhängigkeit der Detektion des rekombinanten Calbindins konnte nach Versetzen des Puffers mit 1 mM CaCl₂ gezeigt werden, wie in Abbildung 23 zu sehen ist.

In der Gegenüberstellung ließ sich das rekombinante Calbindin in einem Calcium-Ionen freien Puffer-System – bei einem Unterschied von 2,6 % der Positiv-Probe gegenüber dem Nullwert – nicht darstellen, das Cerebellum-Lysat lieferte hingegen mehr als das 20-fache des Hintergrundwertes (Tabelle 24).

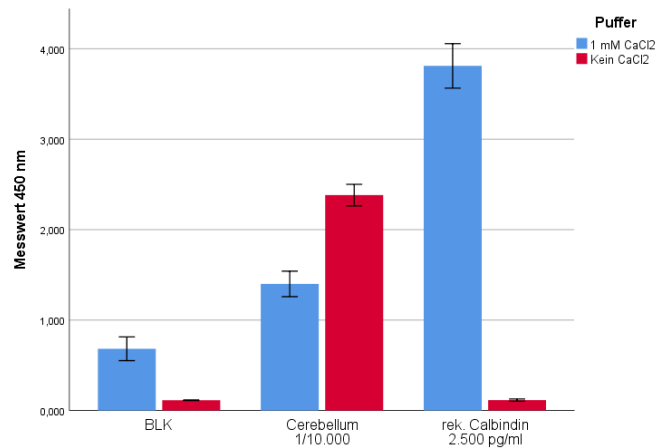


Abbildung 23: Säulendiagramm der ELISA 450 nm Messwerte in Abhängigkeit von CaCl₂. Unterschieden nach einem mit 1 mM CaCl₂ versetzten Puffersystem (blau) gegenüber einem nativen Calcium-freien System (rot). Auf der x-Achse sind die einzelnen Proben aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen ± 2 Standardabweichungen.

Unter Verwendung eines Puffers mit 1 mM CaCl₂ zeigten sich bei gleichzeitig höheren Hintergrundwerten für rekombinantes Calbindin Messwerte nahe der Sättigung, die einem fünf-fachen des Nullwerts entsprachen, gegenüber dem Cerebellum-Lysat das im Vergleich niedrige Messwerte – dem doppelten Nullwert entsprechend – ergab.

Probe	1 mM CaCl ₂	Kein CaCl ₂
Nullwert	0,683 \pm 0,066	0,113 \pm 0,001
Cerebellum 1/10.000	1,400 \pm 0,070	2,382 \pm 0,060
Rekombinantes Calbindin 2500 pg/ml	3,810 \pm 0,123	0,116 \pm 0,006

Tabelle 24: Vergleich der 450 nm Messwerte unterschiedlicher Proben in Abhängigkeit von CaCl₂. Vergleich von 1 mM CaCl₂ gegenüber einem Calcium-freien System.

4.2.8 Puffer-System-Vergleich

Die Beimengung von Calcium im Phosphatpuffersystem führte teils zu schwerlöslichen Ablagerungen. Als Alternative wurde dann auf ein Tris-basiertes System umgestellt. Der Vergleich des Tris-Puffer-Systems mit dem Phosphat-Puffer-Systems erfolgte mittels Kurvenvergleich der in Abbildung 24 abgebildeten Standardkurven in doppelt-logarithmierter

Darstellung, wobei sich insbesondere Abweichungen im unteren Bereich der Messskala ergaben.

In der 450 nm Rohwertmessung erzielten beide Puffersystem für den S1 und den S8 Standardrang, entsprechend 2500 pg/ml und 19 pg/ml ähnliche Wert. In der Betrachtung des Kurvenverlaufs zeigte das Tris-Puffersystem im Vergleich für die Standardränge S8 – S6 (19,5 – 78 pg/ml) zunächst eine geringere Steigung, ab S5 (156 pg/ml) eine höhere Steigung als das Phosphat-basierte-System (Abbildung 24 A). Ähnliches zeigte sich so auch für die 550 nm korrigierten Messwerte. Nach Abzug des Hintergrunds von den 450 nm Messwerten bestanden im Tris-Puffersystem deutlich niedrigere Messwerte der Standard-Werte S8 – S2 (19,5 – 1250 pg/ml) bei gleichzeitig erheblich steilerer Steigung wurde ein vergleichbares Maximum für S1 (2500 pg/ml) erzielt (Abbildung 24 C). Für die doppelt-korrigierten Messwerte stellten sich bei erneut steilerer Steigung des Tris-Puffersystems für die Standard-Ränge S1 und S2 vergleichbare Werte zu dem Phosphat-Puffersystem ein. Im doppelt-korrigierten System unterschieden sich die beiden Kurven mit steigender Verdünnung bis zu einer Konzentration von 300 pg/ml um maximal 20 %. Mit weiter abfallenden Konzentrationen steigt dies auf zuletzt 44 % für den S8 Standardrang bei 19 pg/ml (Abbildung 24 D).

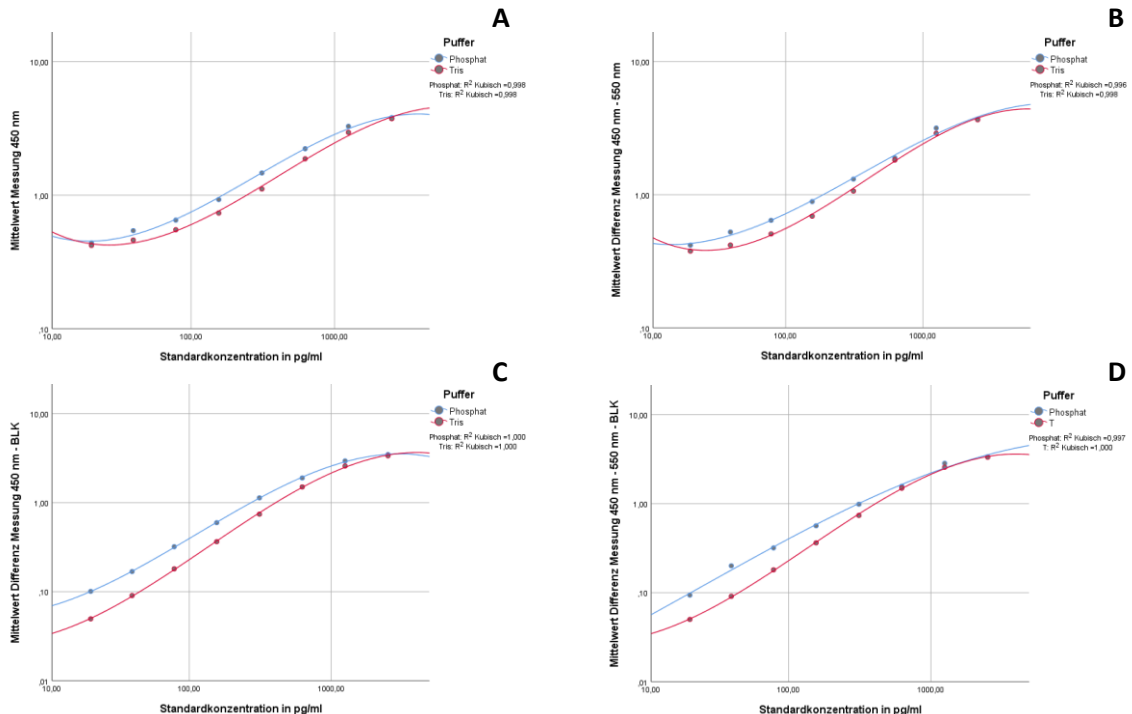


Abbildung 24: Darstellung der Standardkurven der unterschiedlichen ELISA Puffersysteme im Vergleich. In blau das Phosphat-Puffer-System, in rot das Tris-Puffer-System. Die Darstellung ist in doppelt-logarithmierter Skala. Auf der x-Achse die Konzentrationswerte. Auf der y-Achse die Messwerte der 450 nm Messung (A), der 550 nm korrigierten Messung (B), der Hintergrund-korrigierten 450 nm Messung (C) und der doppelt-korrigierten 450 nm Messung (D). In allen Darstellungen je die kubische Anpassungslinie. Kurvenverlauf außerhalb der Standardwerte Polynom-bedingt.

Das Tris-Puffersystem zeigte in der Standardkurve keine Nachteile gegenüber dem Phosphat-Puffersystem, das Ausfallen von Calciumphosphat-Salzen konnte vermieden werden, weshalb dieses System bei reliableren Testbedingungen bevorzugt wurde.

4.2.9 Statistische Validierung

Die gesammelten Daten der durchgeführten ELISA Untersuchungen konnten zu einer statistischen Validierung zusammengeführt werden. Die Differenzierung der einzelnen Standarddränge wurde um die statistischen Messgrößen der Intra- sowie der Inter-Test-Varianz ergänzt.

4.2.9.1 Standardleiter

Die Untersuchung der Messdaten der Standardleiter konnte eine Unterscheidung der einzelnen Ränge vorzeigen. Die 450 nm Messwerte der acht Standarddränge (S1 – S8) wurden im paarweisen Vergleich betrachtet. Hier zeigte sich keine signifikante Unterscheidung der Standarddränge S7 und S8 – entsprechend 19 und 39 pg/ml ($p = 1,000$) – sowie der Standarddränge S6 und S7 – entsprechend 39 und 78 pg/ml ($p = 0,191$). Auch nach Abzug des Spektrum-korrigierenden 550 nm Messwertes konnten die Ränge S8 von S7 ($p = 1,000$) und S7 von S6 ($p = 0,191$) nicht signifikant unterschieden werden. Mittels der Hintergrund-Korrektur durch Abzug des Blank-Wertes konnten alle Standarddränge im Paarvergleich signifikant voneinander unterschieden werden ($p < 0,001$).

Die Kombination beider Korrekturberechnungen führte zu keiner Abnahme der Aussagekraft. Im Paarvergleich in der Bonferroni-Korrektur konnten weiterhin alle Standarddränge signifikant voneinander unterschieden werden ($p < 0,001$). Anhand dieser korrigierten Werte – nach Abzug des Blank-Wertes sowie Abzug der Spektrumkorrektur des 550 nm-Wertes – erfolgte die Konzentrationszuordnung und Standardberechnung. Graphisch dargestellt sind die Standardleitern in Abbildung 25 als Boxplot.

In der Standardisierung der Standardleiter eines jeden Tests auf den jeweilig korrespondierenden S2-Mittelwert – zum Ausschluss verzerrender Fluktuationen der Farbentwicklung zwischen unterschiedlichen Test Ansätzen – konnten für die standardisierten 450 nm Messwerte im paarweisen Vergleich der S8 Standarddrang (19 pg/ml) ebenfalls nicht signifikant von dem S7 Standarddrang (39 pg/ml) unterschieden werden ($p = 1,000$). In der Boxplotdarstellung zu sehen in Abbildung 26 zeigen die Messwerte jeder standardisierten Korrektur eine deutlichere Abgrenzung der Quartile insbesondere im oberen Messbereich des ersten und zweiten Standarddrangs.

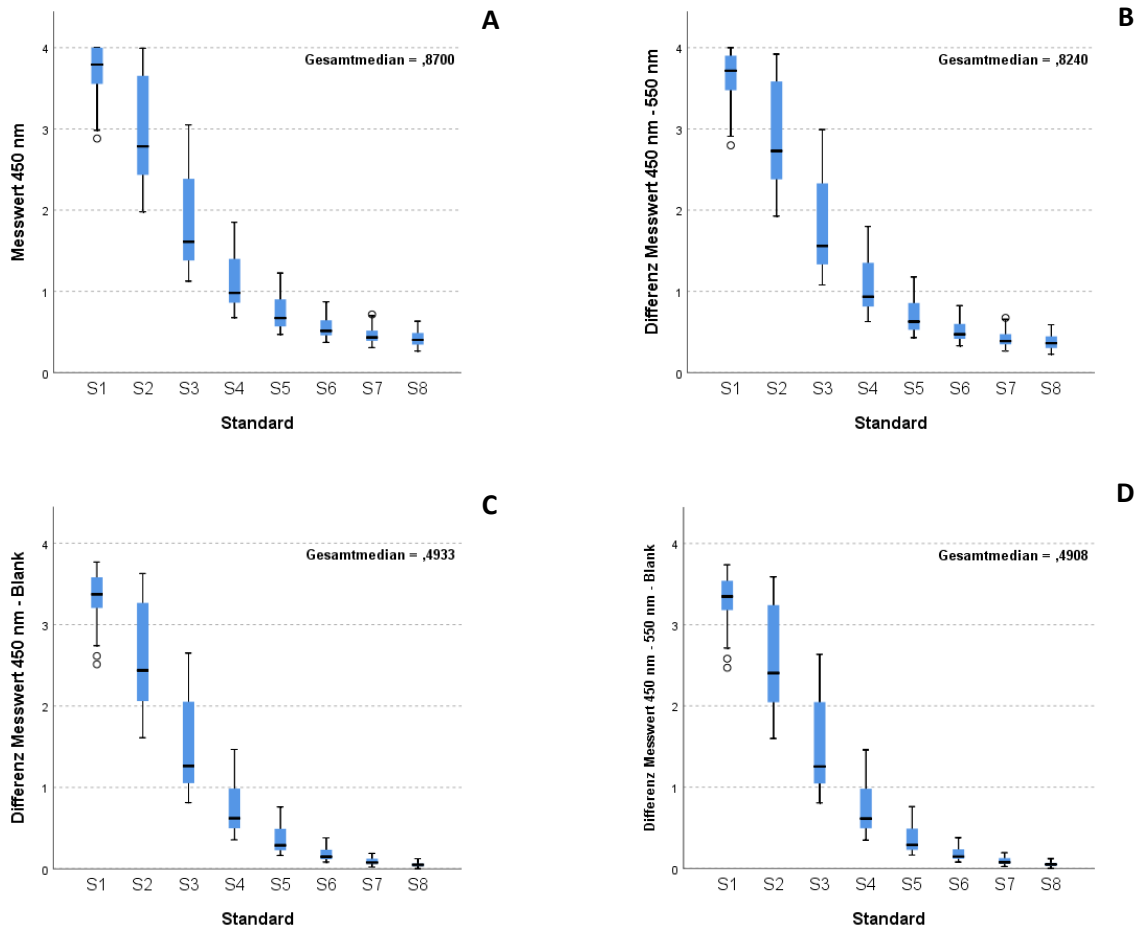


Abbildung 25: Graphische Darstellung des Mediantests der ELISA Standardwerte als Boxplots. Standardwerte definiert als Ränge auf der x-Achse. Darstellung der nativen 450 nm Messwerte (A). Differenz der 550 nm Messwerte von den 450 nm Messwerten (B). Differenz der Blank-Werte von den 450 nm Messwerten (C). Differenz der 550 nm und der Blank-Werte von den 450 nm Messwerten (D).

Die standardisierten Wellenlängen-korrigierten Messwerte konnten signifikant von einander unterschieden werden ($p < 0,001$), für S6 und S7 ($p = 0,007$). Aufgeführt sind die korrespondierenden Boxplot Grafiken in Abbildung 26. Lediglich der paarweise Vergleich von S7 und S8 zeigte keinen Unterschied ($p = 1,000$). Nullwert korrigierte und auf die Test-spezifischen S2-Werte standardisierten Messwerte der 450 nm Messung konnten für jeden Paarvergleich der Standardränge signifikant von einander unterschieden werden ($p < 0,001$). Die Betrachtung der standardisierten, doppelt korrigierten Messwerte zeigt für jeden Paarvergleich der Standardränge einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$).

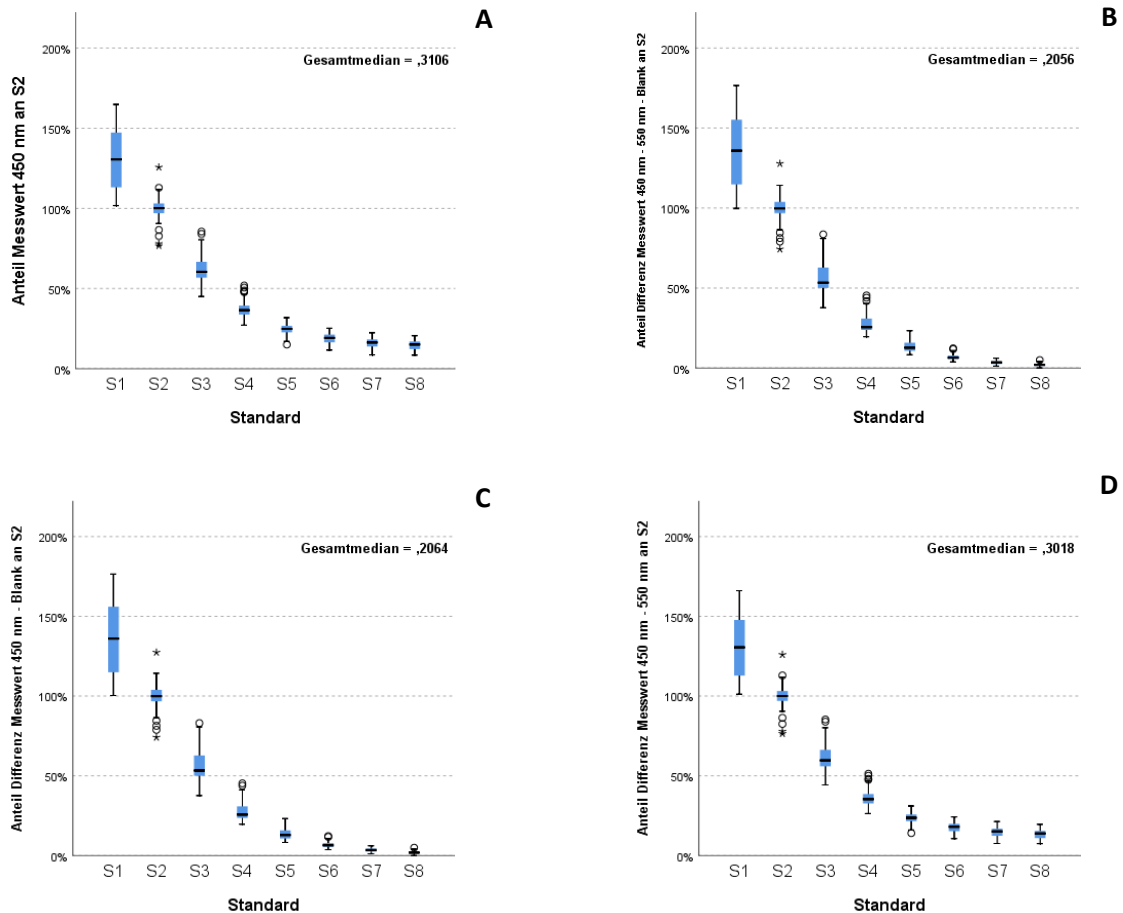


Abbildung 26: Graphische Darstellung des Mediantests der standardisierten ELISA Standardwerte als Boxplots. Standardwerte definiert als Ränge S1 bis S8 auf der x-Achse. Darstellung der auf den jeweiligen S2 Rang standardisierten Werte, die standardisierten 450 nm Messwerte (A). Standardisierte Werte der Differenz der 550 nm Messwerte von den 450 nm Messwerten (B). Standardisierte Werte der Differenz der Blank-Werte von den 450 nm Messwerten (C). Standardisierte Werte der doppelt korrigierten Messwerte (D).

4.2.9.2 Intra-Test-Varianz

Als Messgröße der Schwankung der Messwerte innerhalb des Testablaufs einer 96-Well-Platte erfolgte die Berechnung der Intra-Test-Varianz mittels der konzentrationsunabhängigen Variationskoeffizienten der errechneten Konzentrationswerte. Einbezogen in die Berechnung wurden 525 Triplikate, die Darstellung als Histogramm ist Abbildung 27 zu entnehmen. Der Mittelwert aller errechneter Variationskoeffizienten der eingeschlossenen Triplikate wurde als Intra-Test-Varianz auf $0,063 \pm 0,056$ bestimmt.

Der Variationskoeffizient nahm mit sinkender Protein-Konzentration zu. Die größten Werte der Variationskoeffizienten von $CV = 0,429$ wurden für eine Range unter 100 pg/ml erreicht ($M_{<100} = 0,116 \pm 0,082$). Im linearen Messbereich lagen die mittleren Variationskoeffizienten mit unter 0,100 ($M_{lin} = 0,065 \pm 0,048$).

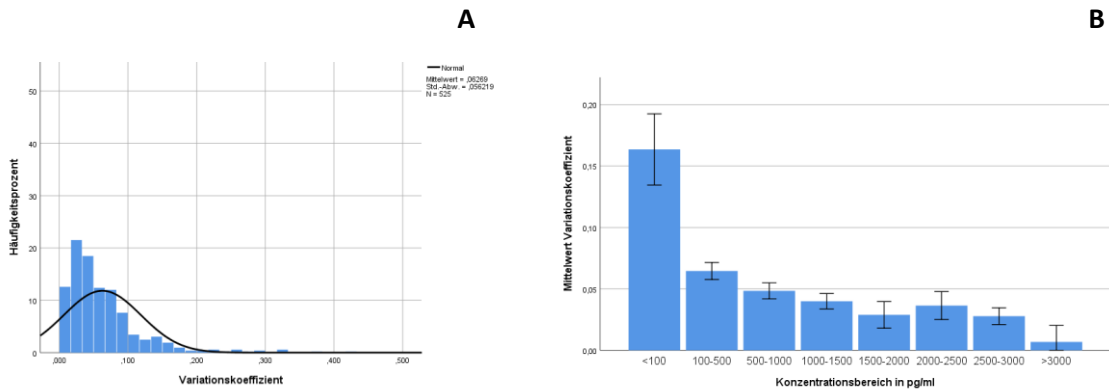


Abbildung 27: Darstellung der Variationskoeffizienten der Intra-Test-Varianz des ELISA. Histogramm (A): Auf der x-Achse des Histogramms ist der Variationskoeffizient, auf der y-Achse die Häufigkeit dargestellt. In der Legende dargestellt der Mittelwert der Variationskoeffizienten, die Standardabweichung, sowie die Anzahl untersuchter Triplikate N. Balkendiagramm (B): Darstellung der Variationskoeffizienten der Intra-Test-Varianz als Balkendiagramm. Auf der x-Achse sind die Konzentrationsbereiche, auf der y-Achse der Variationskoeffizient abgebildet. Die Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall.

Die zusätzlich erfolgte differenzierte Betrachtung der Variationskoeffizienten nach der Triplikatuordnung (Abbildung 28) zeigte für die Triplikate 7 und 8 zunehmende Werte der Variationskoeffizienten, die isoliert über 0,100 lagen. Die Triplikate entsprachen dabei den Standardrängen S7 und S8 – also 39 und 19 pg/ml rekombinanten Calbindins. Dargestellt als Balkendiagramm ist dies in Abbildung 29.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	9	9	9	17	17	17	25	25	25
B	2	2	2	10	10	10	18	18	18	26	26	26
C	3	3	3	11	11	11	19	19	19	27	27	27
D	4	4	4	12	12	12	20	20	20	28	28	28
E	5	5	5	13	13	13	21	21	21	29	29	29
F	6	6	6	14	14	14	22	22	22	30	30	30
G	7	7	7	15	15	15	23	23	23	31	31	31
H	8	8	8	16	16	16	24	24	24	32	32	32

Abbildung 28: Nummerierung der Triplikate nach Lokalisation auf der 96-Well-Test-Platte. Die Standardleiter wurde aufgetragen in den Triplikaten 1 – 8. Triplikat 32 entspricht dem Blank-Wert.

Die Kovarianzanalyse mittels ANCOVA ergab unter Ausschluss der Standardleiter (Triplikate 1 – 8) und der Vereinfachung der Konzentrationen in die in Abbildung 27 (B) aufgeführten Bereiche als festen Faktor ein partielles Eta-Quadrat $\eta^2 = 19,0 \%$ und damit einen großen Einfluss der Konzentration auf die Betrachtung des Variationskoeffizienten als abhängigen Faktor. Die Triplikat-Position hatte keine signifikanten Einfluss.

