

Entwicklung eines Sandwich Enzyme-linked
Immunsorbent Assays zum Nachweis von humanem
 α -Synuclein

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Marten geb. Ruf, Katharina

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Batra

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Maetzler

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung	8
1. α -Synuclein.....	8
1.1. Synuclein-Proteinfamilie.....	8
1.2. Struktur von α -Synuclein	9
1.3. Physiologische Funktion von α -Synuclein.....	10
1.4. Pathophysiologische Aspekte.....	11
1.5. Oligomere und Fibrillen von α -Synuclein.....	12
2. Synucleinopathien	13
2.1. Morbus Parkinson	14
2.2. Lewy-Körperchen-Demenz.....	15
2.3. Multisystematrophie.....	16
3. Neurodegenerative Erkrankungen.....	16
4. Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	18
5. Zielsetzung der Arbeit	19
6. Arbeitshypothesen	19
II Material und Methoden	20
1. Material.....	20
1.1. Antikörper und Antigene.....	20
1.2. Probandenkollektiv.....	21
1.3. Antigene	22
1.4. Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	22
1.5. Spezielle Verbrauchsmaterialien und Apparaturen.....	24
1.6. Software	24
2. Methoden.....	25
2.1. Auswahl der Mikrotiterplatten	25
2.2. Beschichtungsantikörper	26
2.3. Waschvorgang der Mikrotiterplatten	26
2.4. Auswahl der Blockierlösung.....	27

2.5.	Standards und Proben.....	27
2.6.	Primärantikörper.....	28
2.7.	Konjugierter Sekundärantikörper.....	29
2.8.	Streptavidin-Peroxidase	30
2.9.	Farbreaktion und Messung der optischen Dichte.....	30
2.10.	Auswertung.....	30
III Ergebnisse.....		31
1.	Optimierung der Plattenbeschichtung	31
1.1.	Auswahl der geeigneten Mikrotiterplatte.....	31
1.2.	Beschichtungspuffer und Konzentration des Beschichtungsantikörpers	33
2.	Auswahl der Blockierlösung, des Wasch- und Verdünnungspuffers.....	40
2.1.	Blockierlösung	40
2.2.	Verdünnungspuffer.....	45
2.3.	Waschpuffer	48
3.	α -Synuclein-Standards und Proben	49
3.1.	Standardkurve.....	49
3.2.	Vergleich α -Synuclein-Wildtyp versus Mutante.....	50
3.3.	Verdünnung der Proben	51
4.	Auswahl und Verdünnung des Primärantikörpers.....	52
5.	Auswahl und Verdünnung des Sekundärantikörpers.....	54
6.	Amplifizierungssystem.....	59
7.	α -Synuclein-Nachweis unter den festgelegten Testbedingungen.....	60
8.	Validierung des ELISA	61
8.1.	Sensitivität.....	61
8.2.	Intra- und Interassay-Variabilität	63
8.3.	Wiederfindung.....	64
8.4.	Kreuzreaktivität.....	65
9.	Stabilität von α -Synuclein-Standards	66
10.	Messergebnisse von α -Synuclein im Plasma	67
10.1.	Demografische Daten	67
10.2.	Messergebnisse und statistische Auswertung.....	70

IV Diskussion	77
1. ELISA-Entwicklung	77
2. α -Synuclein als potenzieller Biomarker	80
V Zusammenfassung	88
VI Literaturverzeichnis.....	90
VII Erklärungen zum Eigenanteil.....	103

Abkürzungsverzeichnis

A β	β -Amyloid
AD	Alzheimer-Demenz
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
AUC	area under curve
BSA	bovine serum albumin
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
CSP	cysteine string protein
DIN	Deutsches Institut für Normung
DLB	Lewy-Körperchen-Demenz
DNA	deoxyribose nucleic acid
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
EIF4G1	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
E. coli	Escherichia coli
ICD	International Classification of Diseases
IgG	Immunglobuline der Gruppe G
IPS	idiopathisches Parkinson-Syndrom
kDA	Kilodalton
LOD	limit of detection
LRRK2	leucine-rich repeat kinase 2
MCI	mild cognitive impairment
MMST	Mini-Mental-Status-Test
MSA	Multisystematrophie
NAC	non-A β component of Alzheimer's disease amyloid
NINCDS-ADRDA	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
OD	optische Dichte
OPCA	olivopontozerebelläre Atrophie

PARK	Parkinson's disease-associated gene
PBS	phosphate-buffered saline
PD	Morbus Parkinson
PDD	Parkinson-Demenz
PINK1	PTEN induced putative kinase 1
PLD2	Phospholipase D2
POD	Peroxidase
ROC	receiver operating characteristics
RT	Raumtemperatur
SDS	Shy-Drager-Syndrom
SND	striatonigrale Degeneration
SNCA	α -Synuclein
sP	soluble platelets
Syn	Synuclein
TBS	tris-buffered saline
TMB	Tetramethylbenzidine
VK	Variationskoeffizient
VPS35	vacuolar protein sorting-associated protein 35

I Einleitung

1. α -Synuclein

1.1. Synuclein-Proteinfamilie

Die Synuclein-Proteinfamilie besteht aus den vier Mitgliedern α -, β -, γ - Synuclein und dem 1999 erstmals beschriebenen Synoretin (Surguchov et al. 1999). α - und β -Synuclein werden überwiegend im Gehirn exprimiert. γ -Synuclein kann im peripheren Nervensystem, in der Retina, im olfaktorischen Epithel und in Karzinomen wie den Brusttumoren nachgewiesen werden (Surgucheva et al. 2008, Lavedan et al. 1998). Synoretin kommt in Netzhautzellen und im Gehirn vor.

α -Synuclein wurde nach seiner Lokalisation im Nukleus und den präsynaptischen Nervenenden benannt (Maroteaux et al. 1988). Zunächst galt α -Synuclein hauptsächlich als intrazelluläres Protein. Neuere Studien beschrieben α -Synuclein auch als extrazelluläres Protein, das sich im Liquor und Blut findet (Borghi et al. 2000, El-Agnaf et al. 2003, Tokuda et al. 2006). In geringerer Konzentration als im zentralen Nervensystem kommt α -Synuclein auch in anderen Geweben wie des Herzens, der Nebennieren, des Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts und des peripheren Nervensystems vor (Gelpi et al. 2014). Auch in verschiedenen hämatopoetischen Zellreihen wurde α -Synuclein identifiziert (Uéda et al. 1993, Ltic et al. 2004).

Die α -, β - und γ - Synuclein-Proteine bestehen aus 127 bis 140 Aminosäuren (AS). Der Vergleich ihrer Aminosäuresequenzen zeigt eine Homologie von 55-62% (Goedert 2001). Die Synuclein-Proteine werden von drei verschiedenen Genen auf unterschiedlichen Chromosomen liegend kodiert: α -Synuclein auf 4q21, β -Synuclein auf 5q35 und γ -Synuclein auf 10q23 (Jakes et al. 1994, Lavedan et al. 1998, Polymeropoulos et al. 1997). Gemeinsame Eigenschaften der Synuclein-Proteine sind ein negativ geladener C-Terminus, ein helikaler N-Terminus und eine hydrophobe zentrale Komponente.

1.2. Struktur von α -Synuclein

α -Synuclein ist ein Protein aus 140 AS mit einem molekularen Gewicht von 14 kDa. Es besteht aus drei verschiedenen Domänen.

Der N-Terminus (AS 1-60) enthält den amphiphilen, lipidbindenden Bereich und zeigt sieben inkomplette Repeats der 11 AS langen, sich wiederholenden Konsensussequenz KTKEGV (George et al. 1995, Bartels et al. 2010). Durch die Wechselwirkung der N-terminalen Region mit Phospholipiden kann α -Synuclein an Membranen und Vesikel binden. Diese Bindung führt infolge einer Konformationsänderung zu einer Faltung der N-terminalen und mittleren Domäne in zwei α -Helices (Davidson et al. 1998, Lorenzen et al. 2014).

Die mittlere hydrophobe Region (AS 61-95) wird als NAC-Sequenz (non-amyloid-beta component of Alzheimer's disease amyloid) bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle im Aggregationsverhalten des Proteins (Uéda et al. 1993). Sie beeinflusst die Bildung einer hoch-amyloidogenen β -Faltblattstruktur (Han et al. 1995, Giasson et al. 2001).

Die C-terminale Region (AS 96-140) ist negativ geladen, weist multiple Phosphorylierungsdomänen (AS 115-136) auf und reguliert die Fibrillenbildung von α -Synuclein (Kim et al. 2002, Meuvius et al. 2010, Hong et al. 2011).

Durch seine relativ geringe Hydrophobizität und große Nettoladung liegt α -Synuclein nativ unter physiologischen Bedingungen im Zytoplasma in ungefalteter, löslicher Form vor (Weinreb et al. 1996, Breydo et al. 2012). Abhängig von seiner zellulären Umgebung kann sich die Sekundärstruktur von α -Synuclein über eine Zunahme seiner Hydrophobizität und bzw. oder Abnahme seiner Nettoladung ändern (Uversky et al. 2001b). Bindet α -Synuclein an saure Phospholipide, nimmt es die Sekundärstruktur der α -Helix an (Davidson et al. 1998). Durch die Ausbildung von β -Faltblattstrukturen entstehen unlösliche Amyloidfibrillen (Breydo et al. 2012).

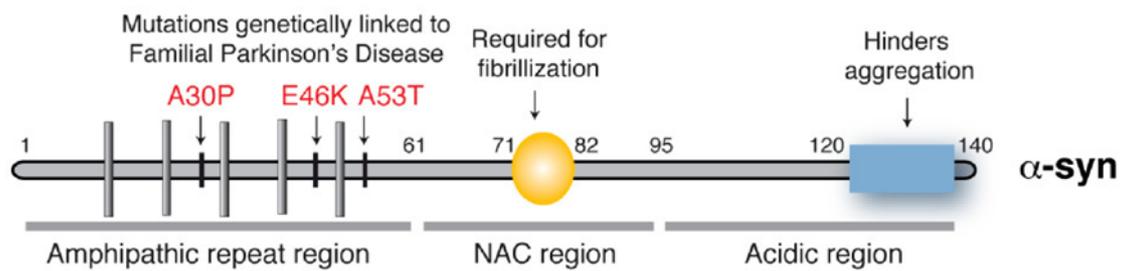


Abbildung 1: **Schematische Darstellung der Struktur des humanen α -Synucleins** (aus Greggio et al. 2011). Die drei Punktmutationen, die bei familiären Parkinsonfällen auftreten, liegen auf der N-terminalen Region (amphipathic repeat region). NAC bezeichnet die non-A β -Komponente und induziert die Fibrillenbildung. Der C-Terminus (acidic region) steht für das carboxyterminale Ende und inhibiert die Aggregation.

1.3. Physiologische Funktion von α -Synuclein

Bislang ist die genaue physiologische Funktion und pathologische Bedeutung von α -Synuclein nicht vollständig geklärt und Gegenstand der Forschung.

α -Synuclein kommt in der Präsynapse in unmittelbarer Nähe, aber nicht im synaptischen Vesikel vor. Bedingt durch seine Lokalisation und seine Eigenschaft, an Membranen zu binden, reguliert es den vesikulären Transport und die Freisetzung von Neurotransmittern (Murphy et al. 2000, Auluck et al. 2010).

Als präsynaptischer Regulator scheint α -Synuclein einen hemmenden Einfluss auf die Freisetzung von Dopamin zu haben. Bei α -Synuclein-Knockout-Mäusen waren neurochemische, elektrophysiologische und verhaltensbezogene Defizite zu beobachten. So konnte nach elektrischer Stimulation eine erhöhte Dopaminausschüttung festgestellt werden. Jedoch fanden sich keine relevanten, morphologischen Veränderungen. Eine essenzielle Bedeutung von α -Synuclein bei der neuronalen Entwicklung ist somit unwahrscheinlich (Abeliovich et al. 2000).

α -Synuclein beeinflusst die Anzahl von präsynaptischen Vesikeln in den hippocampalen Neuronen. Bei einer geringeren α -Synuclein-Konzentration ist die Anzahl von synaptischen Vesikeln vermindert (Murphy et al. 2000).

Bei Zebrafinken, die gerade den Vogelgesang erlernten, fand sich eine veränderte Genexpression von α -Synuclein, was auf die Funktion von α -Synuclein in der

neuronalen Plastizität hinweist (George et al. 1995, Clayton und George 1999, Cheng et al. 2011).

α -Synuclein wird als hochaffiner Inhibitor der Phospholipase D2 (PLD2) beschrieben, mit der es über sein Aminoende interagieren kann (Sidhu et al. 2004). Die PLD2, ein Transmembranenzym, katalysiert die Esterspaltung von Phosphatidylcholin. Dabei entstehen Phosphatidsäure und Cholin. Durch diese hydrolytische Spaltung werden verschiedene Zellfunktionen gesteuert, wie z.B. der Vesikeltransport, die Exozytose (Jones et al. 1999) oder die Regulation von Zellwachstum und -proliferation (Hernández-Alcoceba et al. 1997).

Weiterhin hat α -Synuclein eine chaperonartige Funktion für synaptische und zytoplasmatische Proteine, wie Studien mit Deletionen des Co-Chaperons CSP- α belegen. Die Deletion von CSP- α führte bei den betroffenen Mäusen zu einer schnellen, progressiven Neurodegeneration. Bei transgener Expression von α -Synuclein ließ sich der neurodegenerative Prozess und damit das Versterben der Mäuse stoppen. Wird bei den CSP- α -Knockout-Mäusen das endogene α -Synuclein eliminiert, verschlechtert sich der Phänotyp und die Mäuse versterben innerhalb weniger Monate (Chandra et al. 2005).

1.4. Pathophysiologische Aspekte

Mit dem Nachweis von α -Synuclein als Hauptbestandteil von Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten wurde die entscheidende Rolle von α -Synuclein bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen und insbesondere der Synucleinopathien deutlich (Spillantini et al. 1997).

Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung von α -Synuclein in der Pathogenese der Synucleinopathien lieferte die Entdeckung einer Mutation auf dem SNCA-Gen (Mutation A53T), die für die seltene autosomal-dominant vererbte Early-onset-Parkinson-Krankheit verantwortlich ist (Polymeropoulos et al. 1997). Später wurde eine weitere monogenetische Parkinsonform (A30P) mit einem autosomal-dominanten Erbgang bei einer deutschen Familie gefunden (Krüger et al. 1998). Inzwischen konnten mit den Mutationen E46K, H50Q und G51D fünf Punktmutationen auf dem SNCA-Gen identifiziert werden, die eine familiäre

Parkinson-Krankheit auslösen (Zarranz et al. 2004, Appel-Cresswell et al. 2013, Kiely et al. 2013).

Die durch die Punktmutationen verursachte klinische Symptomatik zeichnet sich durch ein ähnliches Krankheitsbild wie bei der sporadischen Parkinsonerkrankung aus (Cookson et al. 2005). Der Erkrankungsbeginn liegt meist vor dem 50. Lebensjahr. Häufig ist eine frühe demenzielle Entwicklung mit kognitiven und psychischen Beeinträchtigungen zu beobachten (Bostantjopoulou et al. 2001).