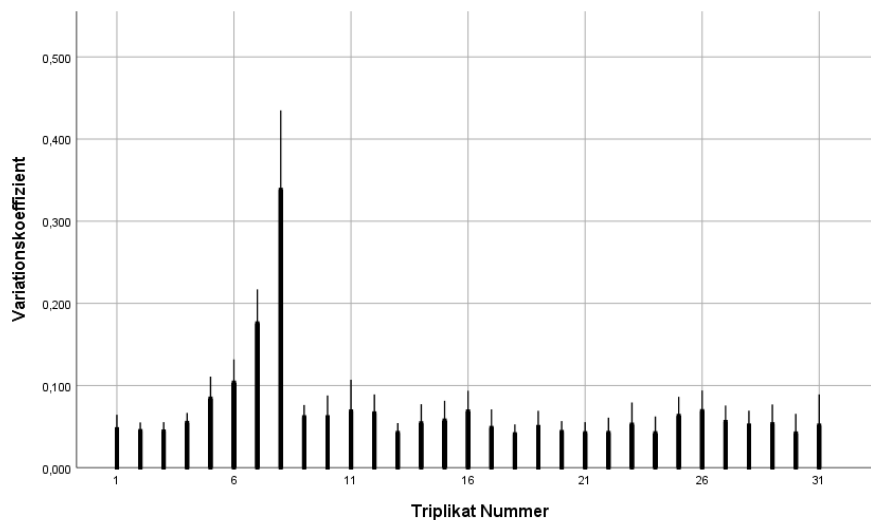


Abbildung 29: Säulendiagramm der Mittelwerte der Variationskoeffizienten der Intra-Test-Varianz des ELISA. Darstellung nach Verteilung des Triplikats auf der Test-Platte. Auf der x-Achse ist das jeweilige Triplikate Test-Platten-übergreifend aufgeführt. Nummerierung nach Abbildung 28. Auf der y-Achse ist der Variationskoeffizient-Mittelwert dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall.

4.2.9.3 Inter-Test-Varianz

Als Aussagewert der Schwankung von Messwerten in unterschiedlichen Testansätzen wurde die Inter-Test-Varianz berechnet und ist grafisch in Abbildung 30 zusätzlich im Histogramm abgebildet. Die bestimmte Inter-Test-Varianz über alle Proben lag bei $0,079 \pm 0,056$, wobei alle Werte unter 0,25 lagen. In der Betrachtung der Inter-Test-Varianz nach eingesetzter Proteinkonzentration stellten sich für den Bereich < 100 pg/ml der größte Variationskoeffizient dar ($CV_{<100} = 0,104$). Im linearen Messbereich ab 100 pg/ml lag der Mittelwert des jeweiligen Konzentrationsbereichs unter 0,09.

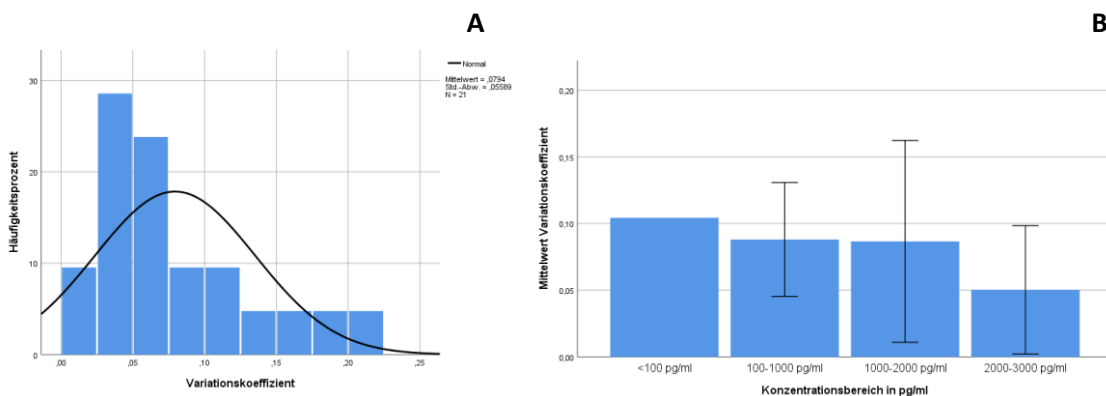


Abbildung 30: Darstellung der Variationskoeffizienten der Inter-Test-Varianz des ELISA. (A): Auf der x-Achse ist der Variationskoeffizient, auf der y-Achse die Häufigkeit dargestellt. In der Legende zu sehen ist der Mittelwert der Variationskoeffizienten, die Standardabweichung, sowie die Anzahl der untersuchten Proben. Balkendiagramm (B): Darstellung der Konzentrationsbereiche auf der x-Achse sowie des Variationskoeffizienten auf der y-Achse.

4.3 Gewebeuntersuchung

Nachfolgend aufgeführt sind die Ergebnisse der Analyse der unterschiedlichen Gewebeproben der neun Tiere des Stamms Calb1^{tm1Mpin}. Im Vergleich wurden sowohl die Wildtyp-Tiere den heterozygoten Tieren gegenübergestellt als auch innerhalb der Wildtyp-Tiere nach Alter.

4.3.1 Übersicht der Gewebeproben

Lysat-Proben unterschiedlicher Mausgewebe wurden im ELISA untersucht. Die Untersuchung eines Calbindin Knock-out Tieres diente dabei insbesondere zum abschließenden Ausschluss der Erkennung anderer Calcium-bindender Proteine im ELISA. Die Calbindin-Messwerte der Gewebe-Lysate im ELISA wurden in Bezug zu dem bestimmten Gesamtprotein dargestellt, zu sehen in der Übersicht in Abbildung 31. Aufgeteilt nach Gewebe zeigten die Cerebellum-Proben sowohl im intra- als auch im inter-Tier-Vergleich die höchsten Messwerte in Bezug auf das Gesamtprotein.

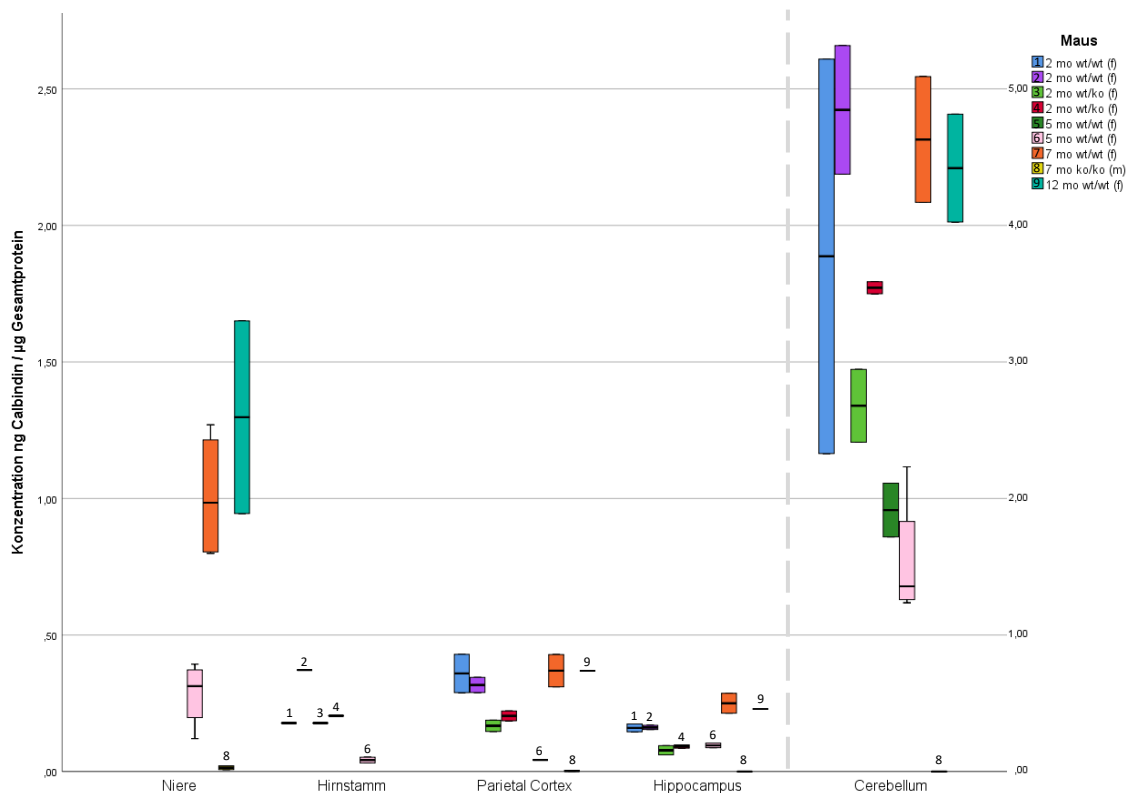


Abbildung 31: Boxplot-Darstellung der Calbindin-Menge in ng je µg Gesamtprotein der untersuchten Gewebeproben. Auf der x-Achse Unterteilung der Gewebe. Farbliche Unterscheidung der einzelnen Tiere, zusätzlich zugeordnete Ziffern zur Differenzierung der Plots. Skalierung der Cerebellum Proben nach der 2. y-Achse rechts.

Auch für die Gewebeproben aus Bauchhaut- und Nebennieren, in Abbildung 31 nicht aufgeführt, wurde mittels t-Test der 450 nm Messwerte kein signifikanter Unterschied zu den Hintergrundwerten gesehen ($p = 0,398$; $p = 0,488$). Die Bauchhaut- und Nebennieren-Probe wurde nur von einem Tier getestet.

4.3.2 Nullwerte im Knock-out Tier

Die Bestimmung von Calbindin im Knock-out Tier mittels des etablierten ELISA Systems verblieb in allen untersuchten Proben negativ. Die Messwerte entsprachen, dabei in etwa den BLANK-Werten der jeweiligen Testplatte. BLANK-korrigiert lagen die Werte um 0. Negative Werte wurden ebenfalls als 0 dargestellt. Die positiven Werte, die unterhalb des unteren Endes der Standardskala noch erfasst wurden, ergaben nach Ausgleich der Verdünnungsfaktoren somit falsch hohe Ergebnisse. Es erfolgte ein t-Test der 450 nm Messwerte. Aufgeteilt nach den drei unterschiedlichen Test-Ansätzen, in denen die Proben der Knock-Out Tiere getestet wurden, bestand in allen Fällen kein signifikanter Unterschied der Proben gegenüber den Hintergrundwerten ($p = 0,264$; $p = 0,178$; $p = 0,247$).

4.3.3 Vergleich der Wildtyp Tiere und heterozygoten Tiere

Im Vergleich der Messwerte der zwei Monate alten heterozygoten Knock-Out Tiere zu den der zwei Monate alten Wildtyp Tieren lagen die Werte im Durchschnitt 38 % unter denen der Wildtyp-Tiere. Aufgeteilt nach Gewebetypen ist der Anteil von Calbindin am Gesamtprotein in Abbildung 32 als Boxplot dargestellt. Die isolierte Betrachtung von Gesamtprotein und Calbindin im Boxplot zeigt Abbildung 33.

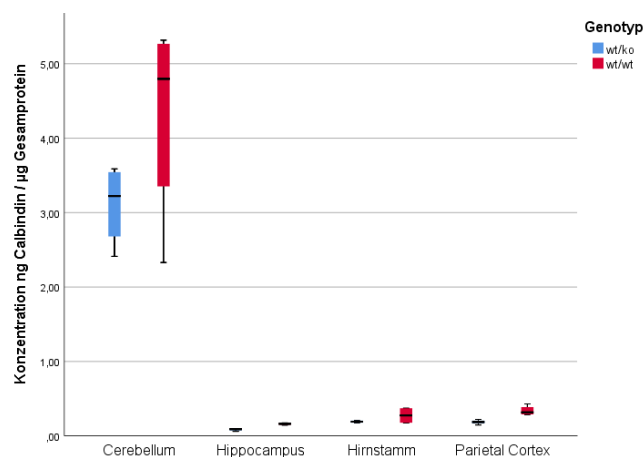


Abbildung 32: Boxplot-Darstellung der Calbindin-Menge in ng je μg Gesamtprotein der Wildtyp und Heterozygoten. Nach der Unterteilung der Gewebeprobe auf der x-Achse. In blau die Proben der heterozygoten Tiere. In rot die Proben der Wildtyp Tiere. Testung der zwei Monate alten Tiere.

Wie Tabelle 25 zu entnehmen, entsprachen für das Cerebellum die gemessenen Konzentrationswerte der heterozygoten Tiere 72 % der Wildtyp-Messwerte. Die Messwerte der Proben des Hirnstamms der heterozygoten Tiere lagen etwa bei 69 % der Messwerte der Gewebeprobe der Wildtyp Tiere. Die Messwerte des Hippocampus entsprachen etwa 53 % der Wildtyp Probe, des Parietal Cortex 55 % der Wildtyp-Variante.

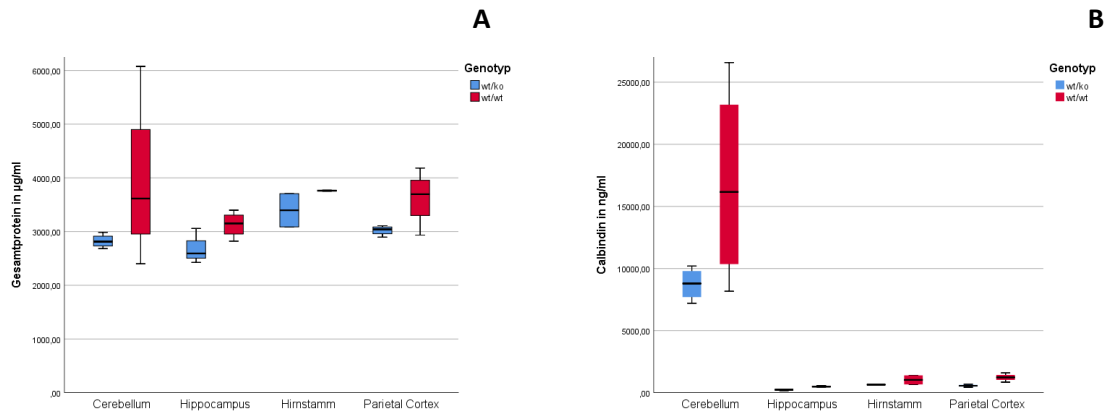


Abbildung 33: Boxplot-Darstellung der Calbindin- und Gesamtprotein-Konzentrationen in Wildtyp und Heterozygoten. Aufteilung des jeweiligen Gewebes auf der x-Achse des Gesamtproteins in $\mu\text{g/ml}$ (A) und des Calbindin in ng/ml (B). In blau die Probe der heterozygoten Tiere. In rot die Probe der Wildtyp Tiere. Testung der zwei Monate alten Tiere.

Bei isolierter Betrachtung des Gesamtproteins waren die Werte der heterozygoten Knock-out Gewebeproben bei durchschnittlich $84,26 \pm 0,16$ % der Wildtyp-Variante. Im Vergleich dazu lagen die absoluten Calbindin Werte durchschnittlich $56,11 \pm 0,28$ % unter den Wildtyp-Werten.

Gewebe in $\text{ng}/\mu\text{g}$	wt/wt	wt/ko
Cerebellum	$4,31 \pm 1,39$	$3,11 \pm 0,55$
Hippocampus	$0,16 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,02$
Hirnstamm	$0,27 \pm 0,14$	$0,19 \pm 0,02$
Parietal Cortex	$0,34 \pm 0,07$	$0,19 \pm 0,03$

Tabelle 25: Vergleich der Calbindin-Konzentrationen von Wildtyp und heterozygoten Gewebeproben. Calbindin in ng je Gesamtprotein in μg für Wildtyp (wt/wt) und Heterozygote (wt/ko).

4.3.4 Calbindin Werte in Mäusen unterschiedlichen Alters

Unter Betrachtung des Lebensalters der Mäuse zum Zeitpunkt der Probengewinnung zeigten sich für die untersuchten Gewebe Cerebellum, Hippocampus, Niere und parietaler Cortex die niedrigsten Anteile von Calbindin am Gesamtprotein in den fünf Monate alten Tieren, wie Abbildung 34 zeigt. Von den zwei Monate alten Tieren wurde nur cerebrales Gewebe untersucht.

Aufgeteilt nach den Einzelkonzentrationen des Gesamtproteins in $\mu\text{g/ml}$ und des Calbindins in ng/ml zeigten die Calbindin Messwerte altersübergreifend deutlich größere Varianzen als die Messwerte des Gesamtproteins. Die maximalen Werte wurden mit Ausnahme der Nieren je in den sieben Monate alten Tieren beobachtet. Die Maxima lagen hier für das Cerebellum bei dem 2,8-fachen des fünf Monats Wertes, für das Hippocampus Gewebe bei dem 2,6-fachen und für den Parietalen Cortex bei dem 9,3-fachen. Für die Nieren wurde der größte Wert im zwölf Monate alten Tier bestimmt und entsprach dem 4,6-fachen des fünf Monats-Werts (Tabelle 26).

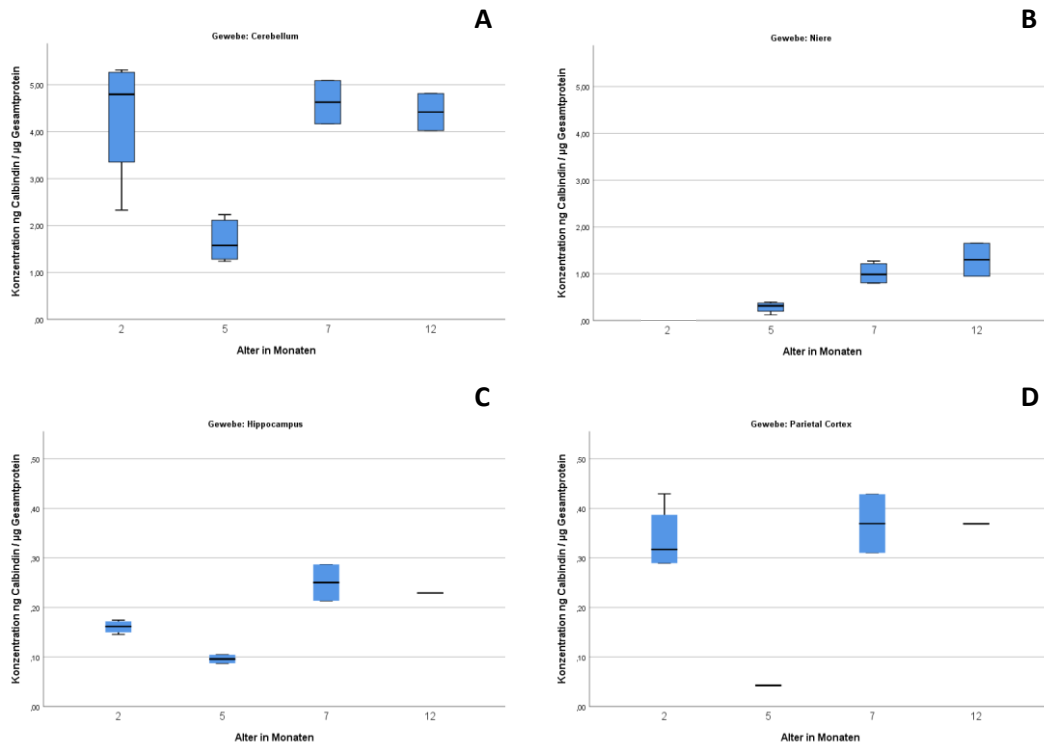


Abbildung 34: Boxplot Darstellung der Calbindin-Konzentration in Abhängigkeit des Alters. Auf der x-Achse das Alter, auf der y-Achse die Konzentration ng Calbindin je μg Gesamtprotein. Aufteilung nach Gewebeprobe der Wildtyp-Tiere Cerebellum (A), Niere (B), Hippocampus (C), Parietal Cortex (D). Die Nieren der zwei Monate alten Tiere wurde nicht untersucht.

Gewebeübergreifend gemittelt lag der Variationskoeffizient der Calbindin Messwerte bei 0,58 und bei 0,20 für die Gesamtproteinbestimmung. Die fünf Monate alten Tiere zeigten dabei sowohl die geringste Calbindin als auch die niedrigste Gesamtproteinkonzentration, wie auch in der Boxplot-Darstellung in Abbildung 35 sowie Tabelle 27 zu sehen ist.

Gewebe in ng/ μg	2 Monate	5 Monate	7 Monate	12 Monate
Cerebellum	4,310 \pm 1,386	1,669 \pm 0,426	4,629 \pm 0,651	4,420 \pm 0,558
Niere	-	0,285 \pm 0,120	1,009 \pm 0,241	1,298 \pm 0,499
Hippocampus	0,161 \pm 0,013	0,096 \pm 0,012	0,250 \pm 0,052	0,229
Parietal Cortex	0,338 \pm 0,066	0,043	0,369 \pm 0,084	0,369

Tabelle 26: Vergleich der Calbindin-Konzentrationen von Gewebeproben unterschiedlichen Alters. Konzentrationen von Calbindin in ng je Gesamtprotein in μg der Wildtyp-Tiere.

	Alter	Calbindin in ng/ml	Gesamtprotein in µg/ml
Cerebellum	2 Monate	16.769,77 ± 8109,23	3.927,00 ± 1544,49
	5 Monate	4.643,52 ± 1571,13	2.757,08 ± 592,01
	7 Monate	21.157,17 ± 1046,96	4.632,04 ± 877,68
	12 Monate	15.620,19 ± 2.119,61	3532,11 ± 33,29
Niere	2 Monate	-	-
	5 Monate	1.476,70 ± 700,66	5.081,41 ± 699,18
	7 Monate	6.065,36 ± 1.641,69	5.983,66 ± 435,63
	12 Monate	6.939,96 ± 3.475,83	5.218,81 ± 672,75
Hippocampus	2 Monate	503,22 ± 61,89	3.130,34 ± 242,43
	5 Monate	219,48 ± 123,87	2.227,10 ± 1013,57
	7 Monate	992,91 ± 323,96	3.919,06 ± 485,29
	12 Monate	787,52	3435,98
Parietal Cortex	2 Monate	1.230,85 ± 307,84	3.627,33 ± 516,03
	5 Monate	149,54	3.514
	7 Monate	1.583,37 ± 388,39	4.277,65 ± 82,29
	12 Monate	1.403,68	3.803,71

Tabelle 27: Gegenüberstellung von Calbindin und Gesamtprotein der verschiedenen Gewebeproben nach Alter. Calbindin-Konzentration in ng/ml gegen das Gesamtprotein in µg/ml der verschiedenen Gewebeproben nach Alter der Wildtyp-Tiere.

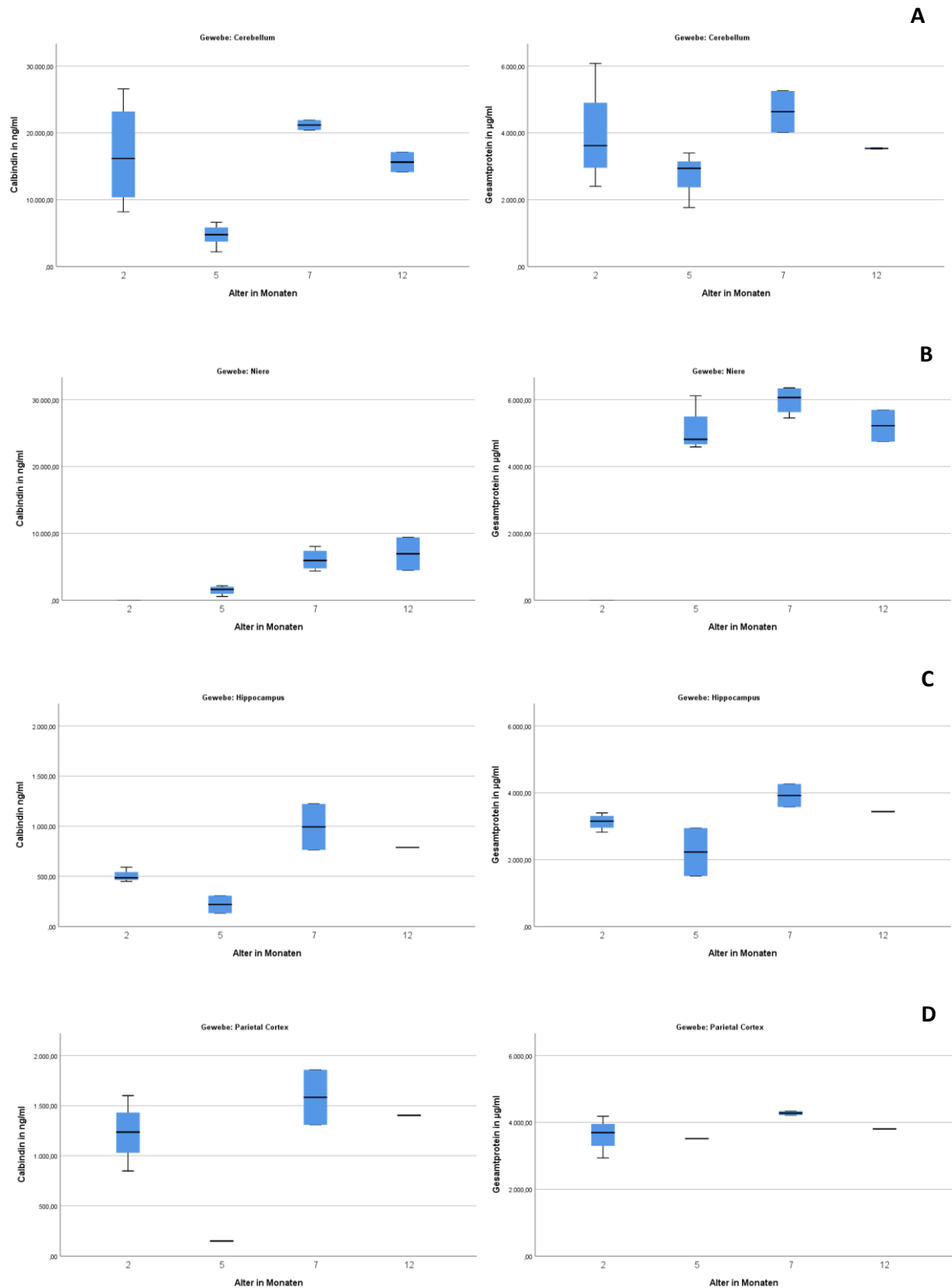


Abbildung 35: Boxplot Darstellung der Konzentration Calbindin und Gesamtprotein in Abhängigkeit des Alters. Calbindin in ng/ml (links). Gesamtprotein in µg/ml (rechts), auf der x-Achse in Abhängigkeit des Alters. Aufteilung nach Gewebeprobe der Wildtyp-Tiere. Cerebellum (A). Niere (B). Hippocampus (C). Parietal Cortex (D). Die Nieren der zwei Monaten alten Tiere wurde nicht untersucht.

4.4 Calbindin Halbwertszeit

Die Untersuchung der Stabilität von Calbindin insbesondere unter den Testbedingungen sollte mögliche Variation der Proteinkonzentration in Gegenwart vitaler oder lysierter Zellen darstellen um verfälschte Messwerte im Zellexpositionsexperiment ausschließen zu können. Dabei zeigte sich keine beschleunigte Abnahme des Proteins in Gegenwart vitaler oder lysierter Zellen gegenüber der isolierten Inkubation in DMEM-Medium. Die Messwerte der Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden auf den Mittelwert des jeweiligen $t_0 = 0,5$ h Triplikat-Tripletts eines jeden Ansatzes standardisiert. Anhand der fünf Messzeitpunkte wurde mittels nicht-linearer Regressionsanalyse eine exponentielle Erwartungskurve formuliert, die in Abbildung 36 dargestellt sind. Basierend auf der jeweiligen Erwartungskurve wurde für rekombinantes Calbindin in Behandlungsmedium eine Halbwertszeit von 79 Stunden bei 37 °C bestimmt. Für die Ansätze in Zellüberstandsmedium wurden für vitale Zellen eine Halbwertszeit von 133 Stunden und für lysierte Zellen 108 Stunden bestimmt. Die Bestimmung der Halbwertszeit in Medium erfolgte in Eppendorf-Gefäßen unter Ausschluss von Verdunstung. Der dabei ermittelte anteilige Messwert zeigte innerhalb der ersten zwölf Stunden eine größere Abnahme und lag mit $M_M = 83,1 \pm 0,6$ % unter denen der Zellkultur-Schalen. Für vitale Zellen wurde mit $M_V = 92,3 \pm 2,9$ % ein Wert bestimmt der leicht über den $M_L = 91,5 \pm 1,0$ % der lysierten Zellen lag.

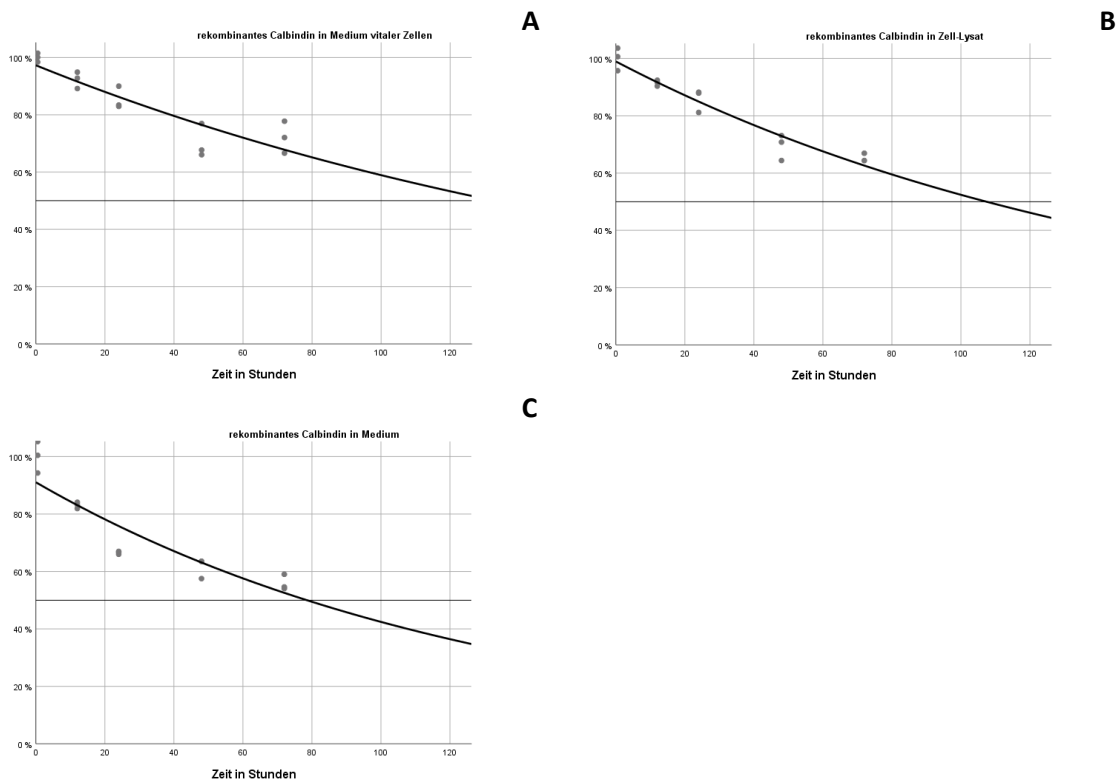


Abbildung 36: Graph des zeitlichen Verlaufs der Calbindin-Konzentration. Standardisierte Konzentrationen rekombinanten Calbindins auf der y-Achse gegen die Zeit auf der x-Achse. Calbindin in Behandlungsmedium in Zellkultur-Schalen vitaler Zellen (A), in Behandlungsmedium in Zellkultur-Schalen lysierter Zellen (B), sowie in Behandlungsmedium in Eppendorf-Gefäßen (C).

4.5 LDH Assay

Die Erfassung der Zellschädigung bei Exposition mit Noxen sollte mittels der freigesetzten LDH-Konzentration im Zellkultur-Medium erfolgen. Für diese Fragestellung erfolgte die Etablierung eines LDH Assays. Die Vorversuche erfolgten dabei mit Duplikaten oder Triplikaten jeweils einfach.

4.5.1 Anpassung der Konzentration eingesetzter Messreagenzien

Zur Ermöglichung einer optimalen Testbreite sollte die Signalentwicklung einer Probe maximiert und der Hintergrund minimiert werden. Im Abgleich der betrachteten Testprotokolle lagen die Durchschnittswerte der Messwerte der LDH-Aktivität für 250.000/ml lysierter HN10e-Zellen mit dem abgewandelten Kaja-Protokoll um 6 % höher Werte als die des Chan-Protokolls. Gleichzeitig war der Nullwert unter Anwendung des Kaja-Protokolls um 16 % niedriger.

Basierend darauf erfolgte die Testung unterschiedlicher Konzentrationen der Testreagenzien. Hierfür wurde zunächst die INT-Verdünnung in Wasser mit einer Verdünnung in DMSO in je drei Messungen verglichen. Als Positiv-Probe wurden 250.000/ml lysierte HN10e-Zellen eingesetzt. Bei einer deutlich besseren Löslichkeit war der Messwert der Positiv-Probe im Fall der DMSO-Verdünnung um 31 % höher, wobei der Nullwert 5 % unter dem korrespondierenden Messwert der H₂O Verdünnung lag. Bei besseren Messergebnissen wurde die Verdünnung von INT für den LDH Assay in DMSO angesetzt.

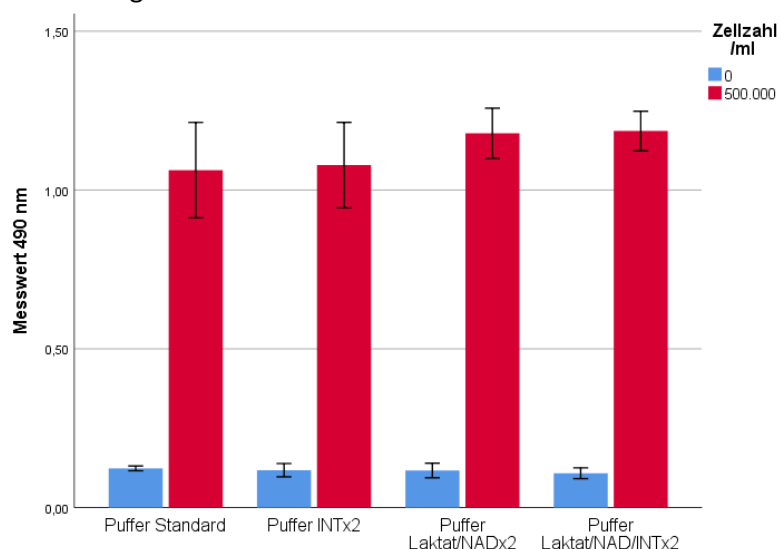


Abbildung 37: Säulendiagramm der LDH Assay 490 nm Messwerte unterschiedlicher Reagenzien-Konzentrationen. Je 500.000 lysierte HN10e Zellen (rot) und dem entsprechenden Nullwert (blau) als Balkendiagramm unterteilt nach der Puffervariante. Die Lyse erfolgte mit 1 % Triton X-100. Die Fehlerbalken zeigen ± 2 Standardabweichungen.

Die Messwerte der Positiv-Probe lagen für das native Chan-Protokoll bei 500.000/ml lysierten HN10e-Zellen – die bei -20 °C gelagert wurden – bei dem 8,6-fachen des Nullwerts. Für die Variationen des Puffers ergaben sich für doppelt eingesetzte INT sowie Laktat/NAD⁺ Konzentrationen niedrigere Nullwerte und größere Signale, wie Abbildung 37 verdeutlicht. Gleichzeitig zeigten die Positiv-Proben eine geringere Streuung der Messwerte. Für eine doppelte INT-Konzentration lag der Positiv-Wert 9,1-fach über dem Nullwert. Für doppelte Laktat/NAD-Konzentrationen entsprach der Messwert dem 10,1-fachen des Nullwerts. Die doppelte Konzentration von INT und Laktat/NAD ergab den 10,9-fachen Wert des Nullwerts. Gleichzeitig ergaben sich bei größerer Signalentwicklung geringere Varianzen, wie aus Tabelle 28 hervorgeht. In Bezug auf den Standardpuffer konnte im Mittel für die doppelte Konzentration der Pufferkomponenten ein Anstieg auf maximal 112 % des Ausgangswerts der Positiv-Probe sowie im Vergleich ein Abfall des Nullwerts auf 88 % des Standardansatzes beobachtet werden.

Puffervariante	Nullwert	500.000 Zellen /ml
Standard	0,124 ± 0,004	1,063 ± 0,075
INT 2x	0,118 ± 0,010	1,079 ± 0,067
Laktat/NAD⁺ 2x	0,117 ± 0,012	1,179 ± 0,040
Laktat/NAD⁺/INT 2x	0,108 ± 0,009	1,186 ± 0,031

Tabelle 28: 490 nm Messwerte für unterschiedliche Konzentrationen der Reagenzien im LDH Assay. Gegenübergestellt dabei der Nullwert und das Lysat von 500.000 HN10e Zellen/ml.

Bei deutlich höheren erzielten Signalen wurde für das finale Protokoll eine gegenüber dem Chan-Protokoll doppelte Konzentration für L-Laktat und NAD⁺ eingesetzt. In Kombination mit einer doppelten INT-Konzentration, dem Kaja-Protokoll entsprechend, konnten dabei noch niedrigere Hintergrundwerte erzielt werden.

4.5.2 Einfluss von Triton X-100 und der verwendeten Lösungen auf die Messwerte

Die Lyse der Zellen zur Gewinnung der maximalen LDH-Aktivität sollte mittels Triton X-100 erfolgen. Dabei zeigte die Farbentwicklung im LDH Assay eine deutliche Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration von Triton X-100. Der Vergleich unterschiedlicher Pufferzusammensetzungen erfolgte mit den Blank-Wert-korrigierten 490 nm Messwerten. Es ergaben sich in der Präsenz von 1 % Triton X-100 in Wasser in der Probenverdünnung im unteren Bereich der Messskala höhere Messwerte als in reinem Wasser. Im oberen Bereich der Messskala erreichten beide Ansätze hingegen für 500 mU/ml ähnliche Endwerte (Tabelle 29).

Die zusätzlich in Abbildung 38 aufgetragene Standardkurve einer Verdünnung mit 0,5 % Triton X-100 in DMEM zeigte im Vergleich dazu für 200 mU/ml einen deutlich höheren Messwert.

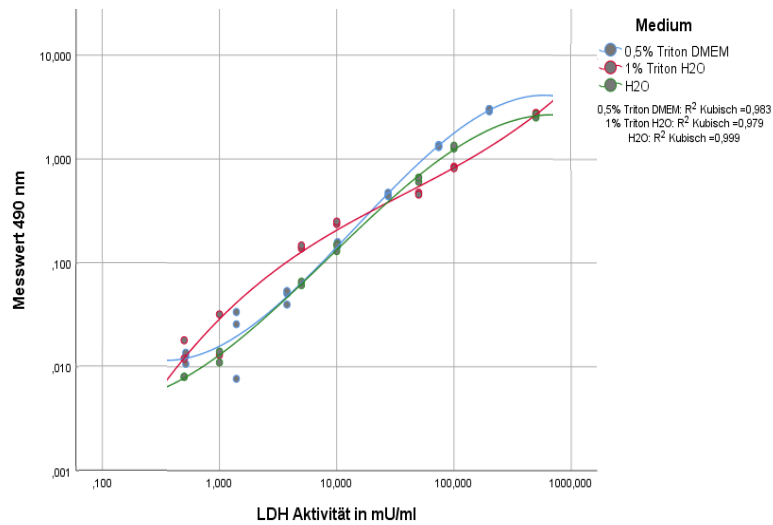


Abbildung 38: Graphische Darstellung der 490 nm Messwerte im LDH Assay unterschiedlicher Puffervarianten. Die 490 nm Messwerte auf der y-Achse gegen die LDH-Konzentration in mU/ml auf der x-Achse in doppelt logarithmierter Darstellung für unterschiedliche Triton X-100-Konzentrationen 0,5 % Triton X-100 in DMEM (blau), 1 % Triton X-100 in Wasser (rot) und Wasser (grün).

Im unteren Bereich der Messskala war für den jeweilig niedrigsten Wert der Verdünnung in Wasser (0,5 mU/ml) und in DMEM (0,516 mU/ml) ein deutlicher Unterschied im Falle einer Triton X-100 Beimengung zu sehen. Bei gleichzeitig höheren Hintergrund Werten lag der niedrigste Wert der 0,5 % Triton X-100 Verdünnung in DMEM unter den Messwerten der Triton X-100 Verdünnung in Wasser. In der doppelt logarithmierten Darstellung zeigte die vergleichend aufgeführte Verdünnung in DMEM mit Triton X-100 einen größeren linearen Messbereich als die Verdünnung in Wasser. Für die Nullwerte zeigte sich Protokoll-übergreifend eine positive Korrelation der Signalentwicklung und der verwendeten Triton X-100 Konzentration $r = 0,391$ ($p = 0,022$). In Betrachtung der Standardleiter bestand ansteigend bis 10 mU/ml eine signifikante Korrelation der Signalentwicklung und der Gegenwart von Triton X-100 $r = 0,996$ ($p = 0,004$).

Initiale Einzelversuche zeigten eine Abhängigkeit der Signalentwicklung neben der Konzentration von Triton X-100 auch von der Zugabe von FBS zum Medium. Der Einfluss von FBS und PS zeigt Abbildung 39. Verdünnungsreihen von Zell-Lysaten wurden in dem für das Expositions-Zellexperiment präferierte Behandlungsmedium mit dem nativen DMEM-Medium verglichen.

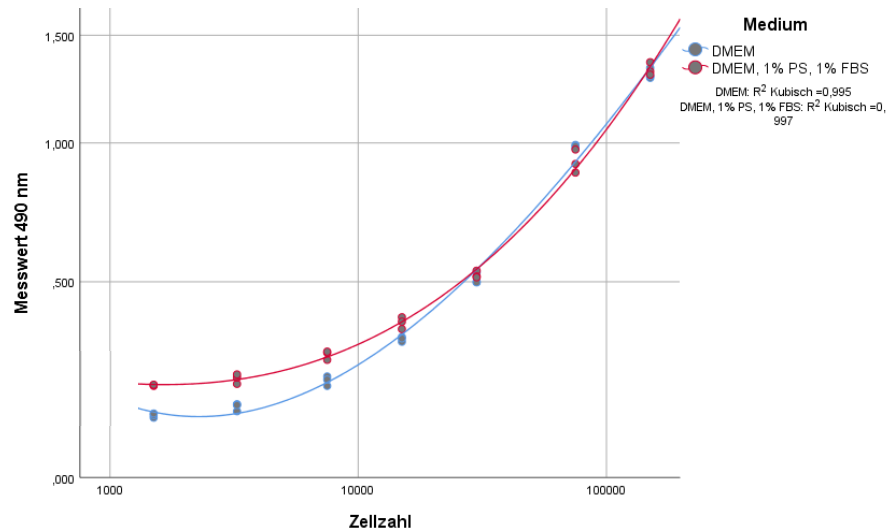


Abbildung 39: Die 490 nm Messwerte im LDH Assay unterschiedlicher Medium-Zusammensetzungen auf doppelt-logarithmierter Skala. Die 490 nm Messwert auf der y-Achse gegen die Zellzahl/ml auf der x-Achse. Natives DMEM in blau, Behandlungsmedium in rot. Die Lyse erfolgte mit 1 % Triton X-100.

Für die Testansätze wurden deshalb alle eingesetzten Proben auf eine einheitliche Triton X-100 Konzentration titriert. Das für die Verdünnung im Test verwendete DMEM-Medium wurde ebenfalls mit den Zusätzen Penicillin-Streptomycin und Fetalen Kälber Serum versetzt.

LDH Aktivität in mU/ml	H ₂ O	1 % Triton X-100 in H ₂ O	0,5 % Triton X-100 in DMEM
S1	500	2,599 ± 0,126	2,755 ± 0,044
	200		2,982 ± 0,089
S7	0,5	0,008 ± 0,000	0,015 ± 0,004
	0,516		0,012 ± 0,002
	0	0,265 ± 0,004	0,330 ± 0,008

Tabelle 29: 490 nm Messwerte im oberen und unteren Bereich der Messskala des LDH Assay in Abhängigkeit der Triton X-100 Verdünnung. Gegenübergestellt dabei der Nullwert und das Lysat von 500.000 HN10e Zellen/ml.

4.5.3 LDH-Stabilität unterschiedlicher Lagerungsbedingungen

Zur Vorbereitung nachfolgender Experimente wurde die Stabilität von LDH in unterschiedlichen Lagerungsbedingungen untersucht. Eingesetzt wurden je 6.000.000/ml lysierte HN10e-Zellen. Die Messungen unterlagen großen interindividuellen Streuungen, wie in Abbildung 40 zu sehen ist. Nach einer Lagerung bei -20 °C für 24 Stunden zeigten sich jedoch deutlich niedrigere Messwerte als in der Ausgangsmessung, die einer Abnahme des Signals von 57,3 % entsprachen.

Nach wiederholten Frier- und Tauprozessen lagen die Messwerte bei noch 33,2 % der in der Sättigung gelegenen Ausgangsmessung.

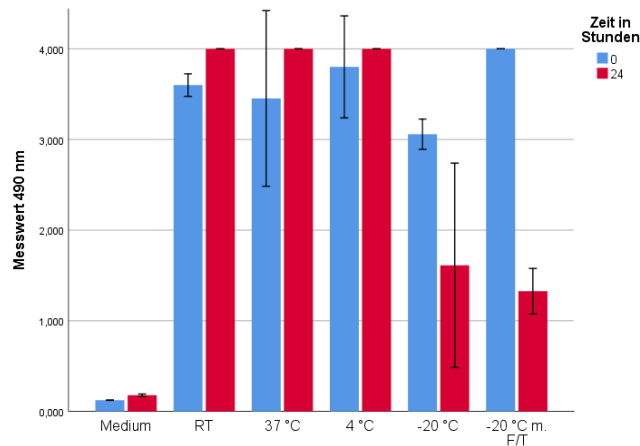


Abbildung 40: Säulendiagramm der LDH Assay 490 nm Messwerte unterschiedlicher Probenlagerungen. Untersucht wurden 6.000.000 lysierten HN10e Zellen zu Zeitpunkt 0 (blau) und nach 24 Stunden (rot). Die Lyse erfolgte mit 1 % Triton X-100. Von links nach rechts: EMFlp⁻-Medium mit 1 % Triton X-100. Lagerung bei Raumtemperatur, bei 37 °C, bei 4 °C, bei -20 °C und wiederholte -20 °C Gefrier- und Tau-Zyklen. Die Fehlerbalken zeigen ± 2 Standardabweichungen.

Die Messwerte von den Proben, die bei Raumtemperatur, 37 °C und 4 °C gelagert wurden, zeigten nach 24 Stunden konstant erhöhte Messwerte. Auch die Messwerte des vergleichend mitgeführten EMFlp⁻-Medium mit 1 % Triton X-100 zeigte dabei um 45,2 % höhere Messwerte, wie Tabelle 30 zeigt. Die Messwerte der Zelllysate lagen dabei in der Sättigung. Die Signalzunahme entsprach für die Lagerung bei Raumtemperatur 11,1 %, bei 37 °C 15,9 % und bei einer Lagerung bei 4 °C 5,2 %.

Lagerungsbedingung	Ausgangswert	Nach 24 Stunden
Medium	0,124 \pm 0,001	0,179 \pm 0,007
Raumtemperatur	3,600 \pm 0,062	4,000 \pm 0,000
37 °C	3,453 \pm 0,484	4,000 \pm 0,000
4 °C	3,801 \pm 0,281	4,000 \pm 0,000
-20 °C	3,058 \pm 0,083	1,612 \pm 0,564
Wiederholtes Frieren/Tauen	4,000 \pm 0,000	1,326 \pm 0,126

Tabelle 30: Messung bei 490 nm im LDH Assay für unterschiedliche Probenlagerungen. Messwerte vor und 24 Stunden nach Lagerung in unterschiedlichen Bedingungen.