Insgesamt liegt bei 5-10% der Patienten eine monogen vererbte Parkinsonerkrankung vor (Kalineri et al. 2016). In den letzten Jahren wurden neue Gene und Gene identifiziert, die der familiären Form der Parkinsonerkrankung mit sowohl autosomal-dominantem (SNCA, LRRK2, VPS35, EIF4G1) als auch autosomal-rezessivem (PARK2, PINK1, DJ-1) Erbgang zugeordnet werden konnten (Spatola und Wider 2014).

Neben den Punktmutationen verursachen auch Duplikationen und Triplikationen im SNCA-Gen ein autosomal-dominantes Parkinsonsyndrom (Singleton et al. 2003). Der Krankheitsverlauf wird durch die α -Synuclein-Überexpression beeinflusst und verläuft schwerwiegender und progressiver als bei der sporadischen Parkinsonerkrankung. Klinisch zeigt sich ein früher Erkrankungsbeginn mit schwerer Demenz und autonomer Dysfunktion.

1.5. Oligomere und Fibrillen von α -Synuclein

Bei der Pathogenese der Synucleinopathien wird der Aggregation von α -Synuclein eine zentrale Bedeutung zugeschrieben (Roberts und Brown 2015). Unter physiologischen Bedingungen liegt α -Synuclein als wasserlösliches, ungefaltetes Protein vor (Maroteaux und Scheller 1991). Über Oligomerisation und Fibrillierung kann es unlösliche Proteinaggregate bilden, die den hauptsächlichen Bestandteil von Lewy-Körperchen ausmachen.

Dabei erfolgt die Aggregation von α -Synuclein über verschiedene Stufen. Das α -Synuclein-Monomer kann eine partiell gefaltete Konformation annehmen und sich weiter zu Oligomeren verschiedener Größe und Protofibrillen zusammenlagern

(Uversky et al. 2001b). In Oligomeren liegt eine antiparallele β -Faltblattstruktur vor. Bei weiterer Aggregation zu unlöslichen Fibrillen organisieren sich die β -Stränge zu einer parallelen Anordnung (Celej et al. 2012).

Zunächst ging man davon aus, dass die Fibrillen von α -Synuclein toxisch seien. Neuere Untersuchungen belegen, dass oligomere und protofibrilläre α -Synuclein-Formen pathogene Eigenschaften besitzen und den krankheitsassoziierten Nervenzelltod vermitteln (Conway et al. 2000, Periquet et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass Protofibrillen und nicht fibrilläre Ablagerungen zur Beschädigung des Golgi-Apparates und zum Zelltod führen (Gosavi et al. 2002).

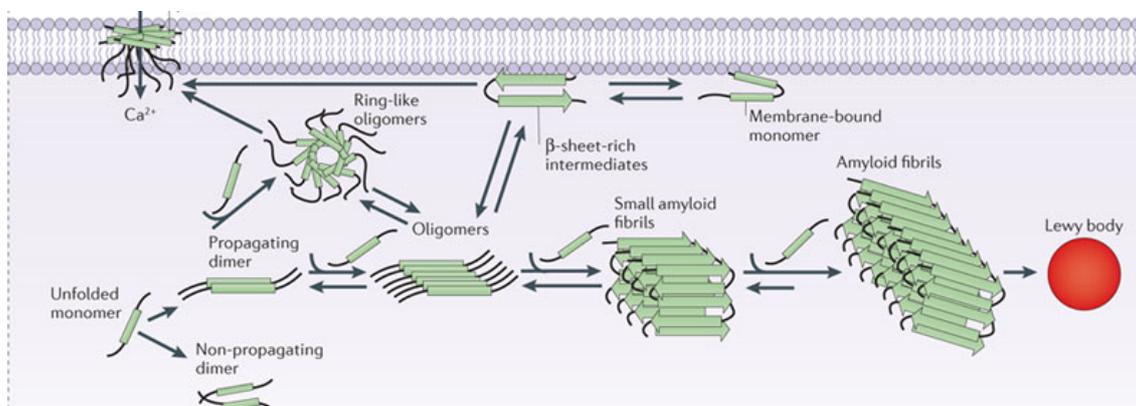


Abbildung 2: **Schematische Darstellung der α -Synuclein-Aggregation** (modifiziert nach Lashuel et al. 2013).

2. Synucleinopathien

Synucleinopathien gehören zu einer Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, denen eine Fehlfaltung von α -Synuclein zugrunde liegt. Als Folge kommt es zu pathologischen Ablagerungen des veränderten α -Synucleins im Gehirn (Uversky 2007). Die Proteinablagerungen finden sich intraneuronal als Hauptbestandteil von Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten oder als zytoplasmatische Einschlüsse in der Oligodendroglia. Zu den Synucleinopathien gehören der Morbus Parkinson (PD), die Lewy-Körperchen-Demenz (DLB) und die Multisystematrophie (MSA).

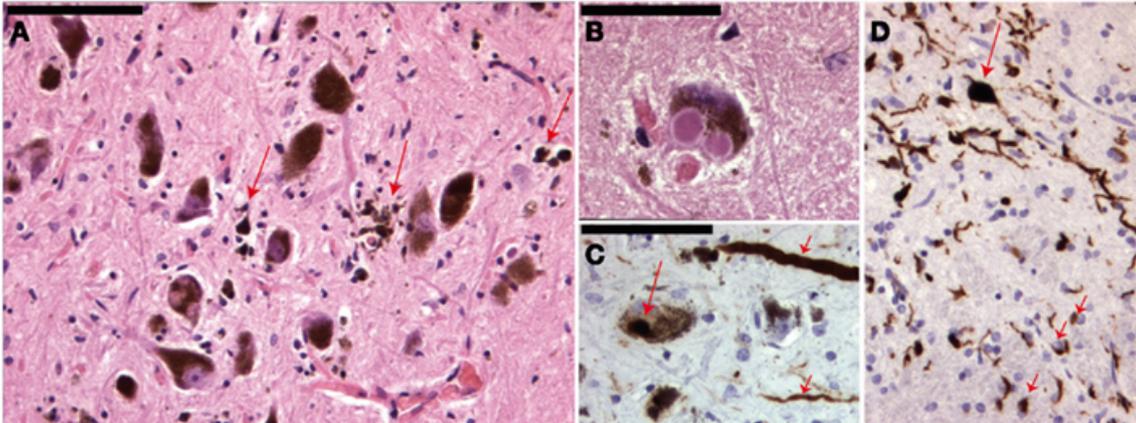


Abbildung 3: **Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus dem Mittelhirn bei PD (A-C), MSA (D)** (modifiziert nach den Dunnen 2013)

A Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) der Substantia nigra mit dem Untergang neuromelaninhaltiger, dopaminergener Nervenzellen und der Phagozytose von Neuromelanin (Pfeile)

B Neuron mit zwei Lewy-Körperchen (kreisrunde eosinophile Zytoplasmainschlüsse, bestehend aus α -Synuclein)

C α -Synuclein-Färbung eines Lewy-Körperchens (langer Pfeil) und von Lewy-Neuriten (kurze Pfeile)

D α -Synuclein-positive Einschlüsse in Neuronen (langer Pfeil) und Oligodendrozyten (kurze Pfeile)

2.1. Morbus Parkinson

Der PD ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung mit Bewegungsstörungen des höheren Lebensalters. Er ist durch den progredienten Verlust von Neuronen und den Nachweis von Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten der Substantia nigra und anderer subkortikaler Systeme gekennzeichnet.

Der Erkrankungsbeginn liegt meist zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr. Ausnahmen bilden die familiären Parkinson-Syndrome, die sich in frühem oder sogar juvenilem Alter manifestieren.

Als Folge des Verlustes dopaminerger Neuronen kommt es zu motorischen Störungen. Die vier Kardinalsymptome Bradykinesie, Tremor, Rigor, Gang- und Gleichgewichtsstörungen kennzeichnen das klinische Bild der Erkrankung (Koller und Montgomery 1997). Zu weiteren Positivkriterien für die Diagnose PD zählen ein asymmetrischer Krankheitsbeginn und gutes Ansprechen auf Levodopa. Auch vegetative Dysfunktionen und Depression gehören zu den ersten klinischen Symptomen. In 24% bis 31% der Fälle kommt es bei den Erkrankten zu einer Demenz (Aarsland et al. 2005). Das Risiko, eine Demenz zu entwickeln, ist bei Patienten mit spätem Krankheitsbeginn oder einer hypokinetisch-rigiden Verlaufsform der Erkrankung erhöht. Das Auftreten einer Demenz korreliert signifikant mit einer kürzeren Überlebenszeit. Psychiatrische Beeinträchtigungen wie Psychosen mit optischen Halluzinationen treten im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf bei 25% der Patienten auf (Farlow et al. 2014).

2.2. Lewy-Körperchen-Demenz

Die DLB tritt meist sporadisch auf und gilt mit einer Prävalenz von 20% bis 36% als die zweithäufigste Demenzform nach der senilen Demenz vom Alzheimer-Typ (Rahkonen et al. 2003, Aarsland et al. 2008). Die Symptomatik beginnt nach dem 65. Lebensjahr. Nach der Diagnosestellung beträgt die mittlere Krankheitsdauer 6-7 Jahre.

Die DLB ist durch eine fluktuierende, kognitive Störung, motorische Parkinson-Symptome und eine schlechte Verträglichkeit von Neuroleptika gekennzeichnet. Typisch sind zudem psychotische Symptome wie visuelle bzw. szenische Halluzinationen.

Neuropathologisch ist die DLB durch zahlreiche Lewy-Körperchen in den Basalganglien, im Hirnstamm, limbischem Kortex (limbische DLB) und Neokortex (kortikale DLB) charakterisiert.

2.3. Multisystematrophie

Die MSA ist eine seltene neurodegenerative Erkrankung des fortgeschrittenen Lebensalters mit rasch progredientem Verlauf. Früher wurde die MSA entsprechend der klinischen Symptomatik und den pathomorphologischen Veränderungen unter den Begriffen „Shy-Drager-Syndrom“ (SDS), „olivopontozerebelläre Atrophie“ (OPCA) und „striatonigrale Degeneration“ (SND) geführt und 1969 zu einem Oberbegriff zusammengefasst (Graham und Oppenheimer 1969).

Die Erkrankung manifestiert sich meist um das 50. Lebensjahr (Spanne: 45-70 Jahre). Klinisch ist die MSA durch neurologische Symptome und autonome Störungen gekennzeichnet. Eine Demenz tritt typischerweise nicht auf. Als weitere klinische Abgrenzung zum PD dient zudem das fehlende bzw. unzureichende Ansprechen auf Levodopa.

Abhängig von der führenden Klinik wird zwischen einem Parkinson-Typ (MSA-P) mit vordergründiger Parkinsonsymptomatik und einem zerebellären Typ (MSA-C) mit Kleinhirntaxie differenziert (Gilman et al. 1998).

Morphologisch zeichnet sich die MSA durch die Neurodegeneration verschiedener subkortikaler Systeme und zytoplasmatische Einschlüsse in den Oligodendrozyten aus, die Ablagerungen von fehlgefaltetem α -Synuclein enthalten (Wenning und Jellinger 2005).

3. Neurodegenerative Erkrankungen

Mit der steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung gewinnen neurodegenerative Erkrankungen, deren rechtzeitige Diagnose und Therapie zunehmend an Bedeutung. Neurodegenerative Erkrankungen sind meist progrediente, erblich oder sporadisch auftretende Erkrankungen des Nervensystems. Mit Ausnahme genetisch bedingter Formen kommen neurodegenerative Erkrankungen überwiegend im fortgeschrittenen Lebensalter vor. Hauptmerkmal ist der fortschreitende Funktionsverlust und Ausfall von Neuronen. Dies führt zu neurologischen Krankheitsbildern wie der Demenz (z.B.

Alzheimer-Demenz (AD)) oder den Bewegungsstörungen (z.B. Parkinson-Krankheit oder Chorea Huntington). Sind motorische Nervenzellen im Rückenmark betroffen, kommt es zu Muskelhypotonie und -atrophie und letztlich zu Paresen (z.B. spinale Muskelatrophie).

Auch wenn neurodegenerative Erkrankungen unterschiedliche klinische Phänotypen haben, beruhen sie auf sehr ähnlichen molekularen Mechanismen. Charakteristisch sind fehlgefaltete Proteine, die aggregieren und sich in Neuronen und Glia ablagern. Entsprechend ihrer molekularbiologischen Veränderungen werden neurodegenerative Erkrankungen in Synucleinopathien, Tauopathien, Polyglutamin- und Prionerkrankungen und motorische Systemdegenerationen eingeteilt (Jellinger 2003a).

Demenzerkrankungen beginnen meist schleichend mit dem Verlust von kognitiven Fähigkeiten. Beim Auftreten erster Symptome ist eine ätiologische Zuordnung aufgrund des heterogenen Spektrums der zugrunde liegenden Erkrankungen und der überlappenden klinischen Symptomatik schwierig. Die richtige Diagnose anhand des klinischen Bildes bleibt auch im fortgeschrittenen Stadium unsicher und ist in über 12% der Fälle nicht zutreffend (Klatka et al. 1996). Eine auf Autopsiebefunden basierende Studie zeigte, dass die klinische Diagnose der AD nur in 78% der Fälle neuropathologisch bestätigt wird. Am häufigsten wird die DLB als AD fehldiagnostiziert (Shim et al. 2013). Eine definitive Diagnose kann erst nach autoptischer Untersuchung des Gehirns gestellt werden.

In Anbetracht der demographischen Entwicklung der Industrienationen und der damit verbundenen Zunahme der Zahl älterer Menschen gewinnt die Identifikation krankheitsspezifischer Biomarker an Bedeutung. Ziel ist es, Therapien zu entwickeln, die früh in den Krankheitsverlauf eingreifen oder die Manifestation der Erkrankung verhindern können.

4. Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, das im Gegensatz zum Radioimmunoassay nicht auf einer Radioaktivitätsmessung, sondern auf einer enzymatischen Farbstoffreaktion und nachfolgenden Extinktionsmessung basiert. Die Einsatzmöglichkeiten von ELISA sind vielseitig. Insbesondere im Bereich der Lebensmittelanalytik, Umweltanalytik und medizinischen In-vitro-Diagnostik handelt es sich um ein verbreitetes Verfahren.

Es werden drei ELISA-Methoden unterschieden:

- direkter ELISA
- indirekter ELISA
- kompetitiver ELISA

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA, eine Form des indirekten ELISA, angewandt. Dabei wird die Platte zunächst mit einem Beschichtungsantikörper belegt. Nach Zugabe und Bindung des Antigens an den Beschichtungsantikörper kann die Detektion mit einem zweiten Antikörper, dem Primärantikörper, erfolgen. Da die Beschichtungs- und Primärantikörper verschiedene Epitope des Antigens erkennen, bilden sie so einen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich). Der Nachweis des Komplexes erfolgt über einen konjugierten Sekundärantikörper und anschließende enzymatische Farbreaktion. Hierbei wird ein farbloses Substrat zu einer farbigen Verbindung umgesetzt und mittels ELISA-Reader gemessen und quantifiziert. Je mehr Antigen in einer Probe enthalten ist, desto intensiver ist die Farbreaktion.