4.5.4 Lyse mit Triton X-100

Das für die maximale LDH-Konzentration einer jeweiligen Zellprobe eingesetzte Triton X-100 sollte hinsichtlich der einzusetzenden Konzentration sowie die Inkubationsdauer optimiert werden. Die erzielten Extinktions-Messwerte der Lyse mit 1 % Triton X-100 zeigte für unterschiedliche Lyse-Zeiten zwischen 15 und 45 Minuten keine Lyse-Zeit-abhängige Unterschiede. Zu sehen ist dies in Abbildung 41. Die LDH-Werte von 200.000/ml HN10e Zellen

lagen dabei im oberen Viertel des Messbereichs. Die Messwerte der 20.000/ml lysierten Zellen lagen im unteren Drittel der Messskala.

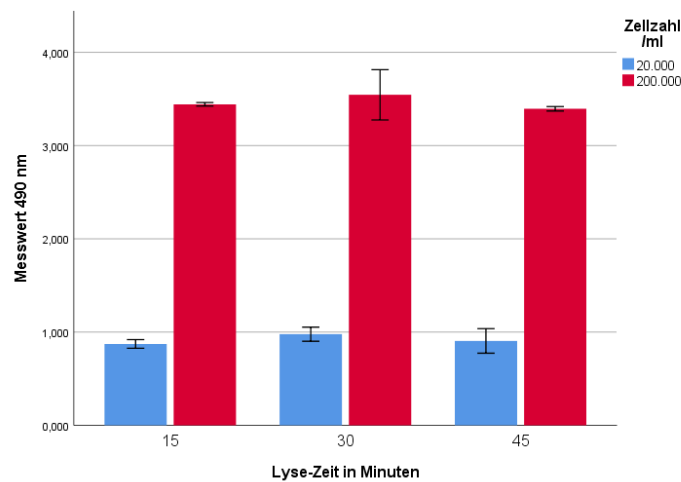


Abbildung 41: Säulendiagramm der LDH Assay 490 nm Messwerte verschiedener Lyse-Zeiten. Je 20.000 (blau), beziehungsweise 200.000 (rot) lysierte HN10e Zellen je Zellschale unterteilt nach der Lyse-Zeit. Die Lyse erfolgte mit 1 % Triton X-100. Die Fehlerbalken zeigen ± 2 Standardabweichungen.

Weder für die Messungen von 20.000 Zellen /ml ($p = 0,553$) noch für 200.000 Zellen /ml ($p = 0,571$) wurden signifikante Unterschiede für die in Tabelle 31 aufgeführten Messwerte der drei unterschiedlichen Inkubationszeiten gesehen.

Lyse-Zeit	20.000 Zellen /ml	200.000 Zellen /ml
15 Minuten	0,873 \pm 0,023	3,442 \pm 0,010
30 Minuten	0,977 \pm 0,038	3,544 \pm 0,135
45 Minuten	0,905 \pm 0,066	3,394 \pm 0,118

Tabelle 31: LDH Assay 490 nm Messwerte unterschiedlicher Lyse-Zeiten. Lyse mit 1 % Triton X-100 von 20.000 Zellen /ml sowie von 200.000 Zellen /ml.

Native wie auch lipofizierte HN10e Zellen zeigten auch bei 45 Minuten Inkubation für eine Konzentration von 0,01 % Triton X-100 eine unvollständige Lyse. Die Gegenüberstellung ist in Abbildung 42 aufgeführt. Anteilig lag der Messwert der 20.000/ml lysierten Zellen bei 34,5 % der 200.000 Zellen/ml im Fall der Kontrolle und bei 39,9 % im Fall der transfizierten Zellen, wie aus Tabelle 32 hervorgeht.

Anteilig an den maximalen Werten der Lyse mit 1 % Triton X-100 lagen die Messwerte bei den nativen HN10e-Zellen für 20.000 Zellen/ml bei 28,5 % im Fall der Lyse mit 0,01 % Triton X-100, bei 200.000 Zellen/ml bei 19,8 % bezogen auf die Maximalwerte. Im Vergleich hierzu wurden bei der Lyse mit 0,1 % Triton X-100 annähernd der maximalen Lyse entsprechende Werte erhoben mit 99,5 % für 20.000 Zellen/ml sowie 98,7 % für 200.000 Zellen/ml.

		20.000 Zellen/ml	200.000 Zellen/ml
Kontrolle	0,01 %	0,247 ± 0,001	0,717 ± 0,035
	0,1 %	0,864 ± 0,021	3,580 ± 0,062
	1 %	0,869 ± 0,165	3,625 ± 0,340
Lipofiziert	0,01 %	0,272 ± 0,008	0,682 ± 0,036
	0,1 %	0,809 ± 0,115	3,006 ± 0,126
	1 %	0,830 ± 0,027	3,571 ± 0,148

Tabelle 32: 490 nm Messwerte im LDH Assay der Lyse nativer und transfizierter HN10e-Zellen. Lyse mit 0,01 %, 0,1 % und 1 % Triton X-100 von 20.000 Zellen /ml und 200.000 Zellen /ml.

Gegenübergestellt entsprachen für die TH3.2 transfizierten Zellen bei der Lyse mit 0,01 % Triton X-100 die Messwerte bei 20.000 Zellen/ml 32,8 % des Maximums und für 200.000 Zellen/ml 19,8 % des maximalen Wertes. Für die Lyse der transfizierten Zellen mit 0,1 % Triton X-100 wurden für 20.000 Zellen/ml 97,4 % des Maximums gemessen, bei 200.000 Zellen/ml waren es 84,1 % des Maximums.

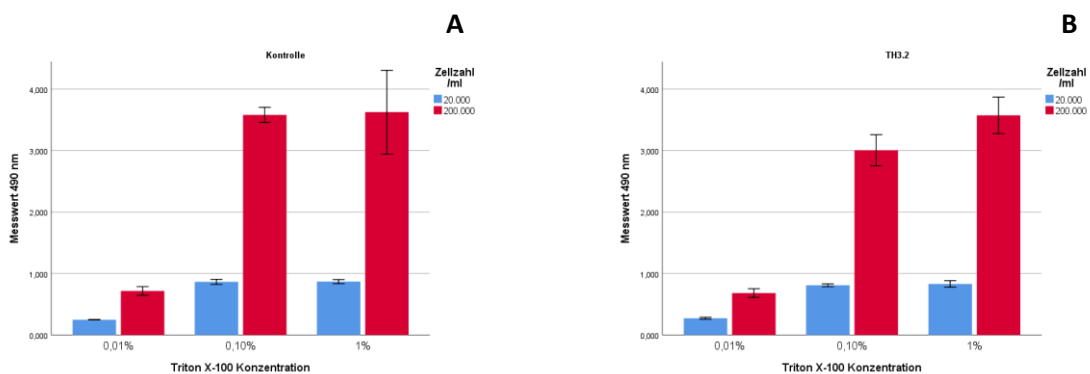


Abbildung 42: Säulendiagramm der LDH Assay 490 nm Messwerte unterschiedlicher Triton X-100 Konzentrationen. Je 20.000 (blau), beziehungsweise 200.000 (rot) lysierte HN10e Zellen je Zellschale als unterteilt nach der Triton X-100 Konzentration auf der x-Achse. Die Lyse erfolgte für 45 Minuten. Native HN10e Zellen (A). TH3.2 transfizierte HN10e Zellen (B). Die Fehlerbalken zeigen ± 2 Standardabweichungen.

Die Variation der Triton X-100 Konzentration sowie der Inkubationszeit zeigt deutlich für eine Konzentration von 0,01 % Triton X-100 unabhängig von der Inkubationszeit eine unvollständige Zellyse (Abbildung 43). Die Messwerte der je Konzentration und Zeit eingesetzten Zellschale zeigen deutliche Schwankungen, ein signifikanter Zusammenhang der Inkubationszeit und des jeweiligen Messwerts der einzelnen eingesetzten Triton X-100 Konzentrationen konnte in der ANCOVA Analyse nicht dargestellt werden ($p = 0,190$). Die eingesetzte Konzentration hatte einen signifikanten Einfluss auf den Messwert ($p < 0,001$) mit einer Effektstärke Eta-Quadrat $\eta^2 = 0,962$. Im Mittel betrug die Messwerte der 0,01 % Triton X-100 Proben $12,5 \pm 2,1$ % der jeweiligen 1 % Triton X-100 Probe gleiche Inkubationszeit. Für die 0,05 % Triton X-100 Probe lagen die Messwerte im Mittel bei $94,1 \pm 14,8$ % des Maximums.

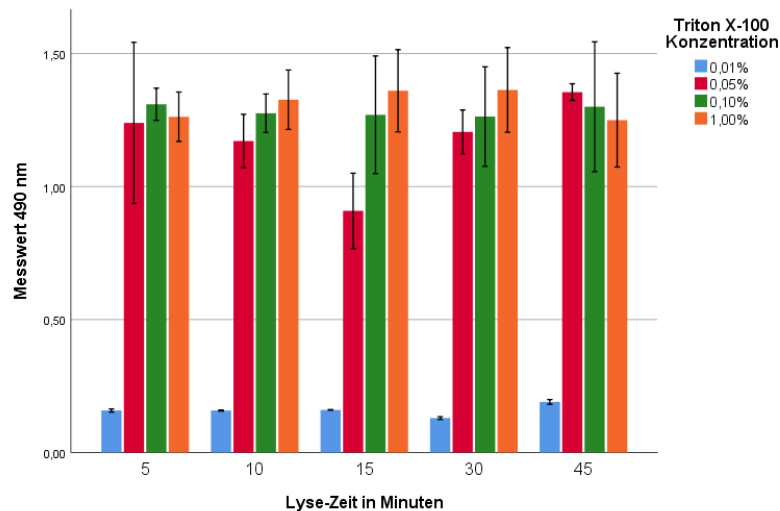


Abbildung 43: Säulendiagramm der LDH Assay 490 nm Messwerte variierender Triton X-100 Konzentrationen und Lyse-Zeiten. Je 100.000 lysierten HN10e Zellen je Zellschale unterteilt nach Lyse-Zeit auf der x-Achse und der eingesetzten Triton X-100 Konzentration (Farbe). Die Fehlerbalken zeigen ± 2 Standardabweichungen.

4.5.5 Extraktionsbedingte LDH-Freisetzung

Abschließend sollte eine Verfälschung der Messergebnisse durch Entnahme-bedingte Fehler ausgeschlossen werden. Die durch das Verfahren der Extraktion beeinflusste LDH-Freisetzung wurde im Direktvergleich das Zentrifugieren des Mediums gegenüber einer direkten Filtration betrachtet. Durch das Pipettieren und Zentrifugieren erhöhte LDH-Messwerte konnten ausgeschlossen werden (Abbildung 44). Die Zentrifugation des abpipettierten Medium-Überstands der Zellkultur, wurde der direkten Filtration des abgegossenen Mediums gegenübergestellt. Für die eingesetzten Proben der Lyse von 100.000 Zellen mit 0,01 % Triton X-100 wurden über alle drei beobachteten Zeiträume für die zentrifugierten Proben Mittelwerte der 490 nm Messung bestimmt, die 20 % unterhalb der Vergleichswerte einer direkten Filtration lagen. Für die Betrachtung unterschiedlicher Lyse-Zeiten sowie unterschiedlicher eingesetzter Triton X-100 Konzentrationen ergab die ANCOVA der Mittelwerte der 490 nm Messung keinen signifikanten Einfluss einer Zentrifugation des Mediums der 100.000 lysierten Zellen im Vergleich zur direkten Filtration ($p = 0,996$). Ein signifikanter Einfluss der Lysezeiten konnte ebenfalls nicht belegt werden ($p = 0,893$). Lediglich die Konzentration stellte sich als signifikanter Faktor dar ($p = 0,022$) mit einer Effektstärke Eta-Quadrat $\eta^2 = 0,321$.

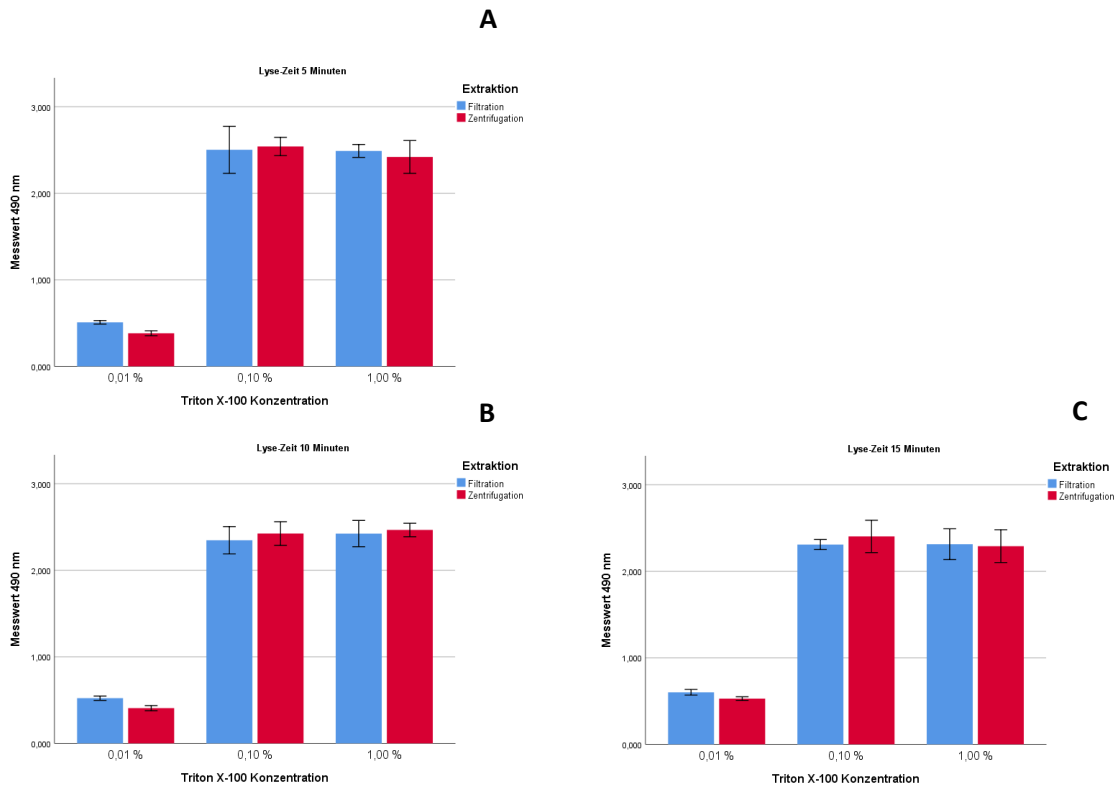


Abbildung 44: Säulendiagramm der LDH Assay 490 nm Messwerte unterschiedlicher Extraktionsmethoden. Unterteilt nach der zur Lyse von 100.000 HN10e Zellen eingesetzten Triton X-100 Konzentration auf der x-Achse. Im Direktvergleich ist hierbei in der anschließenden Probenverarbeitung die Filtration in blau, die Zentrifugation in rot dargestellt. Die Lyse erfolgte für fünf Minuten (A), für zehn Minuten (B), und für 15 Minuten (C).

4.5.6 Statistische Validierung

Zusammengefasst wurden die Daten der durchgeführten LDH-Testungen hinsichtlich einer statistischen Analyse betrachtet. Die signifikante Unterscheidung der Standardränge sowie eine kompetitive Inter- und Intra-Test-Varianz wurden erzielt.

4.5.6.1 Standardleiter

Die Messwerte der etablierten Standardleiter sollten über alle Ränge voneinander unterschieden werden können. Die Standardränge S1 – S7 entsprechend der Aktivitäten von 200 mU/ml bis 0,52 mU/ml wurden im Mediantest im Paarvergleich gegenüber gestellt. Abbildungen 45 und 46 zeigen dabei die Darstellung der Standardränge im Bloxplot. Für die nativen Messwerte bei 490 nm konnten die Standardränge S6 und S7 entsprechend 1,39 und 0,52 mU/ml nach erfolgter Bonferroni-Korrektur nicht signifikant von einander unterschieden werden ($p = 0,555$). Nach Korrektur der Messwerte durch Abzug der Blank-Hintergrundwerte zeigten alle Standardränge im Paarvergleich einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$).

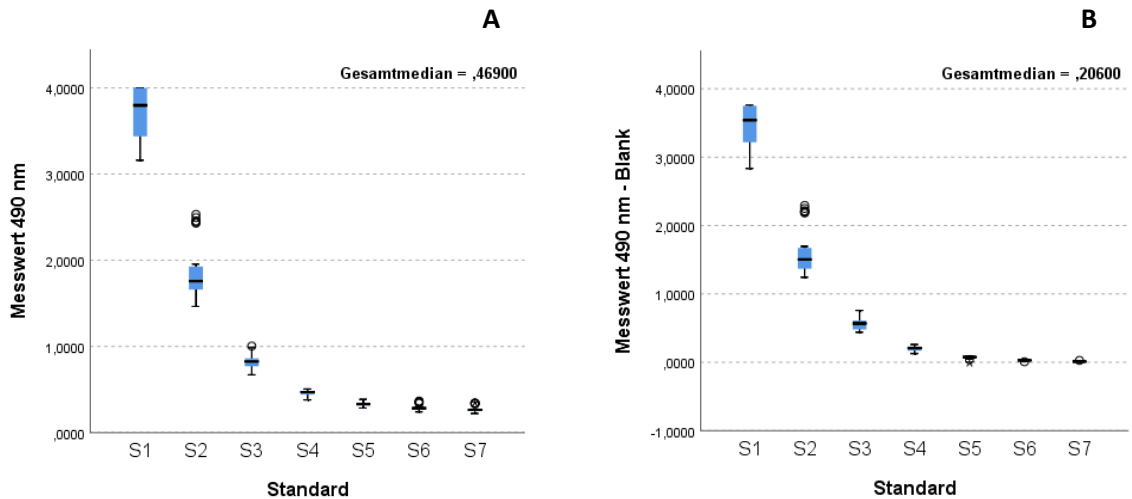


Abbildung 45: Boxplot-Darstellung des Mediantests der Standardwerte des LDH Assays. Standardwerte definiert als Ränge auf der x-Achse. Darstellung der nativen 490 nm Messwerte (A). Differenz der Blank-Werte von den 490 nm Messwerten (B).

Zum Ausschluss eines Einflusses testspezifischer unterschiedlicher Farbentwicklungen wurden die Standardwerte eines Tests anhand des jeweilig zugehörigen S2-Mittelwertes standardisiert. Auch hier bestand für native 490 nm Messwerte nach der Bonferroni-Korrektur keine signifikanten Unterschiede der Standardränge S6 und S7 ($p = 1,000$). Für die S2-standardisierten, Hintergrund-korrigierten Werte konnten ebenfalls alle Standardränge signifikant voneinander unterschieden werden.

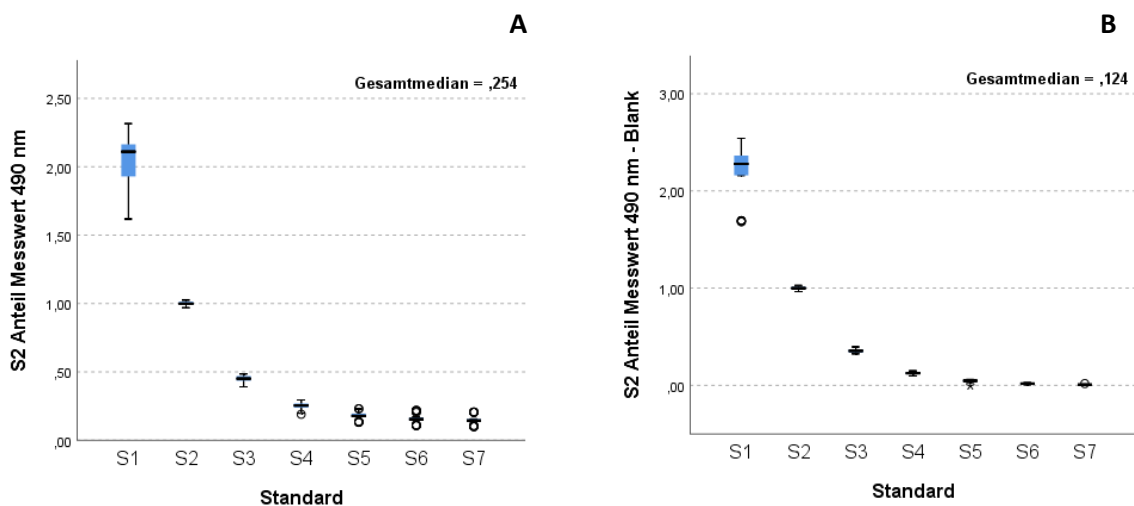


Abbildung 46: Boxplot-Darstellung des Mediantests der standardisierten Standardwerte des LDH Assays. Die Standardränge wurden auf den jeweiligen S2 Wert standardisiert. Standardwerte definiert als Ränge auf der x-Achse. Darstellung der nativen 490 nm Messwerte (A). Differenz der Blank-Werte von den 490 nm Messwerten (B).

4.5.6.2 Intra-Test-Varianz

Für reliable Messergebnisse sollte die Variabilität gleicher Messungen innerhalb eines Tests gering gehalten werden. Die Messwerte der getesteten Proben und Standardwerte zeigten insbesondere Ausreißer der Variabilitätskoeffizienten für Negativ-Proben bei gleichzeitig erhöhten CV-Werten im unteren Bereich der Messskala. Für die Berechnung der Intra-Test-Varianz wurden die Negativ-Proben nachfolgend ausgeschlossen. Der errechnete Mittelwert der 452 verwertbaren Triplikate von $M_{CV} = 0,041 \pm 0,054$ bezeichnet die Intra-Test-Varianz, zu sehen in Abbildung 47 (A).

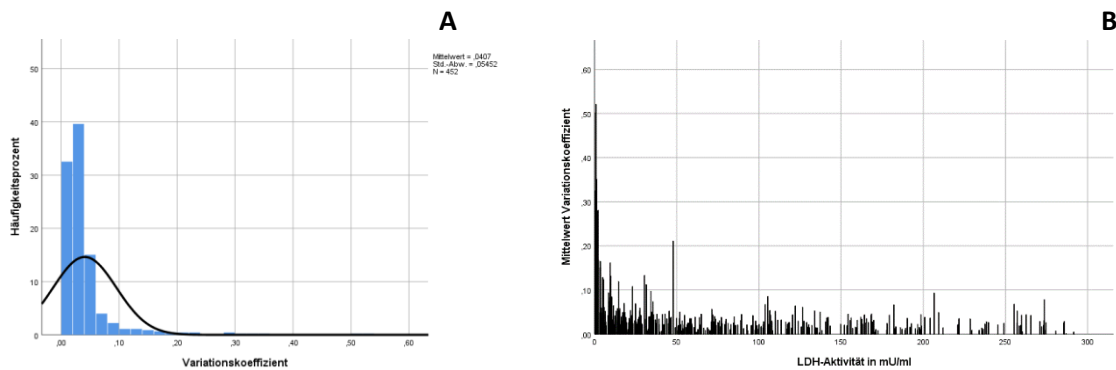


Abbildung 47: Graphische Darstellung der Variationskoeffizienten der Intra-Test-Varianz des LDH Assays Aufgeführt N=452 Triplikate auf der x-Achse im Histogramm (A). Darstellung der Variationskoeffizienten der N=452 Triplikate als Säulendiagramm auf der y-Achse gegen die LDH-Aktivität auf der x-Achse (B).

In der graphischen Darstellung der Varianzkoeffizient-Mittelwerte gegen die LDH-Aktivität wie dargestellt in Abbildung 47 (B) zeigten sich die steigenden konzentrations-korrigierten Varianzen im unteren Messbereich nahe der Nullwerte. Die höchsten Varianzkoeffizienten wurde mit über 0,5 im unteren Grenzbereich nahe der Nullwerte erzielt. Für LDH Konzentrationen über 50 mU/ml waren die Varianzkoeffizienten stets unter 0,1.