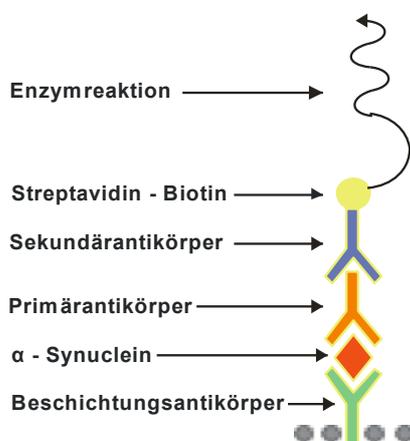


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA (Quelle: eigene Darstellung)

5. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von humanem α -Synuclein im Plasma. Dazu mussten zunächst die optimalen Bedingungen des ELISA-Testverfahrens festgelegt werden.

Nach Etablierung des ELISA sollten Aussagen zu folgenden Punkten getroffen werden:

- (1) Ermittlung der Referenzwerte für die Plasmakonzentration von α -Synuclein in einem Normalkollektiv
- (2) Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Plasmakonzentration von α -Synuclein, dem Alter und dem Geschlecht der Probanden
- (3) Vergleich der Plasmakonzentration von α -Synuclein zwischen gesunden Probanden und Patientenkollektiven mit AD und DLB

6. Arbeitshypothesen

- (1) Die Prävalenz von Synucleinopathien steigt mit zunehmendem Lebensalter. Es ist anzunehmen, dass α -Synuclein auch beim Alterungsprozess von Gesunden eine physiologische Rolle spielt und die α -Synucleinkonzentration im Plasma mit dem Alter zunimmt.
- (2) α -Synuclein ist maßgeblich an der Entstehung von Synucleinopathien beteiligt. Es ist davon auszugehen, dass die α -Synucleinkonzentration im Plasma bei Synucleinopathien pathologisch erhöht ist. Dies würde den Einsatz von α -Synuclein als diagnostischen Biomarker ermöglichen.

II Material und Methoden

1. Material

1.1. Antikörper und Antigene

1.1.1. Monoklonale Antikörper

Mouse anti- α -Synuclein Antikörper, Klon Syn211	Zymed
Monoclonal mouse anti-rabbit IgG (γ -chain specific)-Biotin	Sigma

1.1.2. Polyklonale Antikörper

Anti- $\alpha/\beta/\gamma$ -Synuclein Antikörper, Klon Fl-140	Santa Cruz
Anti- α/β -Synuclein Antikörper, Klon N-19	Santa Cruz
Goat anti-rabbit IgG (whole molecule) peroxidase-conjugate	Sigma
Goat anti-rabbit IgG (whole molecule)-Biotin	Sigma
Rabbit anti-goat IgG (whole molecule)-Biotin	Sigma

Tabelle 1: **Verwendete Antikörper gegen α -Synuclein**

Bezeichnung	Epitope	Wirt	Reaktivität
mouse anti- α -Synuclein, Klon Syn211	Aminosäuren 121-125 von humanem α -Synuclein	monoclonal, mouse	human
anti- $\alpha/\beta/\gamma$ -Synuclein, IgG, Klon Fl-140	Aminosäuren 1-140 von humanem α -, β - und γ -Synuclein	polyclonal, rabbit	human, rat, mouse
anti- α/β -Synuclein, IgG, Klon N-19	N-Terminus des humanen α - und β -Synucleins	polyclonal, goat	human, rat, mouse

1.2. Probandenkollektiv

Die Untersuchungen wurden im Rahmen des Ethikantrages 314/2006 durchgeführt.

1.2.1. Normalkollektiv

Ziel war es, die Plasmakonzentration von α -Synuclein in einem Normalkollektiv zu ermitteln. Nach Aufklärung und mündlicher Einwilligung erfolgte die Entnahme der Blutproben. Aus einem Kollektiv von gesunden Blutspendern des Instituts für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen wurden 95 Plasmaproben aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

1.2.2. Patientenkollektiv

Die Patientenproben aus der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Eberhard Karls Universität Tübingen bestanden aus 10 Patienten mit DLB, 10 Patienten mit AD und 10 gesunden Kontrollpersonen ähnlichen Alters ohne klinische Demenzanamnese.

Die Diagnosestellung der AD-Patienten erfolgte durch einen Psychiater der Klinik nach anerkannten Kriterien des ICD-10, DSM-IV und der NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association). Zur Einteilung in die Gruppe der DLB-Patienten dienten die klinischen Kriterien von McKeith et al. Der Schweregrad der Demenz wurde anhand des Mini-Mental-Status-Tests (MMST) erfasst. Von der Testung ausgeschlossen wurden Patienten, bei denen eine zerebrovaskuläre Erkrankung bildgebend gesichert war, oder die an einer körperlichen oder geistigen Behinderung litten, die zu einer Beeinträchtigung des klinischen Krankheitsbildes führte bzw. hätte führen können.

1.3. Antigene

Die Synuclein-Proteine wurden rekombinant in *E. coli* synthetisiert und von Professor T. Jovin (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Folgende Synuclein-Proteine kamen zum Einsatz:

- Wildtyp α -Synuclein homo sapiens, α -Syn AS
- Wildtyp β -Synuclein homo sapiens, β -Syn AS
- Mutante des humanen α -Synucleins durch Austausch von Glutaminsäure an Position 46 durch Lysin, E46K

1.4. Chemikalien, Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung/ Firma
Natriumchlorid	NaCl/ Merck
Kaliumchlorid	KCl/ Merck
Natriumhydroxid	NaOH/ Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄ / Merck
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat	Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O / Merck
Salzsäure	HCl/ Merck
Ampuwa [®] Wasser	H ₂ O/ Fresenius Kabi
Karbonatpuffer-Kapseln (pH 9,6)	Na ₂ CO ₃ / Sigma
Magermilchpulver	Sucofin
Gelatine (porcine skin), Typ A, ca.175 Bloom	Sigma
Tween [®] 20	Polyoxyethylensorbitan-monolaurat / Sigma
Streptavidin-POD Conjugate	Roche
BDNF	R&D Systems
TMB, gebrauchsfertig	Tetramethylbenzidine/ Sigma
Trizma [®] base	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/ Sigma

PBS (PH 7,4)	HPO_4^{2-} und H_2PO_4^-
Wasser demineralisiert, nicht keimfrei	Carl Roth
Schwefelsäure	H_2SO_4 / Universitätsapotheke Tübingen
BSA	Sigma
Ziegen Serum	Sigma

Bikarbonatpuffer, pH 9,6

Den Inhalt der Bikarbonat-Kapseln in destilliertem Wasser bei 25 °C auflösen.

PBS- Puffer (Phosphatgepufferte Salzlösung), pH 7,2

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na_2HPO_4	8,1 mM
KH_2PO_4	1,5 mM

in 1000 ml destilliertem Wasser lösen und vor Gebrauch mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,2 einstellen.

TBS- Lösung (Trispuffer)

NaCl	150 mM
Tris	7,7 mM

in 1000 ml destilliertem Wasser lösen und vor Gebrauch mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,3 einstellen.

Waschlösung

0,05% Tween[®] 20 in PBS

Probenpuffer und Blockierlösung

TBS mit unterschiedlichen Tween[®] 20-Konzentrationen

1.5. Spezielle Verbrauchsmaterialien und Apparaturen

Mikrotiterplatten:

96 Well Immuno Platten MaxiSorp	Nunc
96 Well Immobilizer Amino Platten	Nunc
Eppendorfgefäße	Greiner
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf, Sarstedt, Greiner
Mehrkanalpipetten	Eppendorf
CryoTubes 3,6 ml	Nunc
Falcon Tubes 50 ml	Becton Dickinson
Becherglas	Schott Duran
Messzylinder	Hirschmann Duran, Vitlab, Stabil Kavalier
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Rühr-, Heizgerät, Typ MR 02	Heidolph
Digitales pH-Messgerät	WTW
Medizinische Messwaage	Sartorius GmbH
Elektrophorese-Messgerät	Biometra
Microplate Washer	Bio-Rad
Vortex Mixer	NeoLab
Zentrifuge, Multifuge 3 L-R	Kendro Laboratory Products
ELISA-Reader	Tecan Sunrise

1.6. Software

SoftMax Pro Version 5.3	Molecular Devices Corporation
Microsoft Excel 2010	Microsoft
Open-Source-Programm R 3.0.1	R Project

2. Methoden

Zur Quantifizierung von α -Synuclein in humanem Plasma wurde ein Sandwich-ELISA entwickelt.

Die Mikrotiterplatten wurden zunächst mit einem Beschichtungsantikörper belegt, der gegen α -Synuclein gerichtet ist. Nach dem Blockieren freier Bindungsstellen erfolgte die Probeninkubation mit α -Synuclein-Standards bzw. der Plasmaprobe. Durch die Bindung eines zweiten Antikörpers, dem Primarantikörper, an α -Synuclein entstand ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Die Detektion erfolgte mit einem konjugierten (biotinylierten) Antikörper, der durch eine Enzymreaktion nachgewiesen wurde. Nach Hinzugabe der Stopplösung konnte die optische Dichte mittels Photometer (ELISA-Reader) bestimmt werden.

Für die Auswertung wurden Standardlösungen mit bekannter α -Synucleinkonzentration mitgeführt. Durch den Vergleich mit einer Standardkurve konnte das Antigen quantifiziert und damit die Konzentrationen von α -Synuclein in den Plasmaproben berechnet werden. Bei der Standardkurve war darauf zu achten, dass die zu erwartenden α -Synucleinkonzentrationen im linearen Messbereich der Standardkurve lagen.

Als interne Kontrollen wurden bei jedem Versuch die Standardplasmen N1-N3 mitgetestet, was einen späteren Abgleich der verschiedenen Versuchstage ermöglichte.

2.1. Auswahl der Mikrotiterplatten

Es wurden die Immobilizer Amino Platten und die MaxiSorp Platten der Firma Nunc getestet. MaxiSorp und Immobilizer Amino Platten bestehen aus einer Polystyroloberfläche mit unterschiedlichen Bindungskapazitäten. MaxiSorp Platten haben eine hohe Affinität zu Molekülen mit hydrophilen und hydrophoben Regionen, wie sie bei Proteinen und Antikörpern vorkommen. Bei Immobilizer Amino Platten wird durch eine spezielle photochemische Vorbehandlung ein Ethylenglycol-Spacer mit einer stabilen Ladung an die Platten gebunden. Mit Hilfe dieses Spacers kann man Proteine und Peptide durch Kopplung mit nukleophilen Gruppen kovalent an die Platte binden. Dies bedingt eine sehr stabile Beschichtung und liefert ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis.

2.2. Beschichtungsantikörper

Die Mikrotiterplatten wurden mit einem gegen α -Synuclein gerichteten Antikörper beschichtet. Dazu wurde monoklonaler mouse anti- α -Synuclein Antikörper bzw. polyklonaler anti- $\alpha/\beta/\gamma$ -Synuclein Antikörper in verschiedenen Konzentrationen (0,5, 1, 2, 4 und 5 $\mu\text{g/ml}$) einem Karbonatpuffer (pH 9,6) oder PBS (pH 7,2) zugegeben. Als Negativkontrolle diente eine Pufferlösung ohne Antikörper. Die Mikrotiterplatten wurden luftdicht verschlossen und über Nacht (maximal 18 Stunden) bei 4 °C inkubiert. Der pH-Wert ist bei der Beschichtung der Platten zu berücksichtigen, da dieser die räumliche Struktur und damit die Immobilisierungseigenschaften des Antikörpers beeinflusst.

Bei dem anti- $\alpha/\beta/\gamma$ -Synuclein Antikörper liegt die empfohlene Konzentration des Herstellers für ELISA Anwendungen zwischen 0,067 $\mu\text{g/ml}$ und 6 $\mu\text{g/ml}$.

Für den mouse anti- α -Synuclein Antikörper der Firma Zymed wird vom Hersteller keine Konzentration für ELISA Anwendungen empfohlen. In der Praxis liegen diese meist zwischen 1-5 $\mu\text{g/ml}$.

2.3. Waschvorgang der Mikrotiterplatten

Nach Ablauf der Inkubationsphase folgte das dreimalige Waschen der Mikrotiterplatten mithilfe eines automatischen Mikrotiterplatten-Washers. Die Kavitäten wurden mit Waschpuffer PBS/T (PBS-Lösung mit 0,05% Tween® 20) gewaschen, um nicht adsorbierte Antikörper zu lösen. Um überschüssige Flüssigkeit restlos zu entfernen, wurden die Platten auf saugfähigem Zellstoff ausgeklopft.

Die Waschschritte erfolgten nach jedem Inkubationsschritt in verschiedenen Wiederholungen.

2.4. Auswahl der Blockierlösung

Die Oberflächen von ELISA-Platten sind dahingehend optimiert, dass eine möglichst gute Bindung von Antikörpern bzw. Proteinen erreicht wird. Neben dem Beschichtungsantikörper können dadurch aber auch andere Antikörper und Proteine gut an die Mikrotiterplatten binden, was zu einem hohen Hintergrundsignal oder falschen Ergebnissen führen kann. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, werden Blockierlösungen eingesetzt, die der Absättigung freier Bindungsstellen auf den Mikrotiterplatten dienen.

Es wurden verschiedene Blockierlösungen getestet.

- PBS mit 0,3% Tween[®] 20
- 5%, 10%, 20% Magermilch in PBS/T
- 1% Ziegenserum in PBS/T
- 0,5%, 1%, 2%, 2,5% Gelatine Typ A in PBS/T
- 1%, 2,5% Gelatine Typ A jeweils mit 1% BSA in PBS/T

2.5. Standards und Proben

Standards und verdünnte Plasmaproben wurden im Doppel- oder Dreifachansatz untersucht.

2.5.1. Plasma

Die Plasmaproben wurden unverdünnt oder mit TBS/T verdünnt im Verhältnis 1:5 bis 1:1600 verwendet.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden bekannte Mengen von α -Synuclein einer Plasmaprobe zugesetzt und mittels ELISA gemessen. Im Anschluss wurden die wiedergefundenen Mengen von α -Synuclein mit den zugesetzten Mengen verglichen.

2.5.2. α -Synuclein

α -Synuclein wurde entsprechend einer Standardreihe, bestehend aus mehreren Verdünnungsstufen, mit dem Lösungspuffer TBS/T gemischt. Die Konzentrationen lagen zwischen 0,3 $\mu\text{g/ml}$ und 500 $\mu\text{g/ml}$. Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurde als Negativkontrolle TBS/T ohne Antigen mitgeführt.

Zur Prüfung der Spezifität des ELISA wurden BDNF und β -Synuclein verwendet. BDNF wurde in einer Konzentration von 50 ng/ml eingesetzt, β -Synuclein auf 10 ng/ml verdünnt.

Zur Untersuchung der Stabilität von α -Synuclein-Standards wurde α -Synuclein in einer Konzentration von 5, 10 und 20 ng/ml in TBS-Lösung im Wasserbad bei 37 °C bzw. 55 °C für 3 Tage inkubiert. Die einzelnen Ansätze wurden nach 3 Stunden, 10 Stunden, 1 Tag, 2 Tagen und 3 Tagen entnommen und bis zur weiteren Untersuchung bei -20 °C gelagert.

Um eine Protofibrillenbildung zu vermeiden, wurden die Lösungen höchstens zwei Mal eingefroren.

2.6. Primärantikörper

Als Primärantikörper wurden der polyklonale anti- $\alpha/\beta/\gamma$ -Synuclein Antikörper, der anti- α/β -Synuclein Antikörper oder der monoklonale mouse anti- α -Synuclein Antikörper verwendet. Ein polyklonaler Antikörper erkennt mehrere Epitope von α -Synuclein.

Der Primärantikörper wurde in den in Tabelle 2 aufgelisteten Verdünnungen untersucht. Der Verdünnungspuffer TBS enthielt 0,1% Magermilch und/oder unterschiedliche Konzentrationen an Tween[®] 20 (0,05%, 0,3%, 0,5% und 1%).

Die Mikrotiterplatten wurden 3 Stunden bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Tabelle 2: **Verwendete Primärantikörper in verschiedenen Verdünnungen**

Antikörper	anti- $\alpha/\beta/\gamma$ -Synuclein Antikörper	mouse anti- α -Synuclein Antikörper	anti- α/β -Synuclein Antikörper
Verdünnung	1:1000 1:2000 1:4000	1:2000	1:1000

2.7. Konjugierter Sekundärantikörper

Sekundärantikörper erkennen bestimmte Primärantikörper oder deren Bestandteile und sind gegen die Spezies gerichtet, aus der der Primärantikörper stammt. Deswegen sind bei der Auswahl des Sekundärantikörpers die Wirtspezies sowie die Klasse des Primärantikörpers zu beachten.

Es können polyklonale oder monoklonale Sekundärantikörper verwendet werden. Während monoklonale Sekundärantikörper meist aus der Maus stammen, werden polyklonale Sekundärantikörper aus Kaninchen, Eseln, Schafen oder Ziegen gewonnen. Viele Sekundärantikörper sind bereits konjugiert erhältlich. Meist wird der Antikörper mit Fluoreszenzmarkern, Enzymen (z.B. Peroxidase (POD)) oder Biotin gekoppelt.

Um die unspezifischen Bindungen des Nachweissystems zu minimieren, wurden zum Sekundärantikörper 0,1%, 2% oder 5% Magermilch zugefügt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte 75 min lang bei RT auf dem Schüttler.

Tabelle 3: **Verwendete Sekundärantikörper in verschiedenen Verdünnungen**

Antikörper	anti-rabbit IgG (γ -chain specific)-Biotin	anti-rabbit IgG (whole molecule)-Biotin	anti-goat IgG (whole molecule)-Biotin	anti-rabbit IgG (whole molecule) peroxidase-conjugate
Verdünnung	1:5000 1:10000 1:20000	1:1250 1:5000 1:10000 1:12500 1:20000	1:5000	1:5000

2.8. Streptavidin-Peroxidase

Es wurden je Well 50 μ l Streptavidin-POD 1:5000 zugegeben und über 35 min auf dem Schüttler bei RT inkubiert.

Streptavidin, konjugiert mit POD, bindet an den biotinylierten Sekundärantikörper. Die POD katalysiert die Farbreaktion. Durch die mehrfache Biotinylierung des Sekundärantikörpers wird das Nachweissignal amplifiziert. Dadurch lässt sich α -Synuclein auch in geringen Konzentrationen nachweisen.

2.9. Farbreaktion und Messung der optischen Dichte

Das farblose Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) wird in ein blaues Zwischenprodukt umgewandelt, sodass sich die einzelnen Wells in quantitativer Abhängigkeit des nachzuweisenden Antigens in unterschiedlicher Intensität färben.

Die enzymatische Farbreaktion wird nach ca. 20 min durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt, wodurch das blaue Zwischenprodukt in einen gelben Farbstoff 3,3',5,5'-Tetramethyl 1,1-4,4 Diimin überführt wird.

Dieser kann im Photometer bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen werden.

2.10. Auswertung

Die Auswertung der Extinktionswerte erfolgte mit der Magellan-Software des ELISA-Readers der Firma Tecan. Anhand der Standardkurve konnten die α -Synucleinkonzentrationen unbekannter Proben festgelegt werden. Die statistische und grafische Ausarbeitung wurde mit Microsoft Excel 2010, dem Open-Source-Programm R 3.0.1. und dem Programm SoftMax Pro Version 5.3 durchgeführt.

III Ergebnisse

1. Optimierung der Plattenbeschichtung

Um eine maximale Plattenbeschichtung zu erreichen, musste eine geeignete Kombination aus dem verwendeten Plattenmaterial, der eingesetzten Antikörperkonzentration, dem Beschichtungspuffer und den Inkubationsbedingungen gefunden werden.

1.1. Auswahl der geeigneten Mikrotiterplatte

Es wurden zwei Typen von Mikrotiterplatten getestet: Immobilizer Amino Platten und MaxiSorp Platten.

Die Technologie der Immobilizer Amino Platten basiert auf einer Anthrachinon-Photo-Kopplungsmethode, die ein einfaches, einstufiges Verfahren zur kovalenten Bindung von Peptiden oder Proteinen darstellt. Diese starke kovalente Bindung bewirkt im Gegensatz zu passiven Bindungen, dass gebundene Moleküle nicht abgelöst werden. Unspezifische Bindungen an der Oberfläche der Platte werden u.a. durch Waschverfahren und die Anwendung einer detergenschaltigen Inkubationslösung vermindert.

Bei der MaxiSorp-Oberfläche handelt es sich um eine spezielle Oberflächenbeschichtung auf Polystyrolbasis mit einer hohen Affinität für polare Gruppen. Sie wird für ELISA empfohlen, bei denen Glykoproteine an die Kunststoffoberfläche gebunden werden sollen.

Beide Platten erwiesen sich als geeignet für den ELISA und ermöglichten eine gut auswertbare Standardkurve (vgl. Abbildung 5). Die Immobilizer Amino Platten zeigten ein niedrigeres Hintergrundsignal (gemessene Extinktion bei der Leerwertkontrolle) als die MaxiSorp Platten (vgl. Abbildung 6).

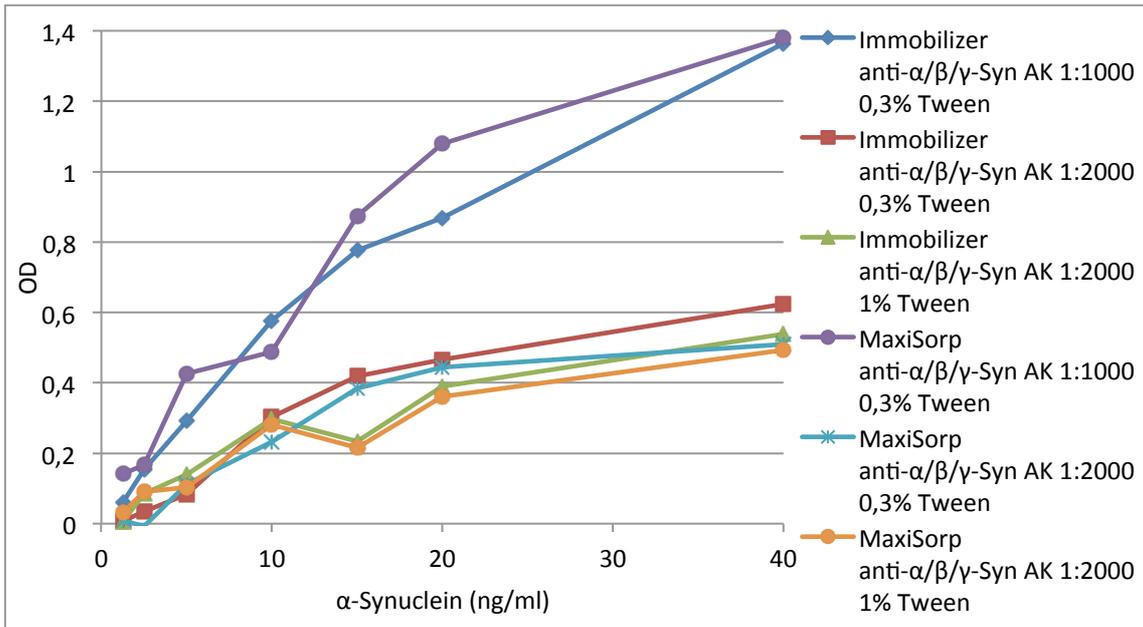


Abbildung 5: **MaxiSorp Platten und Immobilizer Amino Platten.** OD-Werte in Abhängigkeit von der α -Synucleinkonzentration. Verschiedene Plattentypen und Verdünnungen des Primärantikörpers mit unterschiedlichen Tween[®] 20-Konzentrationen. Doppelbestimmungen mit Angabe des Mittelwerts.

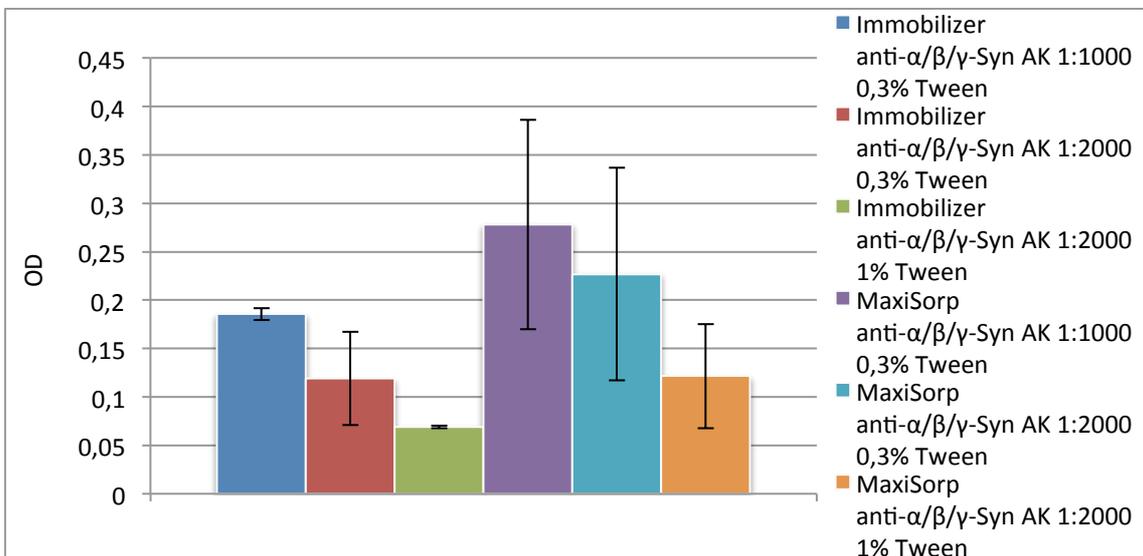


Abbildung 6: **Hintergrundsignal verschiedener Mikrotiterplatten.** Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Weitere Versuche ergaben bei der Verwendung der MaxiSorp Platte eine höhere Sensitivität bei gleichzeitig niedrigen Antigenkonzentrationen (0,3 bis 10 ng/ml α -Synuclein) im Vergleich zur Immobilizer Amino Platte (vgl. Abbildung 7). Daher wurden für alle folgenden Untersuchungen MaxiSorp Platten beschichtet.

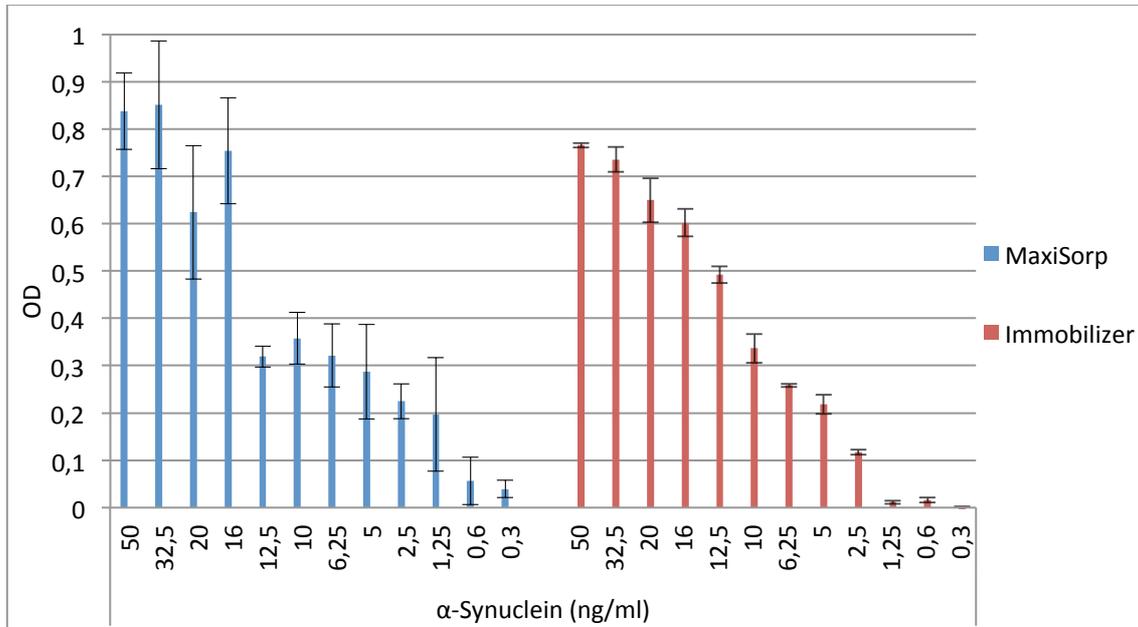


Abbildung 7: **Vergleich MaxiSorp Platten und Immobilizer Amino Platten.** OD-Werte in Abhängigkeit von der α -Synucleinkonzentration. Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

1.2. Beschichtungspuffer und Konzentration des Beschichtungsantikörpers

Um die optimale Plattenbeschichtung festzulegen, wurden verschiedene Beschichtungspuffer und -antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. Als Beschichtungspuffer wurden ein PBS-Puffer (pH 7,2) und ein Karbonatpuffer (pH 9,6) verwendet.

1.2.1. Auswahl des pH-Wertes

Die OD-Werte der Hintergrundsignale lagen eng beieinander. Bei dem Karbonatpuffer (pH 9,6) waren niedrigere OD-Werte des Hintergrundsignals als bei dem PBS-Puffer (pH 7,2) zu erkennen (vgl. Abbildung 8).

Die Beschichtung des Antikörpers mithilfe eines Karbonatpuffers zeigte im Vergleich zum PBS-Puffer höhere OD-Werte. Bei beiden Beschichtungspuffern war eine Abnahme der OD-Werte in Abhängigkeit von der α -Synucleinkonzentration zu sehen (vgl. Abbildung 9).