In der positionsbezogenen Darstellung wiesen die Triplikate 6 und 7 die höchsten Variationskoeffizienten auf (Abbildung 48). Dabei entsprachen die beiden Triplikaten den Standarddrängen S6 und S7 – also einer entsprechenden LDH-Aktivität von 1,39 und 0,51 mU/ml. Triplikat 8 entsprach dem Blank-Wert dar und wurde nicht in die Berechnung aufgenommen.

Die Kovarianzanalyse mittels ANCOVA ergab unter Ausschluss der Standardleiter (Triplikat 1 – 8) und der Vereinfachung der Konzentrationen in die Bereiche 0 - 50 mU/ml, 50 - 100 mU/ml, 100 - 200 mU/ml und 200 - 300 mU/ml als Kofaktor ein partielles Eta-Quadrat $\eta^2 = 6,6 \%$ und damit einen milden Einfluss der Konzentration auf die Betrachtung des Variationskoeffizienten in Abhängigkeit der Triplikat-Position.

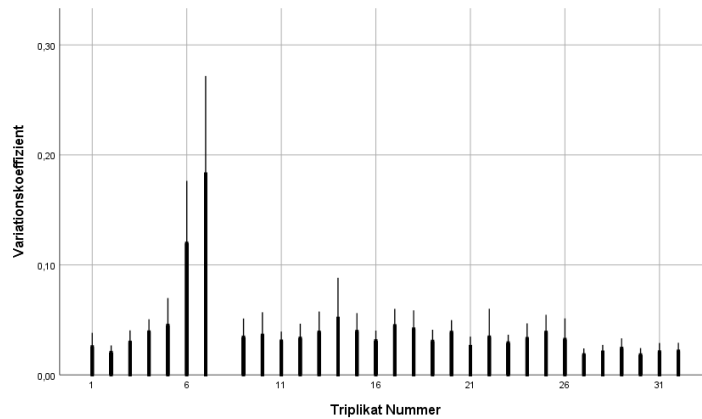


Abbildung 48: Säulendiagramm der Variationskoeffizienten des LDH-Assay. Darstellung nach der Position des Triplikats auf der 96-Well Platte. Auf der y-Achse der Variationskoeffizient. Auf der x-Achse die Position des Triplikats. Zuordnung der Triplikate nach Abbildung 28. Triplikate 8, dem Blank-Wert entsprechend ist nicht aufgeführt. Die Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall.

4.5.6.3 Inter-Test-Varianz

Die Vergleichbarkeit gleicher Proben in verschiedenen Testansätzen gewährleistet eine geringe Inter-Test-Varianz. Die 32 unterschiedlichen verwendeten Proben wurden in Konzentrationen von $5,34 \pm 0,01$ mU/ml bis $276,39 \pm 10,09$ mU/ml eingesetzt. Höhere Konzentrationen korrelierten dabei mit höheren Variationskoeffizienten ($r = 0,523$; $p = 0,002$). Der errechnete Mittelwert von $0,020 \pm 0,017$ bezeichnet die Inter-Test-Varianz und ist im Histogramm in Abbildung 49 dargestellt.

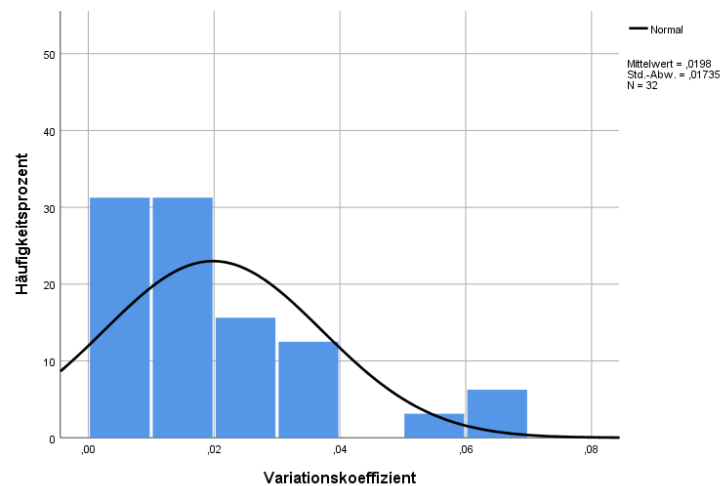


Abbildung 49: Histogramm der Variationskoeffizienten der Inter-Test-Varianz des LDH-Assay. Abgebildet sind N=32 Triplikate.

4.6 LDH-Halbwertszeit

Die Messung der Haltbarkeit der Standardverdünnung unter der Lagerung bei 4 °C zeigte im Verhältnis zu einer frisch resuspendierten Verdünnung für die Standardverdünnungen 200 mU/ml (S1) bis 3,76 mU/ml (S5) einer 51 Tage alten Verdünnung noch 69 ± 2 % der Aktivität

und für eine 127 Tage alte Verdünnung noch $53 \pm 3 \%$ der Aktivität der frischen Verdünnung. Unter Verwendung eines nicht-linearen Regressionsmodell ($R^2 = 0,903$) war, gerechnet ab Resuspension, von einen Zeitraum von 15 Tagen auszugehen, in dem keine relevante Aktivitätsabnahme zu erwarten war. Die Halbwertszeit wurde anhand des Näherungsgraph in Abbildung 50 mit 119 Tagen bestimmt.

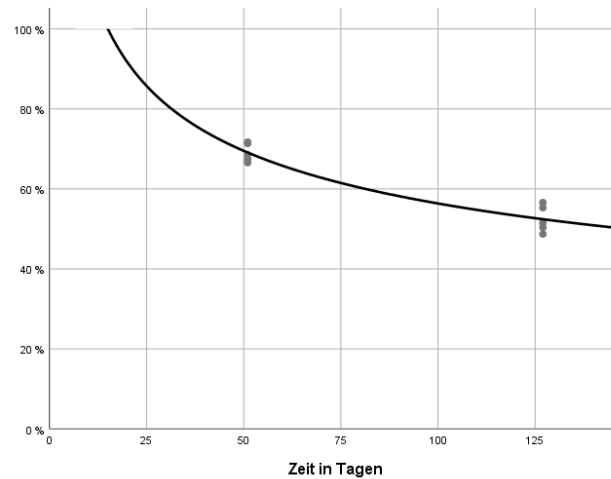


Abbildung 50: Graphische Darstellung der standardisierten LDH-Aktivitäts-Messwerte der Halbwertszeitbestimmung. Die Näherungsfunktion als Exponentenfunktion. Standardisiert auf den Ausgangszeitpunkt als 100 %.

4.7 Freisetzung von Calbindin und LDH bei Zellschädigung

Die vorangegangene Etablierung des Calbindin ELISA und des LDH Assay erfolgte vorbereitend für das Zellbehandlungsexperiment. Die beiden Ansätze der Zellexposition mit Staurosporin und Ionomycin wurden in der anteiligen Calbindin und LDH-Freisetzung verglichen. Abbildung 51 zeigt die Boxplot-Darstellung der erhobenen Messwerte über 28 Stunden im Vergleich. Es zeigte sich für die Behandlung mit Staurosporin in deutlich schnellerer Anstieg des freigesetzten Calbindin. Für sowohl Calbindin als auch die LDH-Aktivität wurden in der Behandlung mit Staurosporin höhere Endwerte als in der Ionomycin Behandlung erzielt. Über den beobachteten Zeitraum lagen die Mittelwerte der Messungen des ins Medium freigesetzten Calbindins für die Behandlung mit $1 \mu\text{M}$ Ionomycin nach 28 Stunden bei dem zehnfachen des drei Stunden Wertes. Die für die Ionomycin-Behandlung gemessene LDH-Aktivität stieg um mehr als das Dreifache. Für den Ansatz der Exposition gegenüber 500 nM Staurosporin wurden über den selben Zeitraum ein Anstieg der Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen auf das mehr als 15-fache beobachtet. Die LDH-Aktivität zeigte hier einen Anstieg auf das mehr als 13-fache der drei-Stunden-Werte. Die bestimmten Konzentrationen sind in Tabelle 34 aufgeführt.

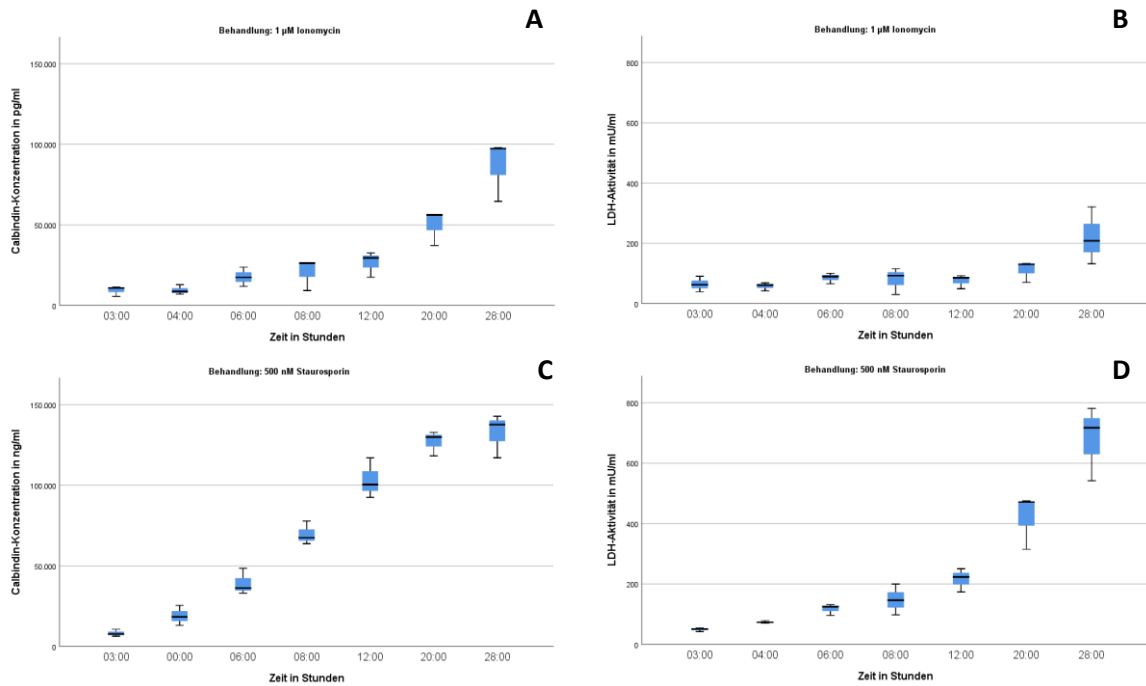


Abbildung 51: Boxplot-Darstellung der Calbindin-Konzentration und LDH-Aktivität in der Zellbehandlung. Darstellung der Calbindin-Konzentration in pg/ml (A, C) und der zugehörigen LDH-Aktivität in mU/ml (B, D) auf der y-Achse als Boxplot gegen die Zeit in Stunden auf der x-Achse. Die Behandlung mit 1 µM Ionomycin (A, B), die Behandlung mit 500 nM Staurosporin (C, D).

Die Datenerhebung wurde zwei Stunden nach Mediumwechsel begonnen. Dabei zeigten sich in allen Wiederholungen des Experiments in den ersten, nach zwei Stunden, erhobenen Proben deutlich erhöhte Messwerte für die Behandlung mit 1 µM Ionomycin sowie für die Behandlung mit 500 nM Staurosporin. Der drei-Stunden-Wert ergab in allen Fällen deutlich niedrigere Werte, die zwei-Stunden-Werte können aus Tabelle 34 entnommen werden, sind in den Abbildungen unter der Annahme einer zu frühen Abnahme nach Mediumwechsel und einer damit verbundenen geringen Zelladhäsion aber nicht aufgeführt.

Zur Beurteilung der Behandlungs-unabhängigen Freierdung sowie der gesamten Calbindin Konzentration und LDH Aktivität wurden unbehandelte Kontrollen nach 28 Stunden untersucht. Für die Berechnung der Maximalkonzentration wurde die Konzentration des 28 Stunden Mediumüberstandes zu der Konzentration der 28 Stunden Triton-Lyse addiert. Die Gesamt Konzentration von Calbindin der unbehandelten Kontrolle ergab nach 28 Stunden einen Anteil von ungefähr 65 % im Zell-Lysat. Im Vergleich wurden nach zwei Stunden fast 90 % der Gesamtkonzentration im Zell-Lysat bestimmt. Die Gesamt LDH-Aktivität der unbehandelten Kontrolle verteilte sich nach zwei Stunden anteilig zu knapp 88 % auf das Zell-Lysat. Nach 28 Stunden lag die Gesamt LDH-Aktivität zu 82 % im Zell-Lysat (Tabelle 33).

Anteilig an dem jeweiligen Gesamt-Maximum eines jeden Ansatzes ergab sich nach der Behandlung mit 1 µM Ionomycin über 28 Stunden für Calbindin eine Freisetzung ins Medium

von $45,51 \pm 11,74$ % und für LDH eine Freisetzung von $21,91 \pm 8,53$ % bei einem Verhältnis der Calbindin-Konzentration zur LDH-Aktivität von $2,15 \pm 0,36$ (Tabelle 35). Im Vergleich lagen die anteiligen Mittelwerte der Calbindin-Freisetzung nach drei Stunden bei $4,88 \pm 1,80$ % und der LDH-Freisetzung bei $6,46 \pm 2,74$ % mit einem Verhältnis von $0,77 \pm 0,19$. Die gemessenen anteiligen Messwerte korrelierten dabei signifikant mit der Behandlungsdauer ($p < 0,001$). Ein deutlicher Anstieg wurde nach sechs Stunden gesehen (Abbildung 52).

Kontrolle		Calbindin pg/ml	LDH mU/ml
02:00	Gesamt	$142.099,95 \pm 8.930,78$	$763,30 \pm 116,11$
	Zell-Lysat	$127.317,49 \pm 13.509,57$	$671,47 \pm 126,45$
28:00	Gesamt	$191.749,79 \pm 7.830,77$	$997,11 \pm 39,67$
	Zell-Lysat	$124.354,81 \pm 6.731,29$	$822,37 \pm 22,64$

Tabelle 33: Gemessene Calbindin Konzentration und LDH-Aktivität der unbehandelten Kontrolle. Werte im Zell-Lysat sowie der Gesamtwert nach zwei und 28 Stunden.

Bei der Behandlung mit 500 nM Staurosporin über drei Stunden lagen die an den Maxima anteiligen Mittelwerte für die Calbindin-Freisetzung bei $4,28 \pm 1,14$ % und für die LDH-Freisetzung bei $4,93 \pm 0,64$ %. Das Verhältnis lag dabei bei $0,88 \pm 0,25$. Bereits eine Stunde später war ein deutlicher Anstieg zu sehen (Abbildung 53).

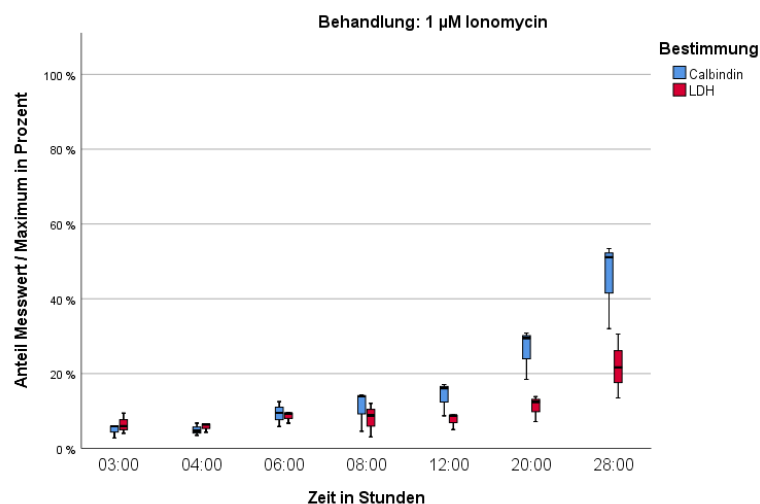


Abbildung 52: Boxplot-Darstellung der Calbindin-Konzentration und LDH-Aktivität im Medium bei Behandlung mit 1 µM Ionomycin. Die Calbindin-Konzentration in blau, die LDH-Aktivität in rot standardisiert auf die jeweiligen Maxima der unbehandelten Kontrolle nach 28 Stunden eines jeden Ansatzes. Auf der x-Achse die Behandlungszeit mit 1 µM Ionomycin in Stunden.

Nach 28 Stunden Behandlung wurden die anteiligen Mittelwerte der Calbindin-Freisetzung mit $69,24 \pm 8,33$ % und die der LDH-Freisetzung mit $68,08 \pm 11,02$ % bei einem Verhältnis von $1,05 \pm 0,31$ bestimmt (Tabelle 35). Für die anteiligen Messwerte der freigesetzten Calbindin-Konzentration und der LDH-Aktivität im Medium bestand eine signifikante Korrelation mit der Behandlungsdauer ($p < 0,001$).

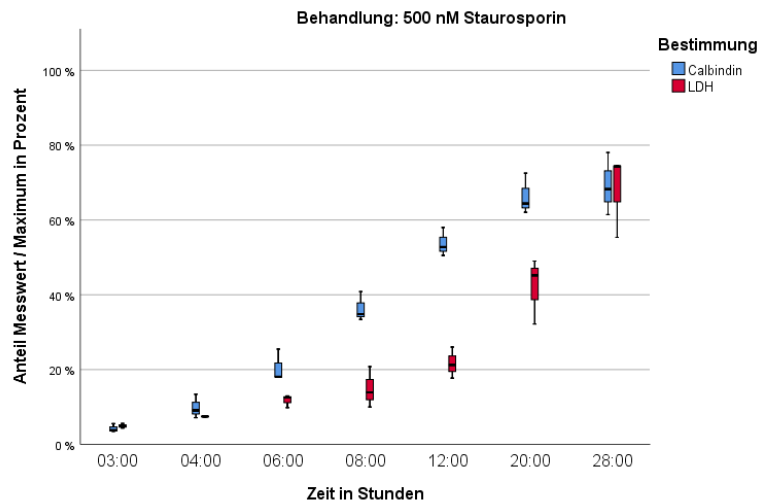


Abbildung 53: Boxplot-Darstellung der Calbindin-Konzentration und LDH-Aktivität im Medium bei Behandlung mit 500 nM Staurosporin. Die Calbindin-Konzentration in blau, die LDH-Aktivität in rot standardisiert auf die jeweiligen Maxima der unbehandelten Kontrolle nach 28 Stunden eines jeden Ansatzes. Auf der x-Achse die Behandlungszeit mit 500 nM Staurosporin in Stunden.

Die absolut gemessene Calbindin-Konzentration bezogen auf die LDH-Aktivität zeigte für die Behandlung mit 1 μ M Ionomycin einen kontinuierlichen Anstieg bis zum Erreichen des Maximums nach 20 Stunden. Für die Behandlung mit 500 nM Staurosporin wurde das Maximum nach acht Stunden beobachtet, mit einem nachfolgend kontinuierlichen Absinken über die restlichen 20 Stunden des Experiments (Tabelle 34).

		Calbindin in pg/ml	LDH in mU/ml	Calbindin/LDH in pg/mU
1 μ M Ionomycin	2:00	37.829,87 \pm 20.548,68	198,17 \pm 91,17	245,09 \pm 199,93
	3:00	9255,29 \pm 3131,54	64,15 \pm 25,65	147,12 \pm 24,34
	4:00	9481,48 \pm 3014,06	57,35 \pm 13,69	167 \pm 41,8
	6:00	17676,2 \pm 5993,16	85,36 \pm 17,63	205,98 \pm 51,49
	8:00	20634,9 \pm 9902,66	79,54 \pm 44,41	272,58 \pm 40,02
	12:00	26510,93 \pm 7871,35	75,62 \pm 23,17	352,46 \pm 30,44
	20:00	49943,98 \pm 11046,34	111,29 \pm 35,59	461,41 \pm 59,34
	28:00	86554,84 \pm 19040,78	220,55 \pm 95,18	420,14 \pm 100,87
500 nM Staurosporin	2:00	21.175,62 \pm 13.418,32	120,85 \pm 53,04	170,35 \pm 63,46
	3:00	8214,71 \pm 2203,43	120,85 \pm 53,05	166,73 \pm 36,29
	4:00	18973,07 \pm 6235,8	49,11 \pm 5,95	254,62 \pm 73,23
	6:00	39276,99 \pm 8140,1	74,06 \pm 4,25	334,45 \pm 40,05
	8:00	69662,35 \pm 7269,8	117,5 \pm 18,87	506,94 \pm 158,43
	12:00	103328,47 \pm 12479,6	147,98 \pm 51	483,43 \pm 44,02
	20:00	126969,42 \pm 7721,94	215,75 \pm 38,97	315,46 \pm 93,13
	28:00	132517,19 \pm 13645,76	420,35 \pm 91,44	201,85 \pm 57,57

Tabelle 34: Calbindin Konzentration und LDH-Aktivität der Behandlung mit 1 μ M Ionomycin sowie 500 nM Staurosporin über 28 Stunden. Ergänzend Darstellung der an der LDH-Aktivität anteiligen Calbindin Freiwandung.

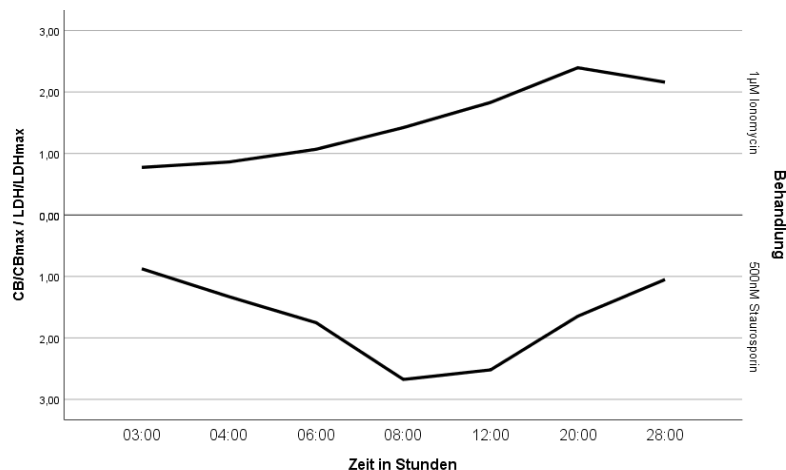


Abbildung 54: Darstellung des Verhältnisses der anteiligen Calbindin-Konzentration zur jeweilig anteiligen LDH-Aktivität. Auf der y-Achse mit gespiegelter Achse die anteilige Calbindin-Konzentration am Maximum, sowie die anteilige LDH-Aktivität am jeweiligen Maximum gegen die Zeit in Stunden auf der x-Achse. Oben die Behandlung mit 1 µM Ionomycin, unten die Behandlung mit 500 nM Staurosporin.

Das Verhältnis der anteiligen Calbindin-Konzentration zu der jeweiligen anteiligen LDH-Aktivität war bei der Behandlung mit 1 µM Ionomycin unter Vernachlässigung des zwei-Stunden Wertes nach sechs Stunden erstmalig größer 1. Für die Behandlung mit 500 nM Staurosporin wurde dies nach vier Stunden erreicht (Abbildung 54). In beiden Behandlungen verblieb das Verhältnis nachfolgend größer 1 (Tabelle 35). Eine vollständige Freierdung des gesamten enthaltenen Calbindin beziehungsweise des gesamten LDH wurde in keiner der Untersuchungen unter den eingesetzten Konzentrationen von Staurosporin und Ionomycin beobachtet.