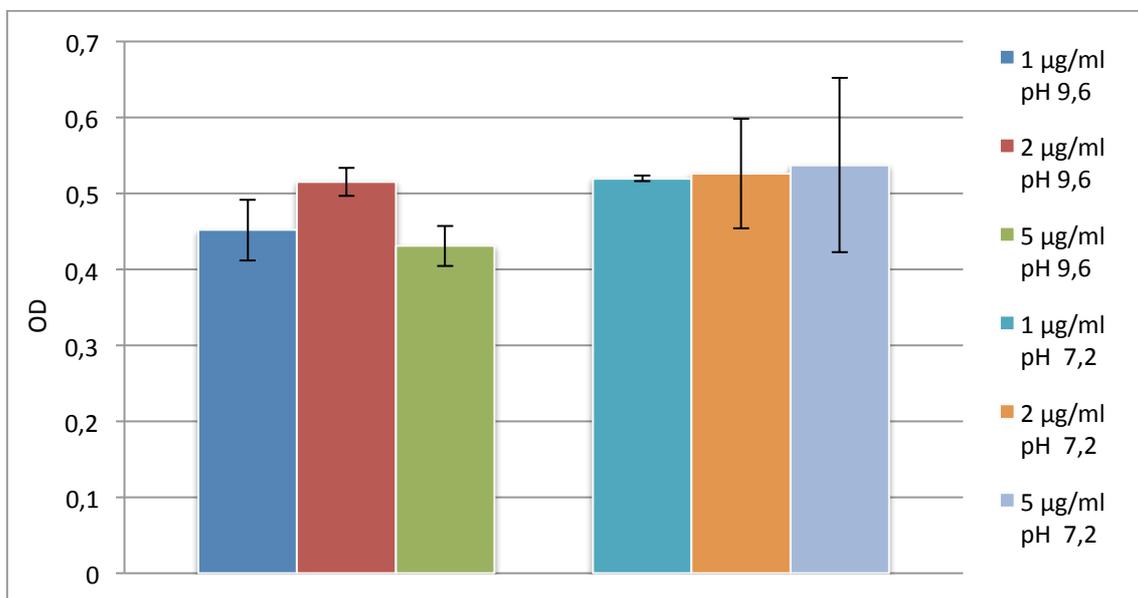


Abbildung 8: **Hintergrundsignal bei verschiedenen Konzentrationen des Beschichtungsantikörpers und unterschiedlichen pH-Werten.** Verwendung des AK in den Konzentrationen 1, 2 und 5 µg/ml. Vergleich Karbonatpuffer (pH 9,6) mit PBS-Puffer (pH 7,2). Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

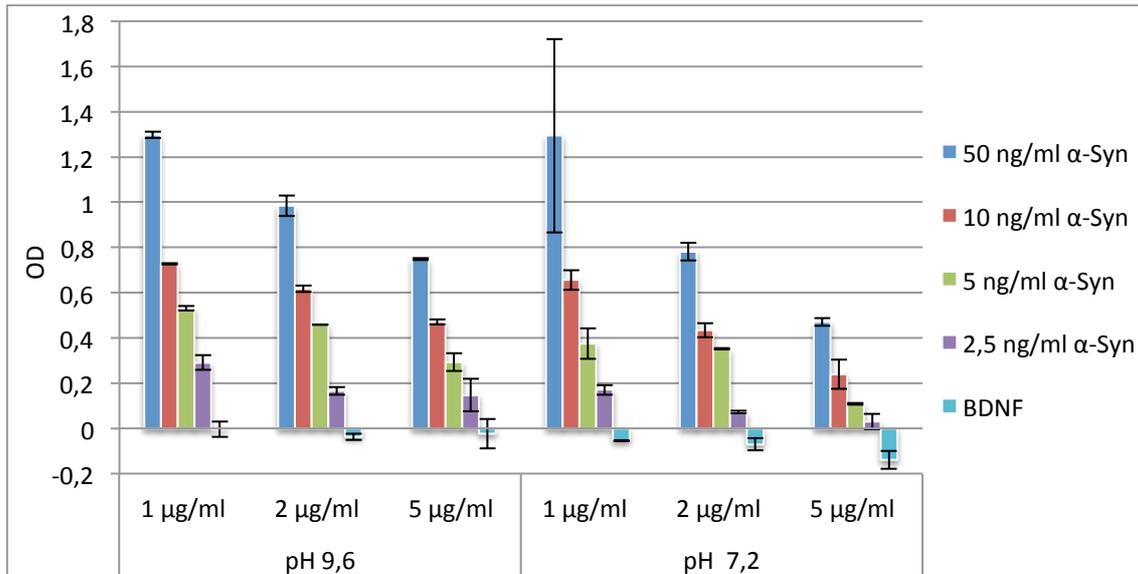


Abbildung 9: **Verschiedene Konzentrationen des Beschichtungsantikörpers bei unterschiedlichen pH-Werten.** Verwendung des AK in den Konzentrationen 1, 2 und 5 µg/ml. Vergleich Karbonatpuffer (pH 9,6) mit PBS-Puffer (pH 7,2). Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

1.2.2. Auswahl des Beschichtungsantikörpers und seiner Konzentration

Beim Sandwich-ELISA standen zwei spezifische Antikörper gegen α -Synuclein zur Verfügung: der Beschichtungsantikörper und der Primärantikörper. Diese beiden Antikörper erkannten nicht die gleichen Epitope des Antigens.

Der monoklonale mouse anti- α -Synuclein Antikörper und der polyklonale $\alpha/\beta/\gamma$ -Synuclein Antikörper wurden sowohl als Beschichtungs- als auch als Primärantikörper eingesetzt und miteinander verglichen.

1.2.2.1. Monoklonaler mouse anti- α -Synuclein Antikörper

Die Platten wurden mit dem monoklonalen mouse anti- α -Synuclein Antikörper (Klon Syn211) in unterschiedlichen Konzentrationen beschichtet. Mit höheren Konzentrationen des Beschichtungsantikörpers wurden höhere OD-Werte gemessen (vgl. Abbildung 10). Auch das Hintergrundsignal nahm mit der Konzentrationserhöhung des Beschichtungsantikörpers zu (vgl. Abbildung 11).

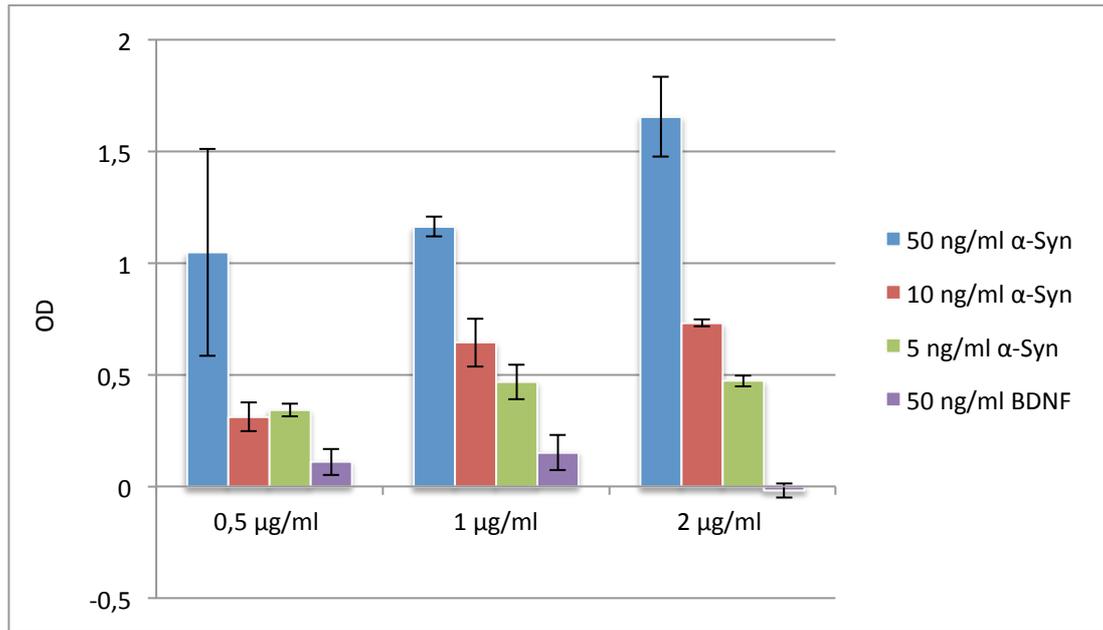


Abbildung 10: **Verschiedene Konzentrationen des Beschichtungsantikörpers Syn211.** Verwendung des AK Syn211 in den Konzentrationen 0,5, 1 und 2 µg/ml. Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

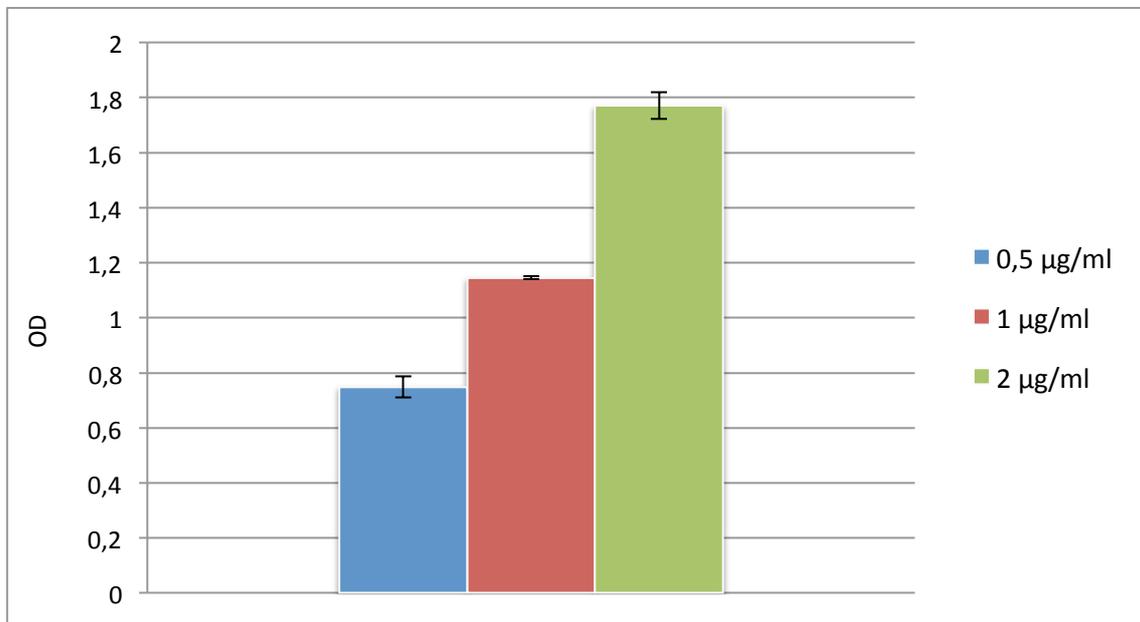


Abbildung 11: **Hintergrundsignal bei verschiedenen Konzentrationen des Beschichtungsantikörpers Syn211.** Verwendung des AK Syn211 in den Konzentrationen 0,5, 1 und 2 µg/ml. Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Bei einer Erhöhung der Konzentration des Beschichtungsantikörpers Syn211 auf über 2 µg/ml zeigte sich keine weitere Zunahme der Extinktionswerte (vgl. Abbildung 12).

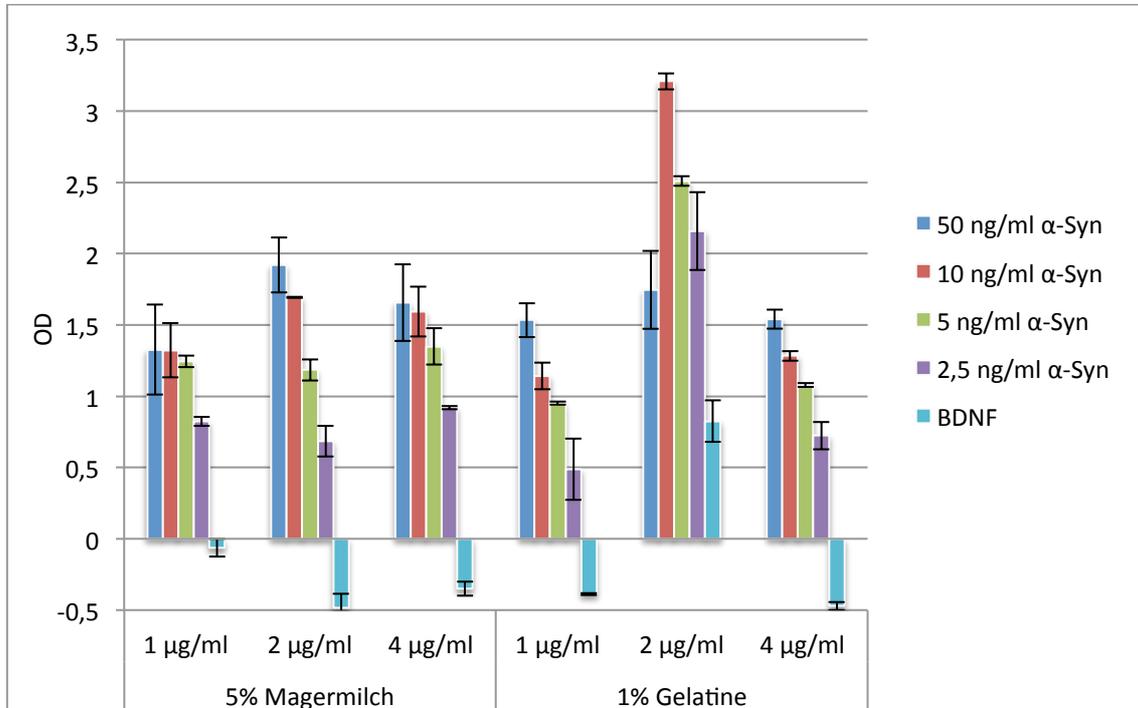


Abbildung 12: **Verschiedene Konzentrationen des Beschichtungsantikörpers Syn211 und Verwendung unterschiedlicher Blockierlösungen.** AK Syn211 in den Konzentrationen 1, 2 und 4 µg/ml. Vergleich 5% Magermilch und 1% Gelatine. BDNF als Kontrolle. Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Abbildung 13 ist zu entnehmen, dass bei erhöhter Konzentration des Beschichtungsantikörpers Syn211 die unspezifischen Bindungen des Nachweissystems zunahm. Abweichend hiervon war das niedrige Hintergrundsignal bei einer Konzentration von 2 µg/ml und einer Blockierung mit 1% Gelatine. Dies war am ehesten auf eine fehlerhafte Bestimmung zurückzuführen.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass sich durch eine Konzentrationserhöhung des Beschichtungsantikörpers Syn211 über 2 µg/ml keine Verbesserung der Extinktion mehr erreichen ließ. Dagegen kam es zu einer unerwünschten Zunahme des Hintergrundsignals. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Beschichtungsantikörper Syn211 in einer Konzentration von 1 µg/ml in den weiteren Versuchen verwendet.

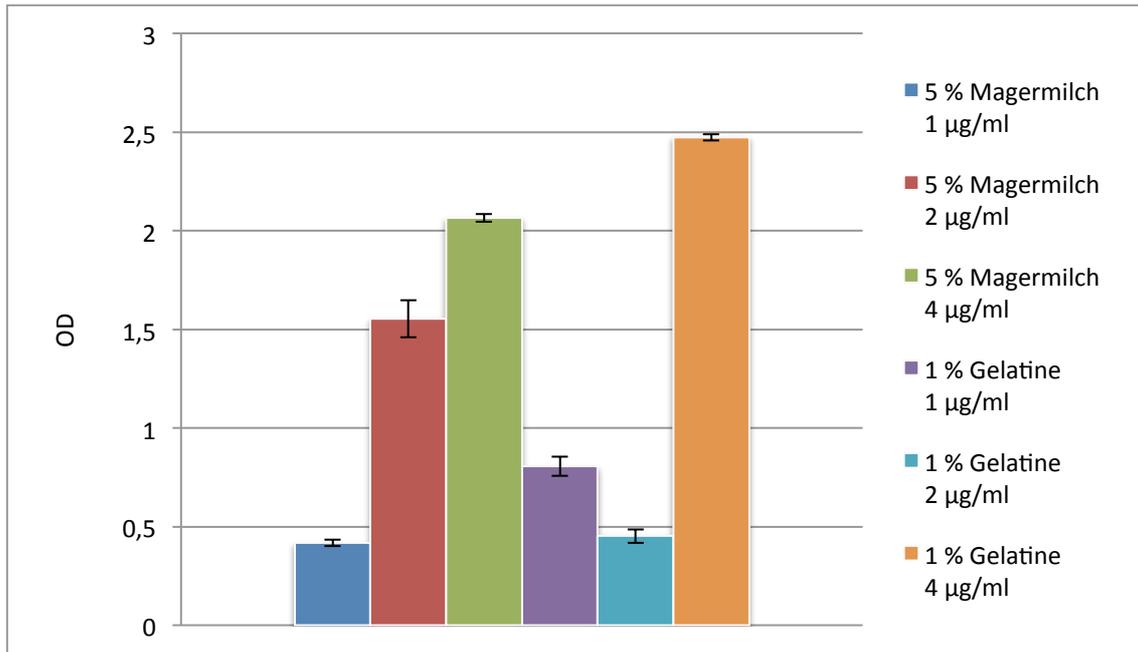


Abbildung 13: **Hintergrundsignal bei verschiedenen Konzentrationen des Beschichtungsantikörpers Syn211 und unterschiedlichen Blockierlösungen.** Verwendung des AK Syn211 in den Konzentrationen 1, 2 und 4 µg/ml. Vergleich 5% Magermilch und 1% Gelatine. Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

1.2.2.2. Polyklonaler $\alpha/\beta/\gamma$ -Synuclein Antikörper

Bei diesem Ansatz wurden die Platten mit dem $\alpha/\beta/\gamma$ -Synuclein Antikörper in verschiedenen Konzentrationen beschichtet. Der mouse anti- α -Synuclein Antikörper diente in einer Verdünnung von 1:2000 als Primärantikörper. Im nächsten Schritt wurde der anti-mouse-IgG Antikörper biotinyliert in einer Verdünnung von 1:10000 zugegeben.

Zur Ermittlung der geeigneten Menge an Beschichtungsantikörpern wurden verschiedene Konzentrationen mit verschiedenen Antigen-Mengen kombiniert, sodass ein direkter Vergleich möglich war (vgl. Abbildung 14).

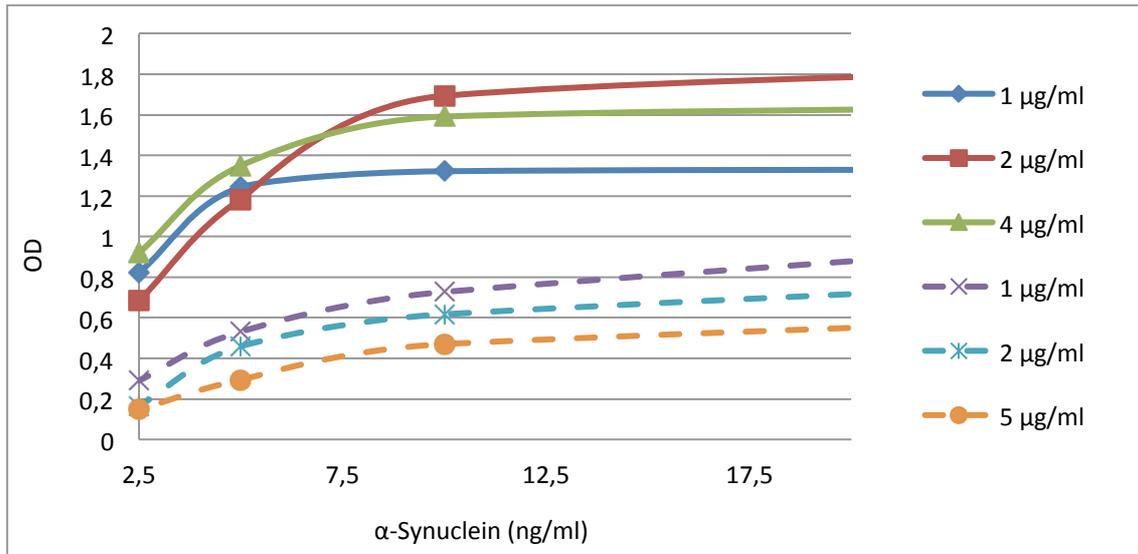


Abbildung 14: **Beschichtung mit monoklonalem AK und polyklonalem AK.** OD-Werte in Abhängigkeit von der α -Synucleinkonzentration. Verwendung des monoklonalen AK Syn211 (durchgehende Linie) in den Konzentrationen 1, 2 und 4 μ g/ml und des polyklonalen AK (gestrichelte Linie) in den Konzentrationen 1, 2 und 5 μ g/ml. Doppelbestimmungen mit Angabe des Mittelwerts.

Durch Verwendung unterschiedlicher Beschichtungsantikörper kann sich die Sensitivität eines ELISA ändern. Mit dem monoklonalen Beschichtungsantikörper ließen sich 2- bis 3fach höhere OD-Werte als mit dem polyklonalen Antikörper messen (vgl. Abbildung 14). Um ein hohes Hintergrundsignal zu vermeiden, wurde der monoklonale Antikörper in den nachfolgenden Versuchen in einer Konzentration von 1 μ g/ml verwendet (vgl. Tabelle 4). Der polyklonale Antikörper zeichnete sich auch in höheren Konzentrationen durch ein niedriges Hintergrundsignal aus.

Beim Beschichten mit dem monoklonalen Antikörper konnte im Vergleich mit dem polyklonalen Antikörper eine höhere Sensitivität erreicht werden.

Tabelle 4: **Verschiedene Konzentrationen der verwendeten Beschichtungsantikörper.** OD-Werte in Abhängigkeit von Beschichtungsantikörpern und ihrer Konzentration.

Antikörper	Polyklonaler anti- $\alpha/\beta/\gamma$ -Synuclein AK			Monoklonaler mouse anti- α - Synuclein AK		
	1 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$
Konzentration Beschichtungs-AK						
Mittelwert	0,451 \pm	0,515 \pm	0,430 \pm	0,419 \pm	1,555 \pm	2,066 \pm
Hintergrundsignal	0,040	0,018	0,026	0,016	0,094	0,019
Mittelwert α - Synuclein- konzentration von 2,5 ng/ml	0,741 \pm 0,289	0,68 \pm 0,165	0,578 \pm 0,147	1,240 \pm 0,822	2,238 \pm 0,683	2,986 \pm 0,92

2. Auswahl der Blockierlösung, des Wasch- und Verdünnungspuffers

2.1. Blockierlösung

Die Oberflächen von Mikrotiterplatten sind dahingehend modifiziert, dass eine möglichst hohe Adsorption von Proteinen bzw. Antikörpern erreicht wird. Dadurch können auch unspezifische Proteine wie Sekundärantikörper, Analyten oder andere Bestandteile der Probe an diese Oberflächen binden. Falsch positive Ergebnisse sind dadurch möglich.

Nach Beschichten der Mikrotiterplatten müssen deshalb freie Bindungsstellen blockiert werden, um unerwünschte Adsorptionen zu vermeiden.

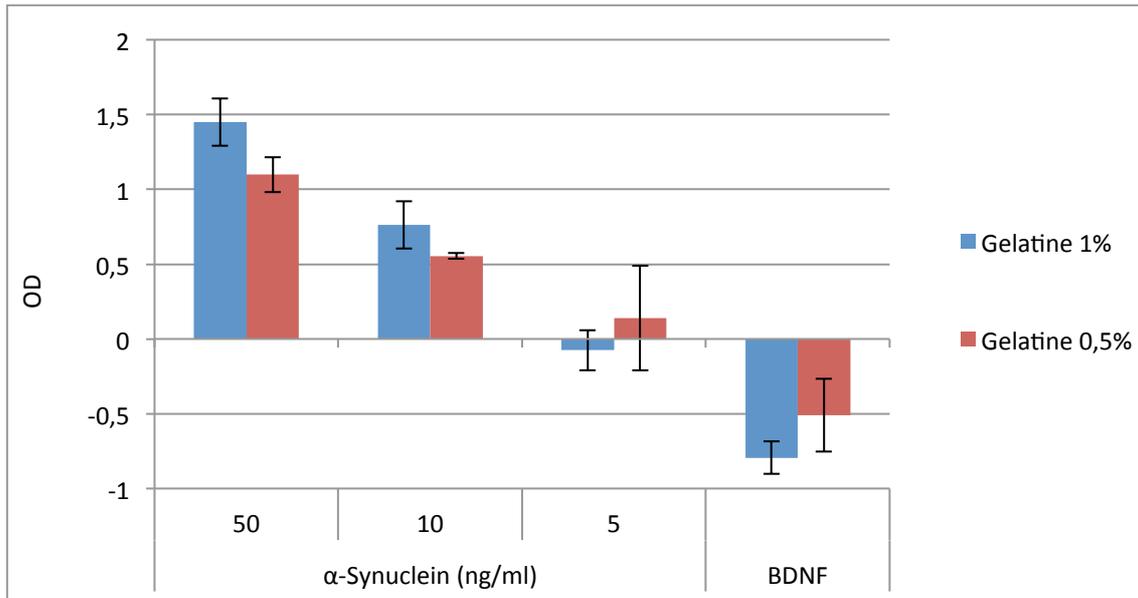


Abbildung 15: **Blockierlösung mit verschiedenen Gelatinekonzentrationen.** Verwendung von 0,5% und 1% Gelatine. OD-Werte in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration. Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Mit dem Ziel, unspezifische Bindungen zu reduzieren wurden verschiedene Blockierlösungen wie Gelatine, BSA und Magermilchpulver in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Alle Blockierlösungen enthielten 0,3% Tween[®] 20.

Bei der Testung von 0,5% und 1% Gelatine als Blockierlösung war eine Extinktionsabnahme in Abhängigkeit von der α -Synucleinkonzentration zu erkennen (vgl. Abbildung 15). Die 1% Gelatine lieferte im oberen Konzentrationsbereich höhere OD-Werte. Eine Abweichung des Messergebnisses gab es bei einer Konzentration von 5 ng/ml α -Synuclein, da hier die Extinktion nach Abzug des Hintergrundsignals negativ wurde und somit keine spezifischen Bindungen mehr gemessen werden konnten. Dies war am ehesten auf Fehler bzw. Ungenauigkeiten beim Pipettieren zurückzuführen.

Im Vergleich wurde mit der 0,5% Gelatine ein niedrigeres Hintergrundsignal als mit der 1% Gelatine erreicht.

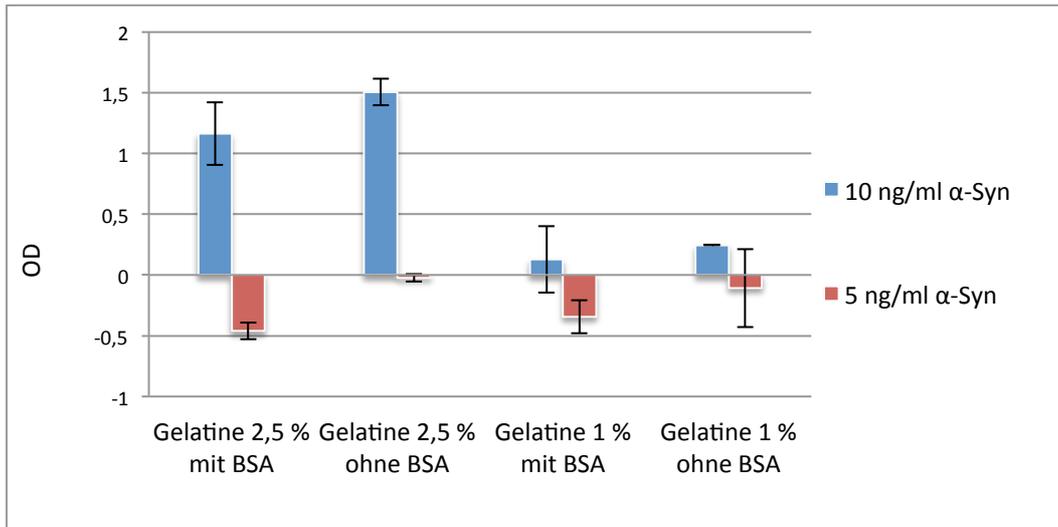


Abbildung 16: **Blockierlösung mit verschiedenen Gelatinekonzentrationen mit und ohne BSA.** Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Abbildung 16 ist zu entnehmen, dass verschiedene Gelatinekonzentrationen mit und ohne 1% BSA als Blockierlösung nicht geeignet waren. Ein sehr hohes Hintergrundsignal zwischen $2,00 \pm 0,058$ und $3,12 \pm 0,263$ sowie negative und niedrige Extinktionen nach Abzug des Hintergrundsignals ließen darauf schließen, dass hauptsächlich unspezifische Bindungen gemessen wurden.

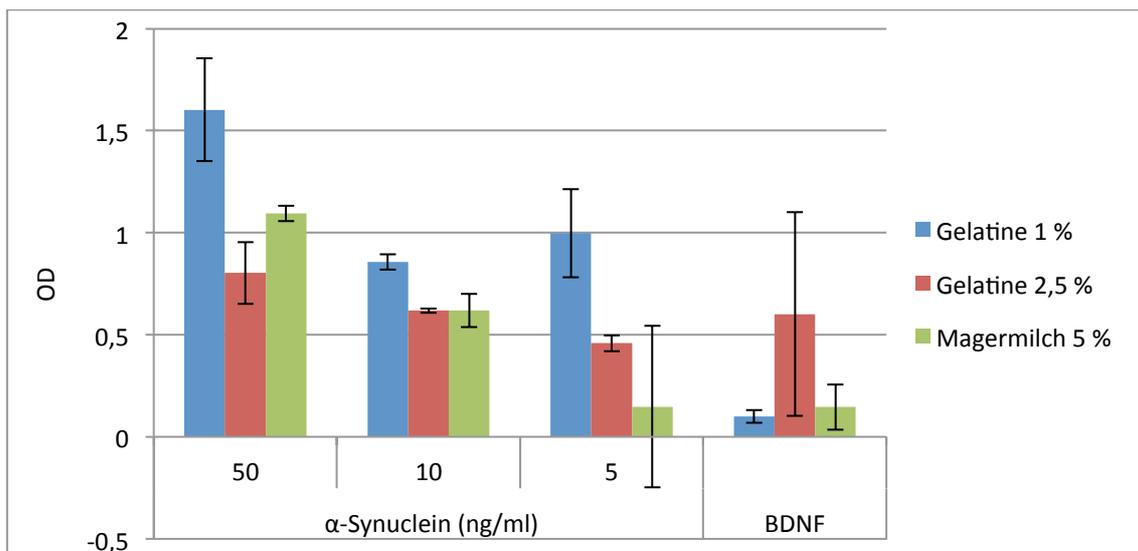


Abbildung 17: **Verschiedene Blockierlösungen.** Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

In weiteren Versuchen wurden verschiedene Gelatinekonzentrationen mit 5% Magermilch verglichen. Unter Verwendung von 5% Magermilch war das Hintergrundsignal am geringsten. Mit steigender Verdünnung von α -Synuclein zeigte sich ein gleichmäßiger Abfall der Extinktion (vgl. Abbildung 17).