Anteilige Freisetzung		Calbindin	LDH	Calbindin/LDH
1 µM Ionomycin	3:00	4,9 ± 1,8 %	6,5 ± 2,7 %	0,77 ± 0,19
	4:00	5,0 ± 1,7 %	5,7 ± 1,3 %	0,86 ± 0,17
	6:00	9,3 ± 3,3 %	8,5 ± 1,6 %	1,07 ± 0,24
	8:00	10,9 ± 5,5 %	8,00 ± 4,6 %	1,42 ± 0,24
	12:00	14,0 ± 4,6 %	7,6 ± 2,2 %	1,83 ± 0,09
	20:00	26,3 ± 6,8 %	11,2 ± 3,5 %	2,39 ± 0,23
	28:00	45,5 ± 11,7 %	21,9 ± 8,5 %	2,16 ± 0,36
500 nM Staurosporin	3:00	4,3 ± 1,1 %	4,9 ± 0,6 %	0,88 ± 0,25
	4:00	9,9 ± 3,2 %	7,4 ± 0,1 %	1,33 ± 0,42
	6:00	20,5 ± 4,3 %	11,8 ± 1,7 %	1,75 ± 0,33
	8:00	36,4 ± 3,9 %	14,9 ± 5,5 %	2,68 ± 0,96
	12:00	53,8 ± 3,8 %	21,7 ± 4,2 %	2,52 ± 0,31
	20:00	66,3 ± 5,5 %	42,1 ± 8,8 %	1,65 ± 0,53
	28:00	69,2 ± 8,3 %	68,1 ± 11,0 %	1,05 ± 0,31

Tabelle 35: Am 28 Stunden Kontrollwert anteilige Calbindin Konzentration und LDH-Aktivität der Zellbehandlung. Darstellung für 1 µM Ionomycin sowie 500 nM Staurosporin über 28 Stunden. Ergänzend dargestellt das Verhältnis Calbindin zu LDH.

5 Diskussion

Diese Arbeit sollte die Freisetzung von Calbindin D28k aus Zellen im Vergleich zu LDH im in vitro Modell darstellen. Die Voraussetzung war zunächst die Etablierung eines Calbindin ELISA und LDH Assay.

5.1 Calbindin ELISA

Mittels aufgereinigtem rekombinanten Calbindin konnte ein sensitiver, reliabler Calbindin ELISA mit einem großen Messbereich von 19 – 2500 pg/ml etabliert werden, der gleichzeitig eine deutliche Kosteneffizienz vorweisen konnte. So lagen grob orientierend die alleinigen Materialkosten ohne die Pufferkomponenten und den Proteinstandard geschätzt unter 65 € je 96-Well Platte. Durch die eigens erfolgte Etablierung war dabei die genaue Pufferzusammensetzung bekannt um mögliche Interaktions-bedingte Artefakte auszuschließen.

Die angewandte Doppel-Korrektur der 450 nm Messwerte des ELISA mit 550 nm einerseits und der Hintergrundkorrektur andererseits zeigte insgesamt keinen Informationsverlust. Nachfolgend der doppelt-korrigierten Werte konnten alle Standarddränge signifikant von einander unterschieden werden. Als untere Messgrenze konnte 19 pg/ml angenommen werden. Eine beispielhafte Standardkurve des Messbereichs 2500 pg/ml bis 19 pg/ml ist in Abbildung 55 aufgeführt.

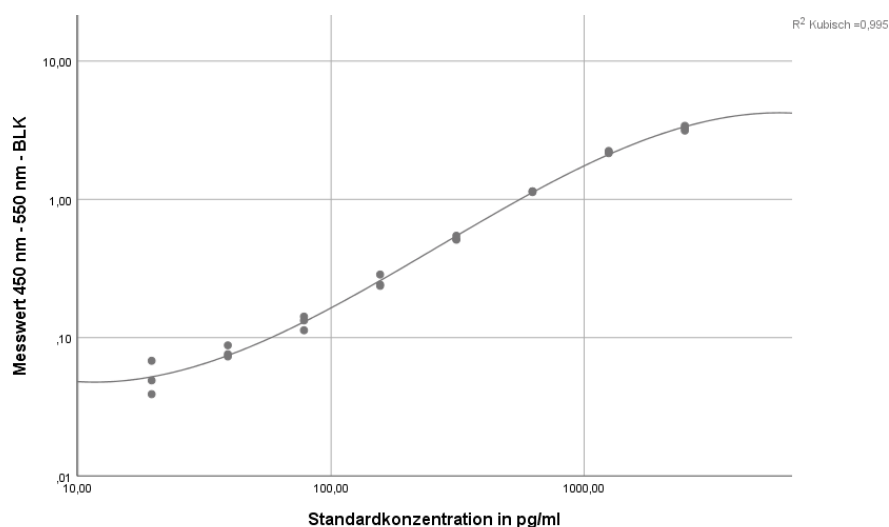


Abbildung 55: Beispielhafte ELISA Standardkurve dargestellt in doppelt logarithmiertem Koordinatensystem. Auf der x-Achse die Standardkonzentration in pg/ml. Auf der y-Achse der Wellenlängen und Nullwert korrigierte 450 nm Messwert. Anhand der Messpunkte wurde das Polynom 3. Grades berechnet.

Bei gleichzeitig deutlich zunehmender Varianz wurde die untere Messgrenze nicht weiter untersucht. Mit weniger als 10 % für die durchschnittliche Intra- und Inter-Test-Varianz wurden

gute Parameter erzielt. Im Bereich des linearen Messbereichs zwischen 100 und 2000 pg/ml zeigte der Test dabei sehr gute Intra- und Inter-Test-Varianzen, ohne dass die Position der Probe auf der Platte einen signifikanten Einfluss hatte.

Das etablierte Testverfahren konnte in einem Tris- wie auch einem Phosphat-Puffersystem verlässlich erfolgen. Die Tris-Variante des Puffersystems zeigte einen, dem Phosphat-System ähnlichen Verlauf, mit Abweichungen insbesondere im unteren Bereich des Messbereichs und in der Farbentwicklung. Bei der Notwendigkeit eines Calcium-haltigen Puffer beugte das Tris-Puffer-System zugleich insbesondere dem Ausfällen schwer-löslicher Calcium-Salze vor.

Mit einer graphisch geschätzten Halbwertszeit der Antikörper Verdünnung bei 4 °C und einem Signalverlust nach einer Aufbewahrungsdauer von 19 Tagen, ist es möglich eine ELISA Platte bereits zwei Wochen vor Verwendung vorbeschichtet einzulagern und letztlich den Test als zwei-Tages-Protokoll durchführen. Basierend auf den Daten recycelter Antikörper-Verdünnungen kann gegebenenfalls auch eine niedrigere Konzentration des Coating-Antikörpers ohne einen signifikanten Sensitivitätsverlust zum Einsatz kommen. Eine diesbezügliche Effizienz Anpassung wurde in dieser Arbeit jedoch nicht weiter verfolgt.

Für die gesonderte Darstellung von Calbindin ist hervorzuheben, dass die Untersuchung Calretinin exprimierender HN10e Zellen keine Signalentwicklung zeigte. Darüber hinaus wurde in der Testung von Gewebe-Lysaten in keiner der Proben von Calbindin-Knockout-Tieren eine Signalentwicklung gesehen. Die Erkennung anderer Struktur- und Sequenz-verwandter Calcium-bindender Proteine wurde somit in dem etablierten ELISA System ausgeschlossen.

5.2 Calcium abhängige Calbindin Erkennung

Die beiden unterschiedlichen Puffersysteme, die für den ELISA verwendet wurden zeigten ausschließlich in Gegenwart von CaCl_2 valide Messergebnisse mit einer ausreichenden Signalentwicklung. Insbesondere für das reine rekombinante Calbindin, jedoch nicht bei aus Gewebelysaten gewonnenen Proben, wurde dies beobachtet. Eine Untersuchung der drei Calcium-bindenden Proteine Parvalbumin, Calretinin und Calbindin zeigte, dass diese in Anwesenheit von Calcium-Ionen und somit in einer Calcium-gebundenen Form vorliegend besser von Antikörpern erkannt werden konnten. Dieser Effekt konnte auch bei Formalin-fixierten Protein beobachtet werden (Winsky & Kuznicki, 1996). Gezeigt wurde dies für den monoklonalen Antikörper 300. In der Herstellung des Antikörpers wurden B-Zellen aus Milzgewebe von Mäusen, die gegen Hühner-Calbindin D28k immunisiert wurden, mit Myelom-Zellen fusioniert (Celio et al., 1990). In dieser Prozedur ist, ebenso wie in dem Calbindin-

Extraktionsprotokoll kein zusätzliches Calcium zum Einsatz gekommen (Wasserman & Taylor, 1966).

Extrazellulär im Organismus liegen Calcium-Ionen in einer circa 10^4 -fach höheren Konzentration als intrazellulär vor. Unter diesen Bedingungen liegt Calbindin in einer vermehrt Calcium-gebundenen Form vor und zeigt entsprechend der Konformationsänderung eine der Calcium-ungebundenen Form gegenüber veränderte Oberfläche (Berggard, Miron, et al., 2002). Die Immunisierung der Mäuse in der Herstellung sowohl des monoklonalen als auch der Kaninchen des polyklonalen Antikörpers erfolgte somit am ehesten gegen die Epitope einer Calcium-gebundenen Calbindin-Form (swant, o. D.). In Anwesenheit erhöhter Calcium-Konzentrationen ist anzunehmen, dass Calbindin zu vermehrtem Anteil in einer Calcium-gebundenen Form vorliegt.

Im Gegensatz dazu wurden auch bereits Calcium abhängige Antikörperbindungen beschrieben. Dabei erkennt die Sequenz im Fab-Segment des Antikörpers das Epitop-gebundene Calcium (Hironiwa et al., 2016). Einen Anhalt für einen solchen Effekt zeigte sich bereits in der Erprobung unterschiedlicher Blockierungspuffer. Die Antikörper-Verdünnung in 5 % Milchpulver-Puffer zeigte deutlich erhöhte – wenngleich auch unspezifische Signalentwicklung – im Vergleich zu den anderen Puffer-Varianten. Das Versetzen des Puffersystems mit 1 mM CaCl_2 zeigte eine deutliche Zunahme von Signal aber auch des Hintergrundes, sodass anzunehmen ist, dass auch unspezifische Antikörperbindungen durch die Calcium-Ionen begünstigt werden. Die Signalzunahme auf das mehr als 20-fache des Nullwerts wurde für die Gewebe-Lysat-Probe nicht beobachtet. Hier ist anzunehmen, dass bereits ein Anteil des Calbindins in Calcium-gebundener Konformation vorlag.

5.3 Calbindin Doppelbande

In der Expression rekombinanten Calbindins zeigten sich in der Qualitätskontrolle der Proteinaufreinigung nach 16 Stunden Thrombin-Inkubation noch ungespaltenes GST-Fusionsprotein. Von einer längeren Inkubation wurde zur Vermeidung unspezifischer Spaltung des rekombinanten Proteins abgesehen, wenngleich Calbindin keine spezifischen Peptid-Schnittstellen für Thrombin vorweist (Expasy, 2020). Die weitere Aufreinigung wurde hierdurch nicht beeinflusst und ein wenn vorhanden trotzdem geringer Verlust rekombinanten Proteins wurde akzeptiert.

Die drei gepoolten Teilfraktionen der Benzamidin-Säulen-Aufreinigung zeigten in der Coomassie-Färbung keine nachweisbare Nebenbande. Obwohl unterschiedliche Proteine keine

homogene Sensitivität in der Coomassie-Färbung aufweisen, wurde die Sensitivität des Coomassie-Protokolls mit BSA erprobt, um eine mögliche Calbindin-basierte Bias zu vermeiden. Bei eingesetzten Mengen von 2,1 – 5,2 µg und einer Nachweisgrenze von ungefähr 0,1 µg konnte für keine der Proben eine Verunreinigung gezeigt werden. Entsprechend der für BSA bestimmten Nachweisgrenze der angewandten Coomassie-Färbung wurde das rekombinante Calbindin mit einer Reinheit von > 95 % definiert. Für die Konzentrationsbestimmung des Standardproteins wurde hier das rekombinante Protein in der Proteinbestimmung als rein betrachtet. Die MALDI-TOF Massenspektrometrie der AG Imhof der verwendeten Hochsalz-Fraktion konnte dies ebenfalls bestätigen.

Die deutliche Doppelbande im Gelverlauf, die für das durch das TH3.2 Plasmid exprimierte Calbindin beobachtet wurde, konnte nicht durch eine unterschiedliche Sequenz begründet werden. Die TH3.2-Calbindin Doppelbande zeigte jedoch – wie auch die SKNSEiCbA-Calbindin Bande – die Kleinhirn-Lysat-Calbindin Bande und die Bande rekombinanten Proteins ein durch CaCl_2 beziehungsweise EDTA beeinflussbares Laufverhalten in der Gelelektrophorese. Zu beachten ist hier, dass jede Probe vor dem Auftragen auf das Gel für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt wurde und in einem mit DTT versetzten SDS-basierten Puffersystem aufgetragen wurde und von einer SDS-Einlagerung und modifizierten Quartär-Struktur und Ladungsverteilung auszugehen ist. Für Calmodulin ist eine relative Hitzebeständigkeit bei 95 °C, insbesondere in Anwesenheit von Calcium-Ionen, bekannt (Means & Dedman, 1980). Im Falle des in Hefe-Pilzen exprimierten Calmodulins konnte experimentell eine ausbleibende Präzipitation des Proteins in kochendem Wasser für mehr als fünf Minuten verzeichnet werden (Davis et al., 1986). Eine ähnliche erhöhte Hitzebeständigkeit könnte auch für Calbindin angenommen werden. Eine inkomplette Denaturierung und zumindest teilweise erhaltene EF-Hand-Motive könnte bei entsprechend veränderter Tertiärstruktur zu einem anderen Gellaufverhalten führen. Eine Metallionen-Bindfähigkeit der SDS eingelagerten Quartär-Struktur kann nicht ausgeschlossen werden.

Das Vorhandensein oder Fehlen von Calcium-Ionen konnte die bei TH3.2-Calbindin beobachtete Doppelbande nicht erklären. Nachdem diese Doppelbande in jeder Probe beobachtet werden konnte, wäre analog zu den bekannten Splicing Alternativen bei Calretinin (Schwaller, 2014) oder Secretagoin (Alpar et al., 2012) auch eine kürzere, gesplicte Sequenz denkbar. Nach UniProt ist für humanes Calbindin eine zweite Isoform durch Fehlen der Aminosäuren 1 – 57 mit einer Größe von ungefähr 23 kDa bekannt (UniProt, 2023). Die Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen ist in Abbildung 56 aufgeführt.

A	B
MAESHLQSSLITASQFFEIWLHFDADGSGYLEG	MKTFVDQYQQRDDGKIGIVELAHVLPTEENFLL
KELQNLIQELQQARKKAGLELSPMKTFVDQY	LFRCQQLKSCEEFMKTWRKYDTHSGFIETEEL
GQRDDGKIGIVELAHVLPTEENFLLFRCQQLKS	KNFLKDLLEKANKTVDDTKLAEYTDLMLKLFDS
CEEFMKTWRKYDTHSGFIETEELKNFLKDLLE	NNDGKLELTEMARLLPVQENFLLKFQGIKMCG
KANKTVDDTKLAEYTDLMLKLFDSNNDGKLELT	KEFNKAFELYDQDNGYIDENELDALLKDLCEK
EMARLLPVQENFLLKFQGIKMCGKEFNKAFELY	NKQDLINNITTYKKNIMALSDGGKLYRTDLALI
DQDNGYIDENELDALLKDLCEKNKQDLGINNI	LCAGDN
TTYKKNIMALSDGGKLYRTDLALILCAGDN	

Abbildung 56: Aminosäuresequenz von humanem Calbindin D28k sowie der alternativen Splice Variante. Humanes Calbindin D28k (A). Alternative Splice Variante (B). Sequenz aus UniProt (UniProt, 2023).

5.4 Calbindin in Mausgewebe

Die in den Cerebellum-Lysaten der zwei Monate alten Wildtyp-Tiere bestimmten Calbindin-Konzentrationen waren vergleichbar zu den von Sprague-Dawley Ratten beschriebenen Werten von ungefähr 2,5 µg/mg (Villa et al., 1994). Die von Villa et al. bestimmten hippocampalen Calbindin-Konzentrationen waren dabei mit 0,57 µg/mg deutlich über den hier bestimmten Konzentrationen von 0,16 ng/µg. Für Wistar Ratten wurde hingegen einerseits eine CaBP/Gesamtprotein-Konzentration im Cerebellum von 15 µg/mg und im Hippocampus von 0,96 µg/mg beschrieben (Baimbridge et al., 1982). Andererseits finden sich bezogen auf das Gewebegewicht Angaben von 11,4 µg/mg im Cerebellum und 0,7 µg/mg im Cortex (Varela et al., 1998). Für C57BL/6J Mäuse wurde bei zwei Monate alten Tieren eine mittels Radioimmunoassay bestimmte Konzentration von 13 µg/mg Calbindin/Gesamtprotein im Cerebellum beschrieben (Iacopino et al., 1990). Zusammenfassend bestehen deutliche Unterschiede der beschriebenen Calbindin-Konzentrationen zwischen verschiedenen Versuchstierreihen. Weiteren Aufschluss könnte die Differenzierung der Calbindin-Konzentration und der jeweiligen Gesamtprotein Konzentration mit einem nachfolgenden Abgleich geben hinsichtlich absoluten oder relativen Differenzen.

Die Verteilung von Calbindin in unterschiedlichen Geweben zeigten für die Proben aus dem fünften Lebensmonat absolut geringere Werte. Dabei waren die gemessenen Calbindin-Werte für die Proben aus Cerebellum ($p < 0,001$), Parietalem Cortex ($p = 0,012$), Hippocampus ($p = 0,024$) und Niere ($p = 0,001$) signifikant niedriger, als die Messwerte der jüngeren und älteren Tiere. Bei der Beurteilung der Hirnstamm Proben ist jedoch eine mögliche Miterfassung

von cerebellaren Gewebe an den Sektionsgrenzen kritisch zu hinterfragen. Fokussiert auf die Anteile der hippocampalen Proben sowie die des parietalen Cortex zeigten sich altersabhängige Schwankungen der relativen Calbindin-Konzentration der Wildtyp-Tiere. In Relation zu den jeweiligen Mittelwerten der Konzentrationen im Cerebellum zeigten die Proben des Parietalen Cortex jedoch im fünf Monate alten Tier deutlich geringe Werte mit ungefähr 3 % gegenüber den sonst verzeichneten 8 %. Für das hippocampale Gewebe bestanden die relativ geringsten Werte mit ungefähr 4 % in den zwei Monate alten Tieren gegenüber den nachfolgenden 5 – 6 % der älteren Tiere. Im Vergleich entsprach in männlichen Wistar Ratten die anteilige Calbindin-Konzentration im Hippocampus etwa 6 % der cerebellaren Konzentration (Baimbridge et al., 1982).

Altersabhängige Veränderungen der Calbindin-Konzentrationen im zentralen Nervensystem wurden bereits in einer Vielzahl unterschiedlicher Nagetiere beschrieben (Bae et al., 2015; de Jong et al., 1996; Kishimoto et al., 1998). Die Abnahme der hippocampalen Calbindin-Konzentration ist hier für die adulten Tiere ab einem Alter von zwei Monaten beschrieben (Kishimoto et al., 1998; Lephart et al., 1998; Villa et al., 1994). Im Cerebellum männlicher Sprague-Dawley Ratten wurde eine abschließende Konzentrationsabnahme von Calbindin jedoch erst ab zwölf Monaten beobachtet (Kurobe et al., 1992; Villa et al., 1994). Nach initialem Anstieg wurde das maximale hippocampale Calbindin bereits mit 60 Lebenstagen bestimmt (Lephart et al., 1998). Die Anzahl immunoreaktiv positiver Zellen im parietalen Cortex war hingegen in heranwachsenden Wistar Ratten zwischen ein und 30 Lebenstagen im Vergleich zu adulten Tieren für Tiere mit 30 Lebenstagen am geringsten (Alcantara et al., 1993).

Die in Syrian Hamstern anhand der mRNA gemessene Calbindin D28k Expression zeigte im zentralen Nervensystem zwischen vier und 24 Monaten eine kontinuierliche Abnahme. Im Hippocampus erfolgte der Großteil der Expressionsabnahme ab 13 Lebensmonaten, im Striatum und im Cerebellum hingegen bis zum Erreichen von 13 Lebensmonaten (Kishimoto et al., 1998).

In C57BL/6J Mäusen wurde das Maximum der am Gesamtprotein anteiligen cerebellaren Calbindin-Konzentration, wie auch der bestimmten mRNA in den zwei Wochen alten Tieren bestimmt, mit einem nachfolgenden Plateau bis zur achten Lebenswoche ohne weitere Differenzierung der adulten Tiere bis zur 120. Lebenswoche (Iacopino et al., 1990).

Im Vergleich unterschiedlicher Calcium-bindender Proteine wurde insbesondere für Calbindin und Calretinin eine deutliche Konzentrationsabnahme im Alter gezeigt (Bae et al., 2015; de Jong et al., 1996; Kishimoto et al., 1998). Neben der direkt postnatalen Veränderungen innerhalb der ersten Lebensstage neonataler sowie nachfolgend juveniler Tiere fokussierten sich bisherige Untersuchungen auf den Wandel der adulten Tiere ins Senilium. Das bei C57Bl/6N Mäusen

verzeichnete Konzentrationstief, der am Gesamtprotein anteiligen Calbindin-Konzentration im fünften Lebensmonat, ebenso wie ein nachfolgender Anstieg der Konzentrationen bis zum 12. Lebensmonat, wurde auch bei Donryu Ratten beschrieben (Kurobe et al., 1992).

In der postnatalen Entwicklung sind bei Mäusen, Ratten und Hamstern die Spitzenwerte der Neurogenese der unterschiedlichen Hirnareale durchgehend vor dem 20. Lebenstag beschrieben (Finlay & Darlington, 1995). Dabei erreichen Mäuse mit dem 20. Lebenstag das maximale Gehirnvolumen (Chuang et al., 2011). Die postnatale Synaptogenese im parietalen Cortex erreicht nach 30 Lebenstagen das adulte Maximum (Semple et al., 2013). Mäuse werden dabei ab einem Alter von ungefähr zwei bis drei Monaten als adult angesehen (Jackson et al., 2017).

Bei gesonderter Betrachtung des Kleinhirns kann eine veränderte Calbindin-Konzentration durch die Calbindin-exprimierenden Purkinje-Zellen bedingt sein. Für C57BL/6J Mäuse konnte immunhistochemisch eine altersabhängige Abnahme der sich positiv anfärbenden Purkinje Zellen gezeigt werden (Iacopino et al., 1990). In C57BL/6 Mäusen wurde ab einem Alter von 16 Monaten eine Abnahme der Purkinje Zellzahl beobachtet (Doulazmi et al., 1999; Hadj-Sahraoui et al., 1996; Hadj-Sahraoui et al., 1997). Bei Unterteilung der Beobachtungszeiträume bestanden gleichzeitig stabile Werten von vier bis zwölf Monaten und einem Maximum der erfassten Zellzahlen in den acht Monate alten Tieren (Woodruff-Pak, 2006). Für das dendritische Wachstum der Purkinje-Zellen in B₆D₂F₁-Hybrid Mäusen wurde, bei stetiger Zunahme der dendritische Fläche bis zum Alter von 20 Tagen, eine Zunahme der Länge der Dendriten mit einer nachfolgenden Abnahme mit zunehmendem Alter (bis 250 Tage) beschrieben (Weiss & Pysh, 1978). In Wistar Ratten konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Purkinje Zellen bis zu einem Alter von zwölf Monaten zugenommen und nachfolgend wieder abgenommen hat. Gleichzeitig nahm das zelluläre Volumen bis zu einem Alter von sechs Monaten zu, das nukleoläre Volumen zeigte eine stetige Abnahme (Ogata et al., 1984). Bei Sprague-Dawley Ratten wurde eine Abnahme der Zahl der Purkinje Zellen von einem Alter von sechs Monaten bis 26 Monaten von ungefähr 25 % beschrieben (Rogers et al., 1984). Zunehmendes Alter führt zu signifikanten Einschränkungen der Purkinje-Zell Funktion (Zhang et al., 2010). Ein ursächlicher oder folgliches Zusammenhang mit der im zunehmendem Alter abnehmenden Calbindin-Konzentration erscheint hier naheliegend. Eine spezifische Erklärung der niedrigen Messwerte im fünften Lebensmonat lässt sie hier jedoch nicht abschließend finden. Wenngleich die cerebellare Calbindin Expression Vitamin D unabhängig erfolgt (Christakos et al., 1989) ist die Funktion des Proteins doch an den Calcium Haushalt des Organismus gekoppelt (Berggard, Miron, et al., 2002). Die Entwicklung der Nagetiere ist mit zwei Lebensmonaten dabei noch nicht

abgeschlossen und so wird beispielsweise die maximale Knochendichte unter anderem erst mit 26 Lebenswochen erreicht (Jackson et al., 2017).