Das Blocken mit einer 1:1-Mischung aus 1% Gelatine und 5% Magermilch war unzureichend. Im Vergleich hierzu konnte mit 1% Ziegen Serum und 5% Magermilch eine höhere Sensitivität mit 6-7fach geringerem Hintergrundsignal erreicht werden (vgl. Abbildung 18).

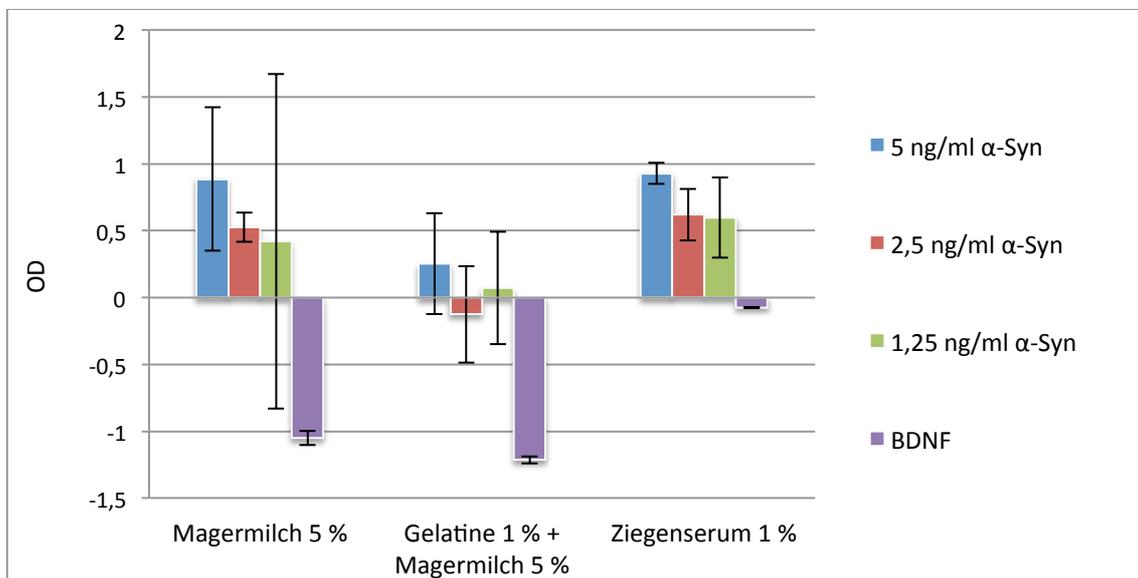


Abbildung 18: **Verschiedene Blockierlösungen.** Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Aus den Abbildungen 19 und 20 geht hervor, dass mit höheren Magermilchkonzentrationen keine weitere Reduktion der unspezifischen Bindungen erreicht wurde.

Den Abbildungen ist auch zu entnehmen, dass eine niedrigere Konzentration des Primärantikörpers zwar zu einer Reduktion des gemessenen Hintergrundsignals führte, die lineare Beziehung zwischen Extinktion und α -Synucleinkonzentration jedoch

beeinträchtigt war. Die Festlegung der Konzentration des Primärantikörpers wird unter Abschnitt III, 5. näher beschrieben.

Zusammenfassend konnten die besten Ergebnisse bei der Messung von humanem α -Synuclein unter Verwendung von 5% Magermilch als Blockierlösung erzielt werden.

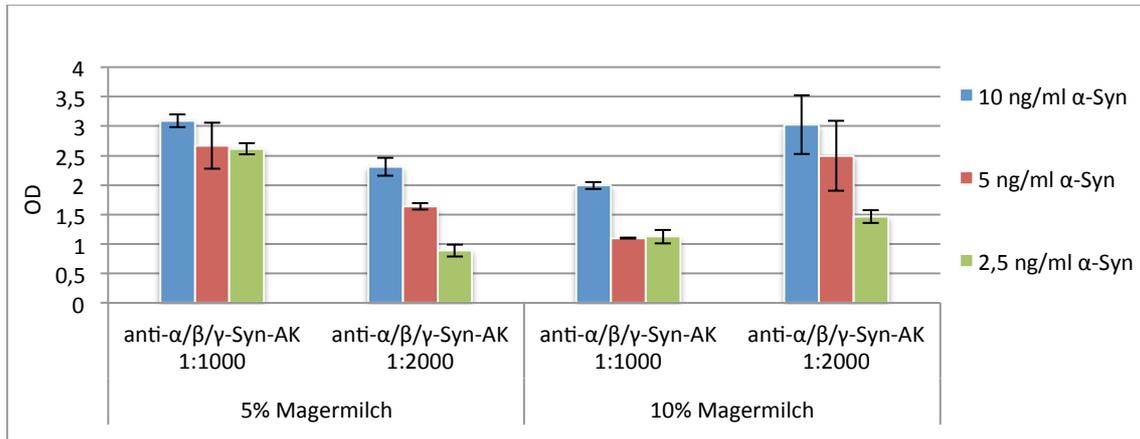


Abbildung 19: **Blockierlösung mit unterschiedlichen Magermilchkonzentrationen und verschiedenen Verdünnungen des Primärantikörpers.** Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

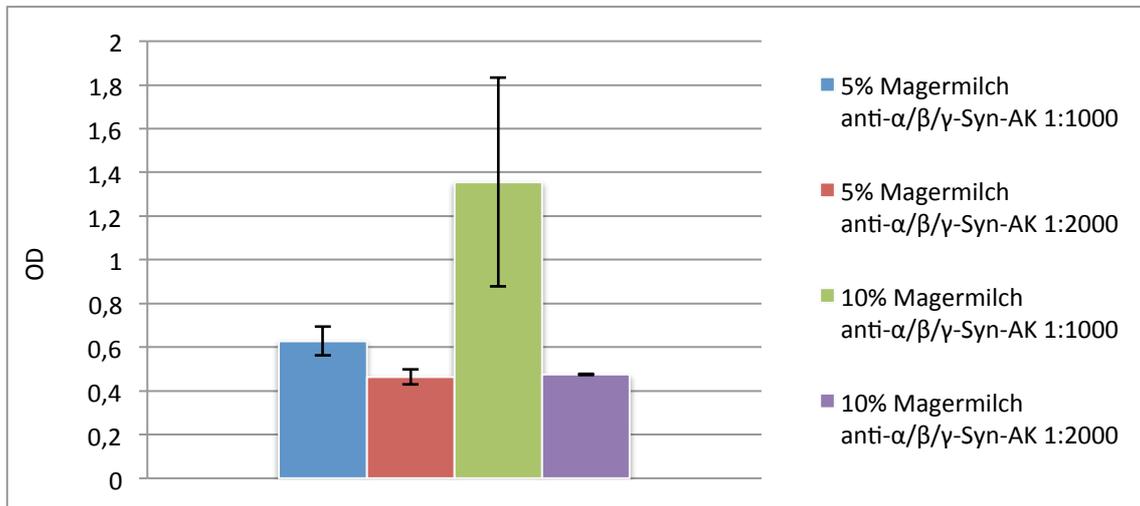


Abbildung 20: **Hintergrundsignal bei Blockierlösungen mit unterschiedlichen Magermilchkonzentrationen und verschiedenen Verdünnungen des Primärantikörpers.** Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Bei dem Einsatz von Plasmaproben wurden folgende Blockierlösungen getestet: 1%, 2% und 2,5% Gelatine und 5%, 10% und 20% Magermilch. Bei allen verwendeten Blockierlösungen nahm die Extinktion mit steigender Plasmaverdünnung ab (vgl. Abbildung 21). Die höchsten Extinktionswerte mit einer guten Abstufung bei zunehmender Plasmaverdünnung wurden mit 5% Magermilch erreicht.

Da 5% Magermilch mit Tween[®] 20 insgesamt gute Ergebnisse bei einem niedrigen Hintergrundsignal lieferte und zudem kostengünstig war, wurde sie in dieser Arbeit verwendet.

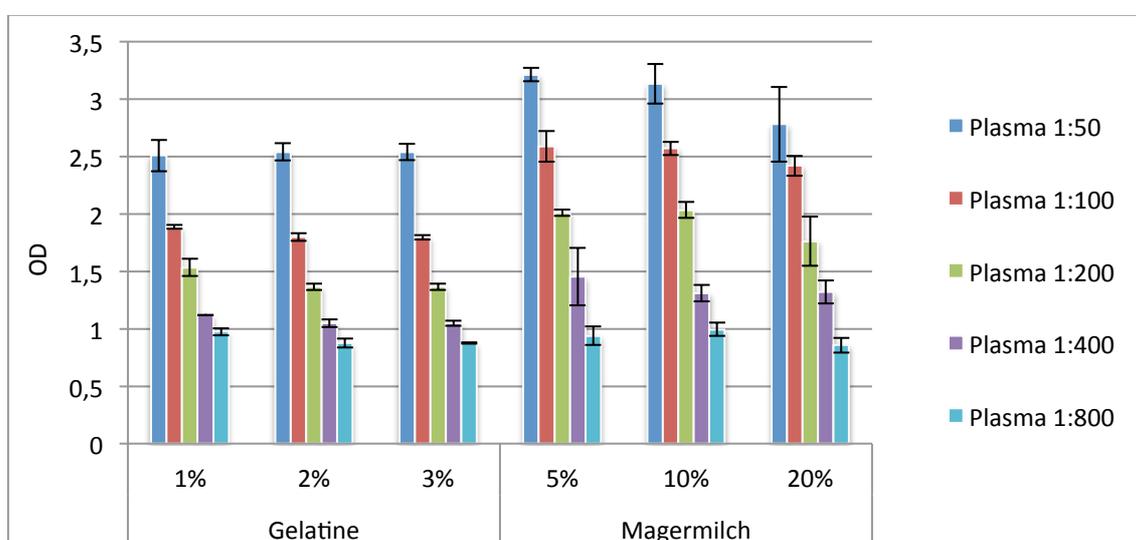


Abbildung 21: **Verschiedene Blockierlösungen mit Magermilch und Gelatine.** Messung von α -Synuclein im Plasma. Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

2.2. Verdünnungspuffer

Es wurden die unter Abschnitt II, 2.5., 2.6. und 2.7. aufgelisteten Verdünnungspuffer für die Standards und Proben sowie Antikörper untersucht.

Mit einem Verdünnungspuffer können Störeffekte durch unspezifische Bindungen, Matrixeffekte und Kreuzreaktionen reduziert oder verhindert werden. Der Verdünnungspuffer mit Tween[®] 20 kann eine Blockierlösung zur Absättigung von freien Bindungsstellen ersetzen.

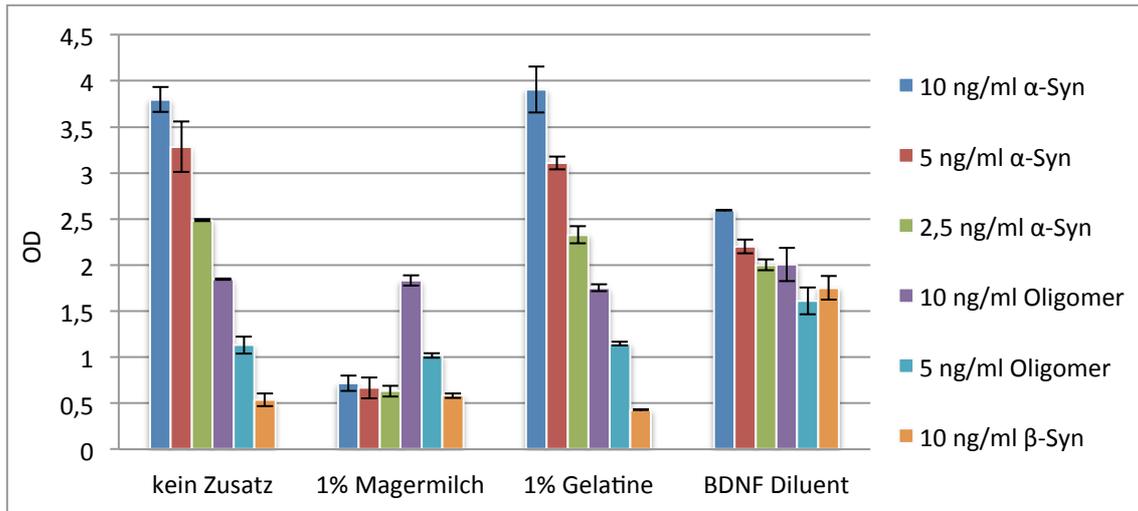


Abbildung 22: **Verschiedene Verdünnungspuffer für Standards und Proben.** Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

In der vorliegenden Arbeit war kein positiver Effekt auf die Sensitivität des ELISA-Tests durch den Einsatz eines Verdünnungspuffers bei Standards und Proben zu beobachten.

Der Verdünnungspuffer TBS/T lieferte mit und ohne 1% Gelatine gleichwertige gute Ergebnisse in Bezug auf Höhe und Linearität der Extinktionswerte (vgl. Abbildung 22) und des Hintergrundsignals (vgl. Abbildung 23). 1% Magermilch und BDNF Diluent führten zu keiner Abstufung der Extinktionswerte, sodass davon auszugehen ist, dass hier spezifische Bindungen blockiert wurden.

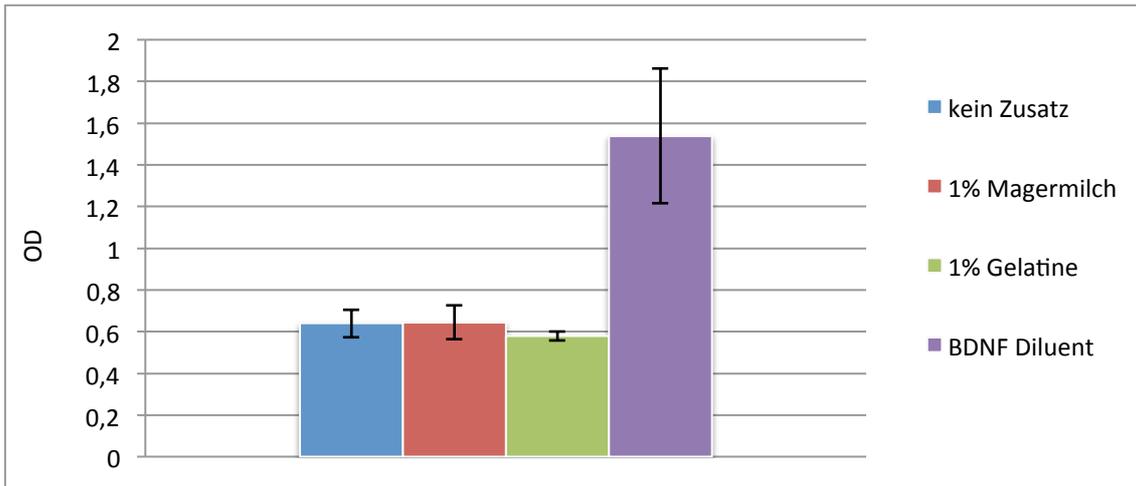


Abbildung 23: **Hintergrundsignal bei verschiedenen Verdünnungspuffern für Standards und Proben.** Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Ähnliche Ergebnisse waren beim Zusatz von Magermilch im Sekundärantikörper zu beobachten (vgl. Abbildungen 24 und 25). Das niedrigste Hintergrundsignal konnte mit TBS/T ohne Zusatz gemessen werden. Die Zugabe von Magermilch zu dem Verdünnungspuffer führte zu keiner Verbesserung der Sensitivität.