Eine relative Zunahme des Gesamtproteins als Ursache des erfassten fünf-Monatstief der anteiligen Calbindin-Konzentration am Gesamtprotein konnte anhand der erfassten Daten nicht dargestellt werden. Aufschluss könnte die parallele Erfassung der mRNA-Expressionsmuster und der Calbindin-Konzentrationen in einem größeren Kollektiv juveniler und adulter Tiere geben.

5.5 LDH Assay

Die Erfassung von Zytotoxizität durch Aktivitätsbestimmung der freigesetzten LDH konnte mittels des etablierten LDH Assay erfolgen. Vorrangig basierend auf dem unter anderem von Kaja et al. und Chan et al. verwendeten Testprinzip wurde ein Protokoll aufgesetzt. Der finale LDH Assay konnte statistisch validiert werden und lieferte auch bei der Verwendung von Zellkultur-Medium reliable Messwerte. Nach Hintergrund-Korrektur konnten alle Standardränge signifikant von einander unterschieden und eine Aktivität von 0,51 mU/ml sicher von dem Nullwert abgegrenzt werden. Die obere Messgrenze des Assays lag bei 200 mU/ml. Eine beispielhafte Standardkurve des Messbereichs ist in Abbildung 57 dargestellt.

Die durchschnittliche Intra-Test-Varianz wie auch die Inter-Test-Varianz waren mit Werten unter 5 % beide akzeptabel und als konkurrenzfähig erachtet. Ein Einfluss der Position auf der Testplatte konnte ausgeschlossen werden. Lediglich eine konzentrationsbedingte Abhängigkeit der Varianzen wurde verzeichnet, die sich auch in den unteren Standardrängen widerspiegelte.

Die Farbentwicklung zeigte einerseits eine Abhängigkeit von dem verwendeten Puffer oder Medium und andererseits bestanden deutliche Unterschiede bei Variation der eingesetzten Triton X-100 Konzentration. Unter Verwendung einer einheitlichen Triton X-100 Konzentration für die Pufferzusammensetzung des LDH Assays waren die Proben vergleichbar und der Einfluss von Versuchsbedingungen, die als Störfaktoren einer vollständigen Lyse auftreten könnten, wurde so minimiert. Eine zuverlässige Lyse konnte unter Verwendung einer 1 % Triton X-100 Lösung bereits nach 15 Minuten erzielt werden, für längere Inkubationen zeigte sich kein weiterer Anstieg der LDH-Aktivität. Für Triton X-100 ist abhängig von dem verwendeten Wasser ab einer Konzentration von 0,02 % bereits eine vollständige Reduktion der Oberflächenspannung, ohne nachfolgende Änderung bei weiterer Konzentrationssteigerung beschrieben (Rahul Saha, 2017). Folglich könnte auch eine geringere Konzentration als 1 %

Triton X-100 eine komplette Lyse bewirken. Eine weitere Optimierung diesbezüglich ist nicht erfolgt.

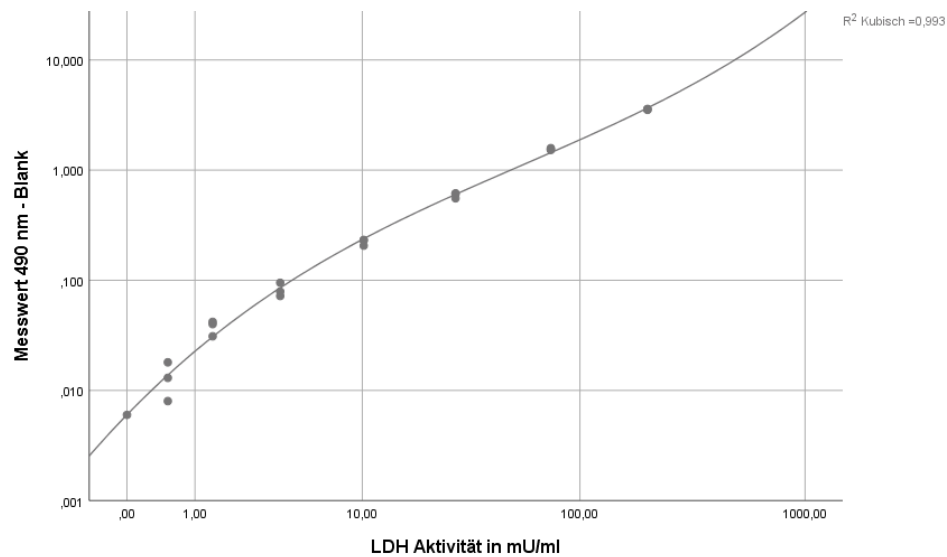


Abbildung 57: Beispielhafte LDH Assay Standardkurve dargestellt in doppelt logarithmiertem Koordinatensystem. Auf der x-Achse die Standardkonzentration in pg/ml. Auf der y-Achse der Nullwert korrigierte 490 nm Messwert. Anhand der Messpunkte wurde das Polynom 3. Grades berechnet.

Die LDH-Aktivität zeigte in Abhängigkeit der Lagerungsbedingungen deutliche Unterschiede. Zurückzuführen ist dies am ehesten auf das Denaturieren von Proteinen bei Gefriervorgängen, das in diesem Fall erfassbar durch die verbliebene LDH-Aktivität wird. Für den Effekt von Gefrier- und Tauprozessen auf die LDH-Aktivität konnte gezeigt werden, dass bei schnellen Gefrier- und Tauprozessen eine höhere Aktivität-Messung möglich ist – wenngleich selbst unter besten Bedingungen ein Aktivitäts-Verlust von 15 – 20 % bestand (Cao et al., 2003). Zur Vermeidung Lagerungsbedingter Testschwankungen erfolgte die Lagerung der Proben sowie der Standard-Lösungen deshalb bei 4 °C. Für die Lagerung einer resuspendierten und verdünnten LDH-Standard-Lösung konnte eine Haltbarkeit ohne Aktivitätsverlust von etwa 15 Tagen bei einer Lagerung bei 4 °C angenommen werden. Die Halbwertszeit des LDH Standards lag bei 119 Tagen.

Die Entnahme der Proben mittels Pipette zeigte keine relevanten Unterschiede zu einer Gewinnung mittels Filtrierung. Von falsch hohen Messwerten aufgrund von Scherkräften bedingtem Zelluntergang konnte nicht ausgegangen werden.

5.6 Calbindin Halbwertszeit

Zum Ausschluss einer Protein-Zerfallsbedingten Verfälschung der Messergebnisse wurde die Halbwertszeit des rekombinanten Calbindin D28k den Testbedingungen entsprechend in DMEM-Medium erhoben. Dabei zeigte sich eine Halbwertszeit von ungefähr 79 Stunden. Im Gegensatz zu den Ansätzen mit lysierten und vitalen Zellen erfolgte die Inkubation hier in einem

geschlossenen System. Eine mögliche Beeinflussung durch unspezifische Protein-Materialbindung ist jedoch final nicht auszuschließen. Die Testreihe der vitalen sowie der lysierten Zellen in Zellkulturschalen zeigte ab einer Inkubation von 48 Stunden zunehmende Verdunstungseffekte. Eine vollständige Abdichtung der Zellkulturschalen zur Kontrolle der auftretenden Verdunstungseffekte war in Folge des dadurch aufgehobenen Gasaustausch jedoch nicht möglich. Im Vergleich der näherungsweise bestimmten Halbwertszeiten war im Fall des rekombinanten Calbindins im Medium lysierter Zellen der 50 %-Wert bereits 26 Stunden vor der Probe des Mediums vitaler Zellen erreicht. In diesem Versuchsaufbau entspricht dies einer ungefähr 20 % verkürzten Halbwertszeit bei Freiwerden intrazellulärer Proteasen.

Für die Stabilität von LDH existieren bereits in der Literatur entsprechende Daten. So konnte für die Aktivität von LDH in Serum-freien Medium bei 37 °C über einen Zeitraum von ungefähr drei Tagen kein relevanter Abfall verzeichnet werden (Koh & Choi, 1987).

5.7 Calbindin-Freisetzung im Zellmodell

Mit der Behandlung mit Staurosporin und alternativ Ionomycin konnten zwei unterschiedliche apoptotische Wege erfasst werden. Die zytoprotektive Wirkung von Calbindin ist bereits an anderer Stelle vielfach untersucht worden (Bobay et al., 2012; Iacopino et al., 1992). Entsprechend wurde auf eine Kontrolle nativer HN10e Zellen verzichtet, da hier ausschließlich die Freisetzung von Calbindin im Vergleich zur LDH-Freisetzung betrachtet werden sollte. Die Messung des freigesetzten LDH diene einerseits als Maß der Apoptose der Zellkultur im Gesamten und andererseits als unspezifisches, intrazellulär ubiquitär vorkommendes Protein. Von einer Probengewinnung unbehandelter transfizierter HN10e Zellen zu jedem Zeitpunkt wurde abgesehen. Die unbehandelte Kontrolle diene der Erfassung der nach 28 Stunden in Medium und Zellen maximal vorliegenden Calbindin- und LDH-Konzentrationen, anhand derer die Prozentränge der im Medium gemessenen Konzentrationen definiert wurden. Der Vergleich der zwei Stunden und der 28 Stunden Kontrollen diene dabei auch insbesondere dem Ausschluss von Differenzen, die durch Zellproliferation oder Zerfallsprozesse bedingt sein könnten.

Die Kontrollen zeigten über 26 Stunden eine Zunahme der gesamt LDH-Aktivität von ungefähr 30 %. Im Vergleich dazu nahm die gesamt Calbindin-Konzentration um ungefähr 35 % zu. Die Transfektion hatte keine relevante Auswirkung auf die LDH Expression und entsprechend wurde eine vergleichbare Proteinexpression angenommen. LDH in RPMI Zellkultur-Medium zeigt über 24 Stunden keine Aktivitätsabnahme (Han et al., 2011). In einer Zellkultur unter Serum-freien Kulturbedingungen wurde für über 72 Stunden eine Stabilität der LDH-Aktivität beschrieben

(Koh & Choi, 1987). Eine zerfallsbedingte Verfälschung der LDH-Aktivität wurde entsprechend als unwahrscheinlich erachtet.

Die im Medium bestimmten Konzentrationen nahmen über 26 Stunden für Calbindin um 25 % und für LDH um 6 % zu. In den mit Ionomycin und Staurosporin behandelten Mediumproben lag die Zunahme gegenüber der Kontrolle für Calbindin bei 20,5 % (Ionomycin) und 44 % (Staurosporin). Die Zunahme der gemessenen LDH-Aktivität lag bei 16 % (Ionomycin) und 62 % (Staurosporin). Bei wenngleich anzunehmender inhomogener Calbindin Expression bedingt durch Transfektion und Proliferation wurde ein isolierter Untergang transfizierter Zellen nicht angenommen. Eine erhöhte Vulnerabilität im Falle einer Triton X-100 basierten Lyse wurde nicht beobachtet.

Durch die durch 500 nM Staurosporin induzierte Apoptose konnten nach 28 Stunden fast 70 % der gesamten Calbindin und LDH Konzentration im Medium nachgewiesen werden. Dabei war die Kinetik freigesetzten Calbindins bereits deutlich früher höher als die korrespondierende LDH-Aktivität. Nach vier Stunden waren die gemessenen Calbindin Werte bereits deutlich von dem drei-Stunden Wert abzugrenzen. Der größte Anstieg der Calbindin-Konzentration im Vergleich zur freigesetzten LDH-Aktivität lag bereits im ersten Drittel nach Behandlungsbeginn zwischen sechs und acht Stunden. Das anteilige Maximum wurde in der acht-Stunden Probe bestimmt. Im in vitro Modell transfizierter HN10e Zellen scheint Calbindin dabei ein frühzeitiger Indikator induzierter Zellschädigung durch Staurosporin zu sein.

Im Vergleich hierzu stieg bei Behandlung mit 1 μ M Ionomycin die freigesetzte Calbindin-Konzentration gegenüber der LDH-Aktivität erst nach zwölf Stunden auf das Doppelte an. Nach sechs Stunden war das ins Medium freigesetzte Calbindin deutlich von den drei- und vier-Stunden Werten abgrenzbar. Deutliche Unterschiede der im Medium bestimmten LDH-Aktivität waren erst nach 20 Stunden ersichtlich. Damit war auch im Falle der durch Ionomycin induzierten Apoptose das Maß der Zellschädigung durch Anstieg der Calbindin-Konzentration im Medium deutlich vor einem entsprechenden Anstieg der LDH-Aktivität erfassbar.

Zusammengefasst zeigte sich Calbindin im in vitro Zellmodell transfizierter HN10e Zellen gegenüber LDH deutlich überlegen in der Erfassung unspezifischer Zellschädigung. Bei gleichzeitig langer Stabilität des Proteins bei 37 °C präsentierte Calbindin gute Eigenschaften eines möglichen Biomarkers. In vivo könnte Calbindin durch die selektive Expression damit als früher Biomarker der Schädigung spezifischer Organe beziehungsweise Zellen dienen. Die Relevanz in vivo ist dabei insbesondere abhängig von der Eliminationsrate, die hier an dieser Stelle nicht untersucht wurde. Wenngleich Parallelen zu nativen Zellen neuronalen Ursprungs bestehen, handelt es sich bei der HN10e Zelllinie doch letztlich um immortalisierte Hybrid-

Zellen. Zur Beurteilbarkeit von Calbindin als Biomarker sollte eine in vitro Testung extrahierter – nativ Calbindin produzierender – Zellen erfolgen. Neben Purkinje Zellen können auch hippocampale Neurone in betracht gezogen werden. Einen besonderen Stellenwert haben andererseits Tubulusepithelzellen hinsichtlich der Beurteilbarkeit in renalem Gewebe. Das proximale Tubulusepithel besitzt dabei insgesamt eine langsame Proliferationsrate (Fujigaki, 2012). Die Eliminationsraten und Stabilitäten von Calbindin in Blut, beziehungsweise Serum, Liquor aber auch Urin sind diesbezüglich noch nicht hinreichend beschrieben. Vor allem die Normalwerte der jeweiligen Körperflüssigkeiten müssen für eine aussagekräftige Beurteilbarkeit in großen Kollektiven erhoben werden. Für Serum wurden in einem Kollektiv von 81 Patienten mit Nieren- oder Uretersteinen Normwerte unter 60 pg/ml beschrieben (Hasegawa et al., 1993). In einem Kollektiv von 39 Patienten wurde die Calbindin-Konzentration im Urin mit 0,31 – 114,0 ng/ml, beziehungsweise standardisiert auf Kreatinin 1,6 – 133,3 ng/mg bestimmt (Brott et al., 2014). Speziell auf das zentrale Nervensystem bezogen wurden im Liquor von sechs Monate alten Katzen Normwerte von $9,0 \pm 2,0$ ng/ml beschrieben (Bradbury et al., 2016).

Die erhobenen Daten legen nahe, dass Calbindin neben einer Rolle als Biomarker chronisch degenerativer Erkrankungen insbesondere auch als Maß der akuten Zellschädigung dienen kann. Auch wenn noch weitere Fragestellungen zu klären sind, kann durch die Erfassung von Calbindin die Darstellung der Zellschädigung spezifischer Zellen möglich werden.

6 Literaturverzeichnis

- Adedeji, A. O., Gu, Y. Z., Pourmohamad, T., Kanerva, J., Chen, Y., Atabakhsh, E., Tackett, M. R., Chen, F., Bhatt, B., Gury, T., Dorchie, O., Sonee, M., Morgan, M., Burkey, J., Gautier, J. C., & McDuffie, J. E. (2021). The Utility of Novel Urinary Biomarkers in Mice for Drug Development Studies. *Int J Toxicol*, *40*(1), 15-25. <https://doi.org/10.1177/1091581820970498>
- Airaksinen, M. S., Eilers, J., Garaschuk, O., Thoenen, H., Konnerth, A., & Meyer, M. (1997). Ataxia and altered dendritic calcium signaling in mice carrying a targeted null mutation of the calbindin D28k gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(4), 1488-1493. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.4.1488>
- Airaksinen, M. S., Thoenen, H., & Meyer, M. (1997). Vulnerability of midbrain dopaminergic neurons in calbindin-D28k-deficient mice: lack of evidence for a neuroprotective role of endogenous calbindin in MPTP-treated and weaver mice. *Eur J Neurosci*, *9*(1), 120-127. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01360.x>
- Alberts, B. (2008). *Molecular biology of the cell* (5th ed.). Garland Science.
- Alcantara, S., Ferrer, I., & Soriano, E. (1993). Postnatal development of parvalbumin and calbindin D28K immunoreactivities in the cerebral cortex of the rat. *Anat Embryol (Berl)*, *188*(1), 63-73. <https://doi.org/10.1007/BF00191452>
- Alpar, A., Attems, J., Mulder, J., Hokfelt, T., & Harkany, T. (2012). The renaissance of Ca²⁺-binding proteins in the nervous system: secretagogin takes center stage. *Cell Signal*, *24*(2), 378-387. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.09.028>
- Bae, E. J., Chen, B. H., Shin, B. N., Cho, J. H., Kim, I. H., Park, J. H., Lee, J. C., Tae, H. J., Choi, S. Y., Kim, J. D., Lee, Y. L., Won, M. H., & Ahn, J. H. (2015). Comparison of immunoreactivities of calbindin-D28k, calretinin and parvalbumin in the striatum between young, adult and aged mice, rats and gerbils. *Neurochem Res*, *40*(4), 864-872. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1537-x>
- Baimbridge, K. G., Miller, J. J., & Parkes, C. O. (1982). Calcium-binding protein distribution in the rat brain. *Brain Res*, *239*(2), 519-525. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90526-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90526-1)
- Bellido, T., Huening, M., Raval-Pandya, M., Manolagas, S. C., & Christakos, S. (2000). Calbindin-D28k is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity. *J Biol Chem*, *275*(34), 26328-26332. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003600200>
- Belmokhtar, C. A., Hillion, J., & Segal-Bendirdjian, E. (2001). Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene*, *20*(26), 3354-3362. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204436>
- Berggard, T., Miron, S., Onnerfjord, P., Thulin, E., Akerfeldt, K. S., Enghild, J. J., Akke, M., & Linse, S. (2002). Calbindin D28k exhibits properties characteristic of a Ca²⁺ sensor. *J Biol Chem*, *277*(19), 16662-16672. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200415200>
- Berggard, T., Szczepankiewicz, O., Thulin, E., & Linse, S. (2002). Myo-inositol monophosphatase is an activated target of calbindin D28k. *J Biol Chem*, *277*(44), 41954-41959. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203492200>
- Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K. W., & Pommier, Y. (1994). Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp Cell Res*, *211*(2), 314-321. <https://doi.org/10.1006/excr.1994.1093>
- Blum, W., & Schwaller, B. (2013). Calretinin is essential for mesothelioma cell growth/survival in vitro: a potential new target for malignant mesothelioma therapy? *Int J Cancer*, *133*(9), 2077-2088. <https://doi.org/10.1002/ijc.28218>
- Bobay, B. G., Stewart, A. L., Tucker, A. T., Thompson, R. J., Varney, K. M., & Cavanagh, J. (2012). Structural insights into the calcium-dependent interaction between calbindin-D28K and caspase-3. *FEBS Lett*, *586*(20), 3582-3589. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.08.032>

- Bradbury, A., Bagel, J., Sampson, M., Farhat, N., Ding, W., Swain, G., Prociuk, M., O'Donnell, P., Drobatz, K., Gurda, B., Wassif, C., Remaley, A., Porter, F., & Vite, C. (2016). Cerebrospinal Fluid Calbindin D Concentration as a Biomarker of Cerebellar Disease Progression in Niemann-Pick Type C1 Disease. *J Pharmacol Exp Ther*, *358*(2), 254-261. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.232975>
- Brott, D. A., Adler, S. H., Arani, R., Lovick, S. C., Pinches, M., & Furlong, S. T. (2014). Characterization of renal biomarkers for use in clinical trials: biomarker evaluation in healthy volunteers. *Drug Des Devel Ther*, *8*, 227-237. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S54956>
- Burd, J. F., & Usategui-Gomez, M. (1973). A colorimetric assay for serum lactate dehydrogenase. *Clin Chim Acta*, *46*(3), 223-227. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(73\)90174-5](https://doi.org/10.1016/0009-8981(73)90174-5)
- Butler, J. E., McGivern, P. L., & Swanson, P. (1978). Amplification of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the detection of class-specific antibodies. *J Immunol Methods*, *20*, 365-383. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(78\)90272-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(78)90272-7)
- Cantarero, L. A., Butler, J. E., & Osborne, J. W. (1980). The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays. *Anal Biochem*, *105*(2), 375-382. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90473-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90473-x)
- Cao, E., Chen, Y., Cui, Z., & Foster, P. R. (2003). Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnol Bioeng*, *82*(6), 684-690. <https://doi.org/10.1002/bit.10612>
- Castro, C. Y., Stephenson, M., Gondo, M. M., Medeiros, L. J., & Cagle, P. T. (2000). Prognostic implications of calbindin-D28k expression in lung cancer: analysis of 452 cases. *Mod Pathol*, *13*(7), 808-813. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880141>
- Catt, K., & Tregear, G. W. (1967). Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes. *Science*, *158*(3808), 1570-1572. <https://doi.org/10.1126/science.158.3808.1570>
- Celio, M. R. (1990). Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*, *35*(2), 375-475. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90091-h](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90091-h)
- Celio, M. R., Baier, W., Scharer, L., Gregersen, H. J., de Viragh, P. A., & Norman, A. W. (1990). Monoclonal antibodies directed against the calcium binding protein Calbindin D-28k. *Cell Calcium*, *11*(9), 599-602. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(90\)90014-l](https://doi.org/10.1016/0143-4160(90)90014-l)
- Chan, F. K., Moriwaki, K., & De Rosa, M. J. (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol*, *979*, 65-70. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2_7
- Christakos, S., Gabrielides, C., & Rhoten, W. B. (1989). Vitamin D-dependent calcium binding proteins: chemistry, distribution, functional considerations, and molecular biology. *Endocr Rev*, *10*(1), 3-26. <https://doi.org/10.1210/edrv-10-1-3>
- Chuang, N., Mori, S., Yamamoto, A., Jiang, H., Ye, X., Xu, X., Richards, L. J., Nathans, J., Miller, M. I., Toga, A. W., Sidman, R. L., & Zhang, J. (2011). An MRI-based atlas and database of the developing mouse brain. *Neuroimage*, *54*(1), 80-89. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.07.043>
- Cleland, W. W. (1964). Dithiothreitol, a New Protective Reagent for Sh Groups. *Biochemistry*, *3*, 480-482. <https://doi.org/10.1021/bi00892a002>
- Crowther, J. R. (2000). The ELISA guidebook. *Methods Mol Biol*, *149*, III-IV, 1-413. <https://doi.org/10.1385/1592590497>
- Davis, T. N., Urdea, M. S., Masiarz, F. R., & Thorner, J. (1986). Isolation of the yeast calmodulin gene: calmodulin is an essential protein. *Cell*, *47*(3), 423-431. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90599-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90599-4)
- de Jong, G. I., Naber, P. A., Van der Zee, E. A., Thompson, L. T., Disterhoft, J. F., & Luiten, P. G. (1996). Age-related loss of calcium binding proteins in rabbit hippocampus. *Neurobiol Aging*, *17*(3), 459-465. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(96\)00030-9](https://doi.org/10.1016/0197-4580(96)00030-9)
- Decker, T., & Lohmann-Matthes, M. L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor

- necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods*, 115(1), 61-69. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(88\)90310-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(88)90310-9)
- Doulazmi, M., Frederic, F., Lemaigre-Dubreuil, Y., Hadj-Sahraoui, N., Delhay-Bouchaud, N., & Mariani, J. (1999). Cerebellar Purkinje cell loss during life span of the heterozygous staggerer mouse (Rora(+)/Rora(sg)) is gender-related. *J Comp Neurol*, 411(2), 267-273. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10404252>
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-x](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-x)
- ExPasy. (2020). *PeptideCutter*. Retrieved 06.12.2023 from https://web.expasy.org/peptide_cutter/
- Faucheux, C., Bareille, R., & Amedee, J. (1998). Synthesis of calbindin-D28K during mineralization in human bone marrow stromal cells. *Biochem J*, 333 (Pt 3), 817-823. <https://doi.org/10.1042/bj3330817>
- Finlay, B. L., & Darlington, R. B. (1995). Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science*, 268(5217), 1578-1584. <https://doi.org/10.1126/science.7777856>
- FPbase. (2023). *EGFP*. Retrieved 06.12.2023 from <https://www.fpbases.org/protein/egfp/>
- Fujigaki, Y. (2012). Different modes of renal proximal tubule regeneration in health and disease. *World J Nephrol*, 1(4), 92-99. <https://doi.org/10.5527/wjn.v1.i4.92>
- Garcia, J. G., Schaphorst, K. L., Shi, S., Verin, A. D., Hart, C. M., Callahan, K. S., & Patterson, C. E. (1997). Mechanisms of ionomycin-induced endothelial cell barrier dysfunction. *Am J Physiol*, 273(1 Pt 1), L172-184. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1997.273.1.L172>
- Gay, R. J., McComb, R. B., & Bowers, G. N., Jr. (1968). Optimum reaction conditions for human lactate dehydrogenase isoenzymes as they affect total lactate dehydrogenase activity. *Clin Chem*, 14(8), 740-753. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4299285>
- George, B., Wen, X., Mercke, N., Gomez, M., O'Bryant, C., Bowles, D. W., Hu, Y., Hogan, S. L., Joy, M. S., & Aleksunes, L. M. (2020). Time-dependent changes in kidney injury biomarkers in patients receiving multiple cycles of cisplatin chemotherapy. *Toxicol Rep*, 7, 571-576. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.04.003>
- Gil-Parrado, S., Fernandez-Montalvan, A., Assfalg-Machleidt, I., Popp, O., Bestvater, F., Holloschi, A., Knoch, T. A., Auerswald, E. A., Welsh, K., Reed, J. C., Fritz, H., Fuentes-Prior, P., Spiess, E., Salvesen, G. S., & Machleidt, W. (2002). Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *J Biol Chem*, 277(30), 27217-27226. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202945200>
- Greene, J. R., Radenahmad, N., Wilcock, G. K., Neal, J. W., & Pearson, R. C. (2001). Accumulation of calbindin in cortical pyramidal cells with ageing; a putative protective mechanism which fails in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 27(5), 339-342. <https://doi.org/10.1046/j.0305-1846.2001.00351.x>
- Guo, Q., Christakos, S., Robinson, N., & Mattson, M. P. (1998). Calbindin D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6), 3227-3232. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3227>
- Hadj-Sahraoui, N., Frederic, F., Delhay-Bouchaud, N., & Mariani, J. (1996). Gender effect on Purkinje cell loss in the cerebellum of the heterozygous reeler mouse. *J Neurogenet*, 11(1-2), 45-58. <https://doi.org/10.3109/01677069609107062>
- Hadj-Sahraoui, N., Frederic, F., Zanjani, H., Herrup, K., Delhay-Bouchaud, N., & Mariani, J. (1997). Purkinje cell loss in heterozygous staggerer mutant mice during aging. *Brain Res Dev Brain Res*, 98(1), 1-8. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(96\)00153-8](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(96)00153-8)
- Han, X., Gelein, R., Corson, N., Wade-Mercer, P., Jiang, J., Biswas, P., Finkelstein, J. N., Elder, A., & Oberdorster, G. (2011). Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity. *Toxicology*, 287(1-3), 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.06.011>

- Hansted, J. G., Wejse, P. L., Bertelsen, H., & Otzen, D. E. (2011). Effect of protein-surfactant interactions on aggregation of beta-lactoglobulin. *Biochim Biophys Acta*, *1814*(5), 713-723. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.03.011>
- Hasegawa, S., Kato, K., Takashi, M., Zhu, Y., Obata, K., Kinukawa, T., & Miyake, K. (1993). Increased levels of calbindin-D in serum and urine from patients treated by extracorporeal shock wave lithotripsy. *J Urol*, *149*(6), 1414-1418. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)36403-0](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)36403-0)
- Heinrich, P. C., Heinrich, P. C., Müller, M., & Graeve, L. (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (9th 2014. ed.). Springer Berlin Heidelberg : Imprint: Springer. <https://link.springer.com/10.1007/978-3-642-17972-3>
- Hironiwa, N., Ishii, S., Kadono, S., Iwayanagi, Y., Mimoto, F., Habu, K., Igawa, T., & Hattori, K. (2016). Calcium-dependent antigen binding as a novel modality for antibody recycling by endosomal antigen dissociation. *MAbs*, *8*(1), 65-73. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1110660>
- Hoffmann, D., Fuchs, T. C., Henzler, T., Matheis, K. A., Herget, T., Dekant, W., Hewitt, P., & Mally, A. (2010). Evaluation of a urinary kidney biomarker panel in rat models of acute and subchronic nephrotoxicity. *Toxicology*, *277*(1-3), 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.08.013>
- Holbrook, J. J., Liljas, A., Steindel, S. J., & Rossmann, M. G. (1975). 4 Lactate Dehydrogenase. In P. D. Boyer (Ed.), *The Enzymes* (Vol. 11, pp. 191-292). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(08\)60212-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1874-6047(08)60212-7)
- Hufschmidt, A., & Amtage, F. (2017). *Neurologie compact*. Georg Thieme Verlag.
- Hunziker, W. (1986). The 28-kDa vitamin D-dependent calcium-binding protein has a six-domain structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *83*(20), 7578-7582. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.20.7578>
- Iacopino, A., Christakos, S., German, D., Sonsalla, P. K., & Altar, C. A. (1992). Calbindin-D28K-containing neurons in animal models of neurodegeneration: possible protection from excitotoxicity. *Brain Res Mol Brain Res*, *13*(3), 251-261. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(92\)90033-8](https://doi.org/10.1016/0169-328x(92)90033-8)
- Iacopino, A. M., Rhoten, W. B., & Christakos, S. (1990). Calcium binding protein (calbindin-D28k) gene expression in the developing and aging mouse cerebellum. *Brain Res Mol Brain Res*, *8*(4), 283-290. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(90\)90041-b](https://doi.org/10.1016/0169-328x(90)90041-b)
- Jackson, S. J., Andrews, N., Ball, D., Bellantuono, I., Gray, J., Hachoumi, L., Holmes, A., Latcham, J., Petrie, A., Potter, P., Rice, A., Ritchie, A., Stewart, M., Strepka, C., Yeoman, M., & Chapman, K. (2017). Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes. *Lab Anim*, *51*(2), 160-169. <https://doi.org/10.1177/0023677216653984>
- Jacobsen, M. D., Weil, M., & Raff, M. C. (1996). Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. *J Cell Biol*, *133*(5), 1041-1051. <https://doi.org/10.1083/jcb.133.5.1041>
- Johnson, J. A., Grande, J. P., Roche, P. C., & Kumar, R. (1994). Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)2D3 receptor and calbindin D28k in human and rat pancreas. *Am J Physiol*, *267*(3 Pt 1), E356-360. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1994.267.3.E356>
- Kaja, S., Payne, A. J., Singh, T., Ghuman, J. K., Sieck, E. G., & Koulen, P. (2015). An optimized lactate dehydrogenase release assay for screening of drug candidates in neuroscience. *J Pharmacol Toxicol Methods*, *73*, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.02.001>
- Katsetos, C. D., Herman, M. M., Krishna, L., Vender, J. R., Vinoros, S. A., Agamanolis, D. P., Schiffer, D., Burger, P. C., & Urich, H. (1995). Calbindin-D28k in subsets of medulloblastomas and in the human medulloblastoma cell line D283 Med. *Arch Pathol Lab Med*, *119*(8), 734-743. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7646332>
- Kawasaki, H., & Kretsinger, R. H. (2017). Structural and functional diversity of EF-hand proteins: Evolutionary perspectives. *Protein Sci*, *26*(10), 1898-1920. <https://doi.org/10.1002/pro.3233>

- Khan, A. A., Allemailem, K. S., Alhumaydhi, F. A., Gowder, S. J. T., & Rahmani, A. H. (2020). The Biochemical and Clinical Perspectives of Lactate Dehydrogenase: An Enzyme of Active Metabolism. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 20(6), 855-868. <https://doi.org/10.2174/1871530320666191230141110>
- Kishimoto, J., Tsuchiya, T., Cox, H., Emson, P. C., & Nakayama, Y. (1998). Age-related changes of calbindin-D28k, calretinin, and parvalbumin mRNAs in the hamster brain. *Neurobiol Aging*, 19(1), 77-82. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(97\)00166-8](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(97)00166-8)
- Kligman, D., & Hilt, D. C. (1988). The S100 protein family. *Trends Biochem Sci*, 13(11), 437-443. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(88\)90218-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(88)90218-6)
- Koh, J. Y., & Choi, D. W. (1987). Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods*, 20(1), 83-90. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(87\)90041-0](https://doi.org/10.1016/0165-0270(87)90041-0)
- Koh, J. Y., Wie, M. B., Gwag, B. J., Sensi, S. L., Canzoniero, L. M., Demaro, J., Csernansky, C., & Choi, D. W. (1995). Staurosporine-induced neuronal apoptosis. *Exp Neurol*, 135(2), 153-159. <https://doi.org/10.1006/exnr.1995.1074>
- Kook, S. Y., Jeong, H., Kang, M. J., Park, R., Shin, H. J., Han, S. H., Son, S. M., Song, H., Baik, S. H., Moon, M., Yi, E. C., Hwang, D., & Mook-Jung, I. (2014). Crucial role of calbindin-D28k in the pathogenesis of Alzheimer's disease mouse model. *Cell Death Differ*, 21(10), 1575-1587. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.67>
- Korzeniewski, C., & Callewaert, D. M. (1983). An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 64(3), 313-320. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90438-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90438-6)
- Kurobe, N., Inaguma, Y., Shinohara, H., Semba, R., Inagaki, T., & Kato, K. (1992). Developmental and age-dependent changes of 28-kDa calbindin-D in the central nervous tissue determined with a sensitive immunoassay method. *J Neurochem*, 58(1), 128-134. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb09287.x>
- Langeh, U., & Singh, S. (2021). Targeting S100B Protein as a Surrogate Biomarker and its Role in Various Neurological Disorders. *Curr Neuropharmacol*, 19(2), 265-277. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200729100427>
- Lee, H. J., Hammond, D. N., Large, T. H., Roback, J. D., Sim, J. A., Brown, D. A., Otten, U. H., & Wainer, B. H. (1990). Neuronal properties and trophic activities of immortalized hippocampal cells from embryonic and young adult mice. *J Neurosci*, 10(6), 1779-1787. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2113086>
- Lephart, E. D., Taylor, H., Jacobson, N. A., & Watson, M. A. (1998). Calretinin and calbindin-D28K in male rats during postnatal development. *Neurobiol Aging*, 19(3), 253-257. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(98\)00060-8](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(98)00060-8)
- Liu, C., & Hermann, T. E. (1978). Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem*, 253(17), 5892-5894. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28319>
- Lutz, W., Frank, E. M., Craig, T. A., Thompson, R., Venters, R. A., Kojetin, D., Cavanagh, J., & Kumar, R. (2003). Calbindin D28K interacts with Ran-binding protein M: identification of interacting domains by NMR spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun*, 303(4), 1186-1192. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00499-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00499-6)
- Means, A. R., & Dedman, J. R. (1980). Calmodulin--an intracellular calcium receptor. *Nature*, 285(5760), 73-77. <https://doi.org/10.1038/285073a0>
- Michetti, F., D'Ambrosi, N., Toesca, A., Puglisi, M. A., Serrano, A., Marchese, E., Corvino, V., & Geloso, M. C. (2019). The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. *J Neurochem*, 148(2), 168-187. <https://doi.org/10.1111/jnc.14574>
- Miltenyi Biotec. (2021). *MACSfectin™ Reagent*. Retrieved 06.12.2023 from https://static.miltenyibiotec.com/asset/150655405641/document_levbs6m6554fd97v2bqu97rm0o?content-disposition=inline
- Mizuta, I., Tsunoda, T., Satake, W., Nakabayashi, Y., Watanabe, M., Takeda, A., Hasegawa, K., Nakashima, K., Yamamoto, M., Hattori, N., Murata, M., & Toda, T. (2008). Calbindin 1, fibroblast growth factor 20, and alpha-synuclein in sporadic Parkinson's disease. *Hum Genet*, 124(1), 89-94. <https://doi.org/10.1007/s00439-008-0525-5>

- Nachlas, M. M., Margulies, S. I., Goldberg, J. D., & Seligman, A. M. (1960). The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt. *Anal Biochem*, *1*, 317-326. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(60\)90029-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(60)90029-4)
- Nakayama, S., & Kretsinger, R. H. (1994). Evolution of the EF-hand family of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, *23*, 473-507. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.23.060194.002353>
- Ogata, R., Ikari, K., Hayashi, M., Tamai, K., & Tagawa, K. (1984). Age-related changes in the Purkinje's cells in the rat cerebellar cortex: a quantitative electron microscopic study. *Folia Psychiatr Neurol Jpn*, *38*(2), 159-167. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.1984.tb00364.x>
- Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchya, H., Takahashi, Y., & Masuma, R. (1977). A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)*, *30*(4), 275-282. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.30.275>
- Parkash, J., Chaudhry, M. A., Amer, A. S., Christakos, S., & Rhoten, W. B. (2002). Intracellular calcium ion response to glucose in beta-cells of calbindin-D28k nullmutant mice and in betaHC13 cells overexpressing calbindin-D28k. *Endocrine*, *18*(3), 221-229. <https://doi.org/10.1385/ENDO:18:3:221>
- Pasteels, B., Rogers, J., Blachier, F., & Pochet, R. (1990). Calbindin and calretinin localization in retina from different species. *Vis Neurosci*, *5*(1), 1-16. <https://doi.org/10.1017/s0952523800000031>
- Pelc, K., Vincent, S., Ruchoux, M. M., Kiss, R., Pochet, R., Sariban, E., Decaestecker, C., & Heizmann, C. W. (2002). Calbindin-d(28k): a marker of recurrence for medulloblastomas. *Cancer*, *95*(2), 410-419. <https://doi.org/10.1002/cncr.10666>
- Pochet, R., Blachier, F., Gangji, V., Kielbaska, V., Duee, P. H., & Resibois, A. (1990). Calbindin D28k in mammalian intestinal absorptive cells: immunohistochemical evidence. *Biol Cell*, *70*(1-2), 91-99. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(90\)90364-9](https://doi.org/10.1016/0248-4900(90)90364-9)
- Rahul Saha, R. V. S. U., Pankaj Tiwari. (2017). Effect of Mineralogy on the Adsorption Characteristics of Surfactant – Reservoir Rock System. In. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*.
- Rogers, J., Zornetzer, S. F., Bloom, F. E., & Mervis, R. E. (1984). Senescent microstructural changes in rat cerebellum. *Brain Res*, *292*(1), 23-32. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90886-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90886-2)
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2000). *Molecular cloning : a laboratory manual* (Third edition ed.).
- Schiffmann, S. N., Cheron, G., Lohof, A., d'Alcantara, P., Meyer, M., Parmentier, M., & Schurmans, S. (1999). Impaired motor coordination and Purkinje cell excitability in mice lacking calretinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(9), 5257-5262. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.5257>
- Schwaller, B. (2014). Calretinin: from a "simple" Ca(2+) buffer to a multifunctional protein implicated in many biological processes. *Front Neuroanat*, *8*, 3. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00003>
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*, *106-107*, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>
- Shapiro, A. L., Vinuela, E., & Maizel, J. V., Jr. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, *28*(5), 815-820. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(67\)90391-9](https://doi.org/10.1016/0006-291x(67)90391-9)
- Simon, E. S., Plante, R., & Whitesides, G. M. (1989). D-lactate dehydrogenase. Substrate specificity and use as a catalyst in the synthesis of homochiral 2-hydroxy acids. *Appl Biochem Biotechnol*, *22*(2), 169-179. <https://doi.org/10.1007/BF02921743>

- Sooy, K., Schermerhorn, T., Noda, M., Surana, M., Rhoten, W. B., Meyer, M., Fleischer, N., Sharp, G. W., & Christakos, S. (1999). Calbindin-D(28k) controls $[Ca^{2+}]_i$ and insulin release. Evidence obtained from calbindin-d(28k) knockout mice and beta cell lines. *J Biol Chem*, 274(48), 34343-34349. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.48.34343>
- Steiner, J., Bernstein, H. G., Bielau, H., Berndt, A., Brisch, R., Mawrin, C., Keilhoff, G., & Bogerts, B. (2007). Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neurosci*, 8, 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-2>
- swant. (o. D.). *Product Description CB38 Rabbit anti Calbindin D-28k* Retrieved 06.12.2023 from https://www.swant.com/pdfs/Rabbit_anti_calbindin_D-28k_CB38.pdf
- Takashi, M., Zhu, Y., Miyake, K., & Kato, K. (1996). Urinary 28-kD calbindin-D as a new marker for damage to distal renal tubules caused by cisplatin-based chemotherapy. *Urol Int*, 56(3), 174-179. <https://doi.org/10.1159/000282835>
- Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., & Tomita, F. (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ Ca^{++} dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 135(2), 397-402. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(86\)90008-2](https://doi.org/10.1016/0006-291x(86)90008-2)
- Thermo Scientific. (2010). *Tech Tip # 65: ELISA technical guide and protocols*. Retrieved 06.12.2023 from <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0065-ELISA-guide.pdf>
- UniProt. (2023). *P05937 - CALB1_HUMAN*. Retrieved 06.12.2023 from <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P05937/entry>
- Uptima. (o. D.). *BC Assay : Protein Assay Kit*. Retrieved 06.12.2023 from <https://www.interchim.fr/ft/4/40840A.pdf>
- Vanier, M. T. (2010). Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis*, 5, 16. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-16>
- Varela, M. C., Arce, A., Greiner, B., Schwald, M., Aicher, L., Wahl, D., Grenet, O., & Steiner, S. (1998). Cyclosporine A-induced decrease in calbindin-D 28 kDa in rat kidney but not in cerebral cortex and cerebellum. *Biochem Pharmacol*, 55(12), 2043-2046. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00025-2](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00025-2)
- Venters, R. A., Benson, L. M., Craig, T. A., Bagu, J., Paul, K. H., Kordys, D. R., Thompson, R., Naylor, S., Kumar, R., & Cavanagh, J. (2003). The effects of Ca^{2+} binding on the conformation of calbindin D(28K): a nuclear magnetic resonance and microelectrospray mass spectrometry study. *Anal Biochem*, 317(1), 59-66. [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(03\)00084-8](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(03)00084-8)
- Villa, A., Podini, P., Panzeri, M. C., Racchetti, G., & Meldolesi, J. (1994). Cytosolic Ca^{2+} binding proteins during rat brain ageing: loss of calbindin and calretinin in the hippocampus, with no change in the cerebellum. *Eur J Neurosci*, 6(9), 1491-1499. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1994.tb01010.x>
- Vite, C. H., Bagel, J. H., Swain, G. P., Prociuk, M., Sikora, T. U., Stein, V. M., O'Donnell, P., Ruane, T., Ward, S., Crooks, A., Li, S., Mauldin, E., Stellar, S., De Meulder, M., Kao, M. L., Ory, D. S., Davidson, C., Vanier, M. T., & Walkley, S. U. (2015). Intracisternal cyclodextrin prevents cerebellar dysfunction and Purkinje cell death in feline Niemann-Pick type C1 disease. *Sci Transl Med*, 7(276), 276ra226. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010101>
- Wasserman, R. H., Corradino, R. A., & Taylor, A. N. (1969). Binding proteins from animals with possible transport function. *J Gen Physiol*, 54(1), 114-137. <https://doi.org/10.1085/jgp.54.1.114>
- Wasserman, R. H., & Taylor, A. N. (1966). Vitamin d3-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. *Science*, 152(3723), 791-793. <https://doi.org/10.1126/science.152.3723.791>
- Wassle, H., Peichl, L., Airaksinen, M. S., & Meyer, M. (1998). Calcium-binding proteins in the retina of a calbindin-null mutant mouse. *Cell Tissue Res*, 292(2), 211-218. <https://doi.org/10.1007/s004410051052>

- Watanabe, H., Imaizumi, M., Ojika, T., Abe, T., Hida, T., & Kato, K. (1994). Evaluation of biological characteristics of lung cancer by the human 28 kDa vitamin D-dependent calcium binding protein, calbindin-D28k. *Jpn J Clin Oncol*, 24(3), 121-127. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8007421>
- Weiss, G. M., & Pysh, J. J. (1978). Evidence for loss of Purkinje cell dendrites during late development: a morphometric Golgi analysis in the mouse. *Brain Res*, 154(2), 219-230. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90696-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90696-0)
- Wernyj, R. P., Mattson, M. P., & Christakos, S. (1999). Expression of calbindin-D28k in C6 glial cells stabilizes intracellular calcium levels and protects against apoptosis induced by calcium ionophore and amyloid beta-peptide. *Brain Res Mol Brain Res*, 64(1), 69-79. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(98\)00307-6](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(98)00307-6)
- Winsky, L., & Kuznicki, J. (1996). Antibody recognition of calcium-binding proteins depends on their calcium-binding status. *J Neurochem*, 66(2), 764-771. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66020764.x>
- Woodruff-Pak, D. S. (2006). Stereological estimation of Purkinje neuron number in C57BL/6 mice and its relation to associative learning. *Neuroscience*, 141(1), 233-243. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.03.070>
- Yuan, H. H., Chen, R. J., Zhu, Y. H., Peng, C. L., & Zhu, X. R. (2013). The neuroprotective effect of overexpression of calbindin-D(28k) in an animal model of Parkinson's disease. *Mol Neurobiol*, 47(1), 117-122. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8332-3>
- Zhang, C., Zhu, Q., & Hua, T. (2010). Aging of cerebellar Purkinje cells. *Cell Tissue Res*, 341(3), 341-347. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1016-2>
- Zhang, X. D., Gillespie, S. K., & Hersey, P. (2004). Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol Cancer Ther*, 3(2), 187-197. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14985459>
- Zimmer, D. B., Cornwall, E. H., Landar, A., & Song, W. (1995). The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull*, 37(4), 417-429. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(95\)00040-2](https://doi.org/10.1016/0361-9230(95)00040-2)
- Zou, Y., Kim, D., Yagi, M., Yamasaki, Y., Kurita, J., Iida, T., Matsuyama, Y., Yamaguchi, K., & Oda, T. (2013). Application of LDH-release assay to cellular-level evaluation of the toxic potential of harmful algal species. *Biosci Biotechnol Biochem*, 77(2), 345-352. <https://doi.org/10.1271/bbb.120764>

7 Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst Prof. Dr. med. Michael Meyer, der mich auf dem Weg meiner wissenschaftlichen Arbeit in den letzten Jahren betreute und anleitete. Er nahm sich stets die Zeit all meine Fragen bestmöglich zu beantworten und ermöglichte mir selbstständig zu arbeiten und regte mich zu kritischem Denken an. Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Frau Sabine Mach und Frau Marion Parsch für die Heranführung an die Arbeit im Labor, ihre technischen Hilfestellungen, aber auch für die alltäglichen Gespräche und Diskussionen über die Arbeit im Labor hinaus.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei den Arbeitsgruppen von Frau Prof. Dr. Claudia Veigel sowie Prof. Dr. Axel Imhof für die kooperative Zusammenarbeit im Biomedizinischen Zentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Ich danke meiner Familie, meiner Schwester Laura und meinen Eltern Edith und Joachim für den Rückhalt, die Unterstützung tagtäglich über die Jahre der wissenschaftlichen Arbeit und darüber hinaus.

8 Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Hahn, Daniel

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Die Untersuchung der Freisetzung von Calbindin D28k und LDH bei Zellschädigung in vitro

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 31.05.2024

Ort, Datum

Daniel Hahn

Unterschrift Doktorand