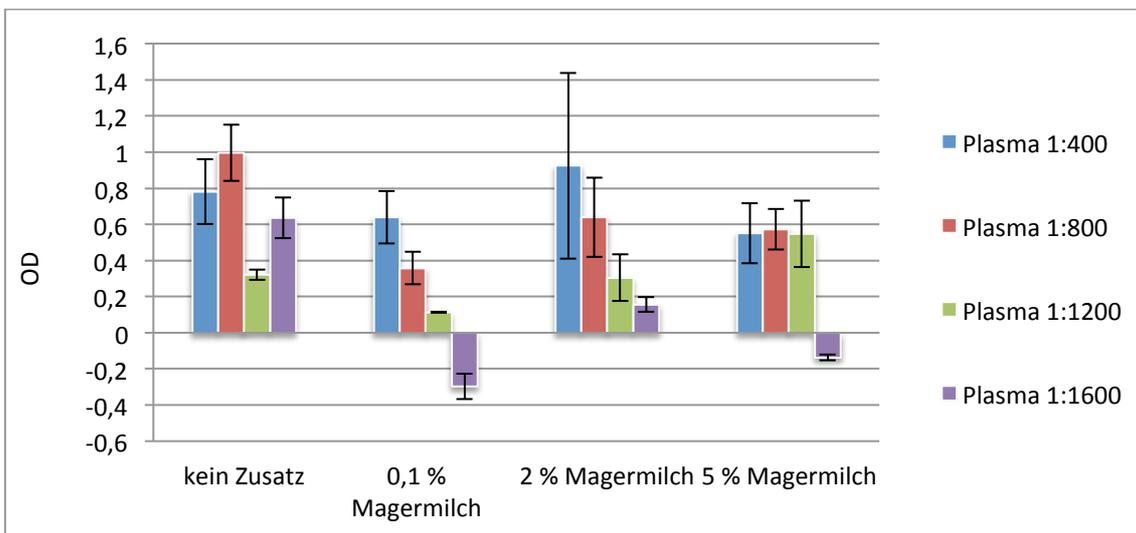


Abbildung 24: **Verdünnungspuffer mit unterschiedlichen Magermilchkonzentrationen im Sekundärantikörper.** Messung von α -Synuclein im Plasma. Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

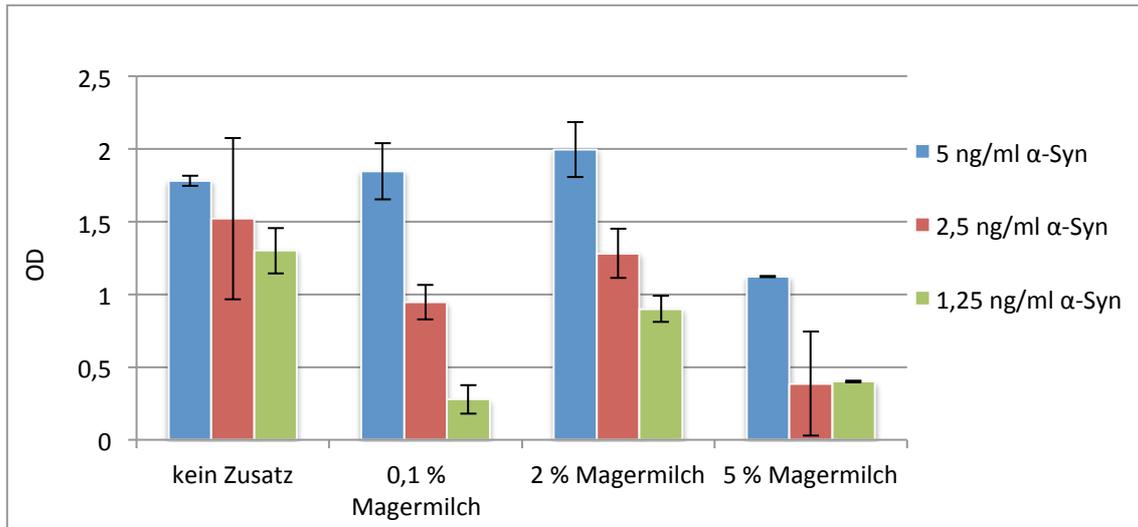


Abbildung 25: **Verdünnungspuffer mit unterschiedlichen Magermilchkonzentrationen im Sekundärantikörper.** Messung von α -Synuclein. Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Die Verwendung von Detergenzien im Verdünnungspuffer beeinflusste den ELISA kaum. Der Zusatz von Tween[®] 20 führte bis einschließlich des getesteten höchsten Zusatzes von 1% zu keinerlei messbaren Veränderungen des Tests. Eine Verbesserung der Sensitivität konnte nicht festgestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Verdünnungspuffer TBS mit 0,3% Tween[®] 20 verwendet.

2.3. Waschpuffer

Durch das Waschen der Mikrotiterplatten werden ungebundene Moleküle entfernt und damit ein niedriges Hintergrundsignal erreicht. Allerdings kann zu intensives Waschen die Sensitivität eines ELISA reduzieren. Als wichtiger Maßstab für die Effektivität des Waschens zählt neben der Höhe auch das Ausmaß der Schwankung der gemessenen Leerwerte. Der verwendete Waschpuffer lieferte mit einer Intraassay-Variabilität von 15,8% geringe OD-Differenzen der Leerwerte. Als Waschlösung wurde in der vorliegenden Arbeit PBS-Puffer mit 0,05% Tween[®] 20 eingesetzt.

3. α -Synuclein-Standards und Proben

3.1. Standardkurve

Unter den letztlich festgelegten Bedingungen des Testverfahrens ergaben die Standardverdünnungen mit den α -Synucleinkonzentrationen 0,78, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25 und 50 ng/ml eine Standardkurve. Anhand der Standardkurve ließen sich die unbekanntes α -Synucleinkonzentrationen der untersuchten Proben ermitteln. Die Plasmaproben mussten so verdünnt werden, dass die gemessenen Extinktionswerte der Proben idealerweise im linearen Bereich der Kurve lagen. Damit war die Auswertung mit nur geringer Anpassung und geringen Konzentrationsfehlern möglich.

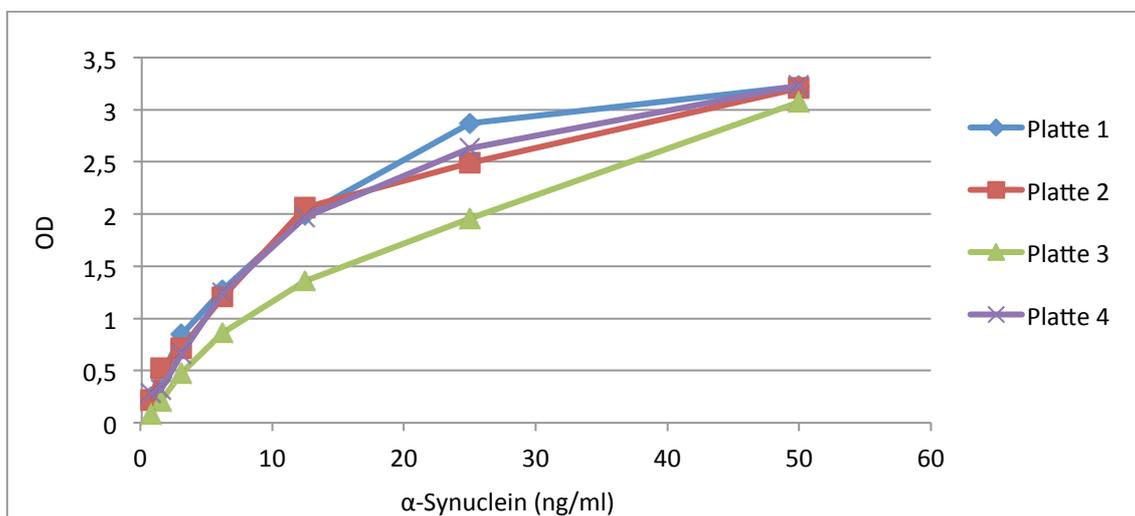


Abbildung 26: **Standardkurve für die Konzentrationsbestimmung von α -Synuclein.** OD-Werte in Abhängigkeit von der α -Synucleinkonzentration. Lineare Darstellung der α -Synucleinkonzentration. Messung von vier Platten in unabhängigen Versuchsdurchführungen zur Bestimmung der Interassay-Variabilität. Dreifachbestimmungen mit Angabe des Mittelwerts.

Die grafische Auftragung der Extinktion gegen die α -Synucleinkonzentration in linearer Darstellung ergibt eine hyperbolische Sättigungskurve (vgl. Abbildung 26). Zum Vergleich ist eine logarithmische Darstellung mit sigmoidalem Kurvenverlauf gewählt (vgl. Abbildung 27). Eine Gleichung zur Auswertung von sigmoidalen Standardkurven ist die 4-Parameter-Funktion, die in unserem Fall verwendet wurde. Es handelt sich um

eine nicht-lineare Funktion, die Messungenauigkeiten ausgleicht und so eine präzise α -Synucleinquantifizierung im Messbereich ermöglicht.

Die verwendete 4-Parameter-Funktion lautet:

$$y = (A-D) / (1 + (x/C)^B) + D$$

x: Konzentration des Analyten

y: Signalintensität

A: maximales Signal (obere Asymptote)

D: minimales Signal (untere Asymptote)

C: Testmittelpunkt (IC50, 50%-Wert)

B: Steigung am Testmittelpunkt

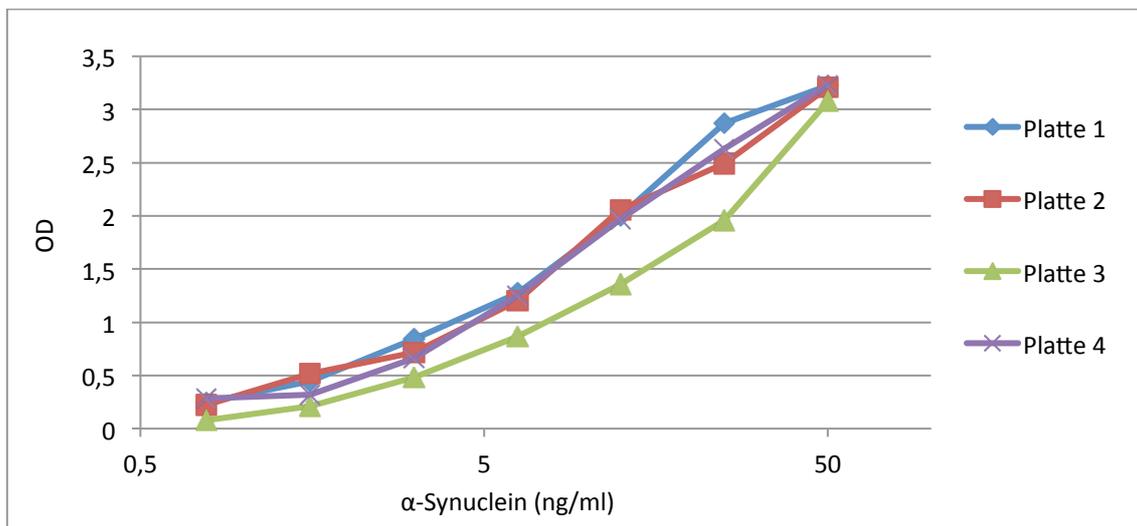


Abbildung 27: **Standardkurve für die Konzentrationsbestimmung von α -Synuclein.** OD-Werte in Abhängigkeit von der α -Synucleinkonzentration in halblogarithmischer Skalierung. Messung von vier Platten in unabhängigen Versuchsdurchführungen zur Bestimmung der Interassay-Variabilität. Dreifachbestimmungen mit Angabe des Mittelwerts.

3.2. Vergleich α -Synuclein-Wildtyp versus Mutante

Es zeigten sich niedrigere Extinktionswerte bei Verwendung des α -Synuclein-Wildtyps im Vergleich zur α -Synuclein-Mutante E46K. Die beiden Standardkurven verliefen

nahezu parallel mit einem linearen Bereich zwischen 1,25 und 15 ng/ml (vgl. Abbildung 28). Die weiteren Versuche wurden mit der α -Synuclein-Mutante E46K durchgeführt.

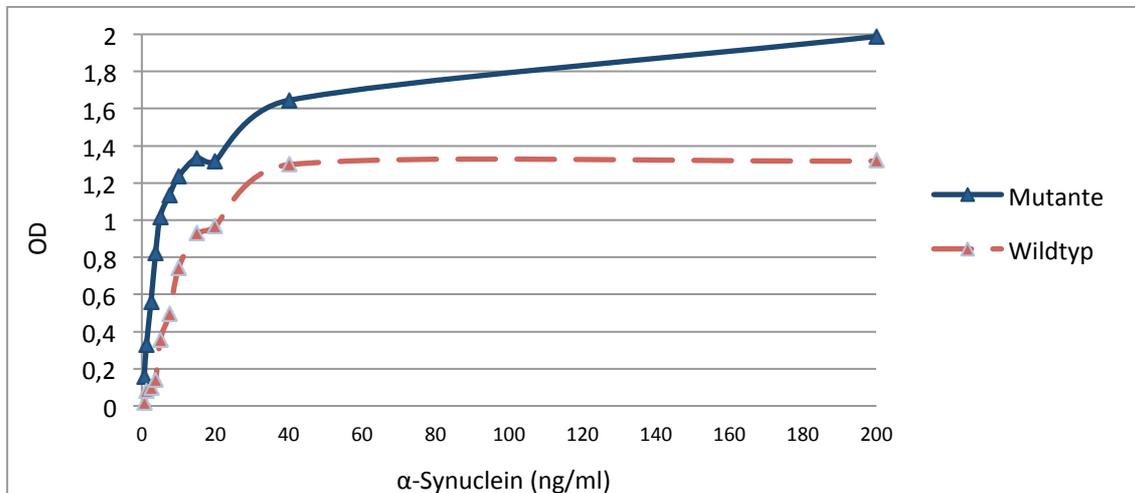


Abbildung 28: Vergleich α -Synuclein-Wildtyp mit α -Synuclein-Mutante E46K. OD-Werte in Abhängigkeit von der α -Synucleinkonzentration. Doppelbestimmungen mit Angabe des Mittelwerts.

3.3. Verdünnung der Proben

Nach Festlegung der Standardkurve konnte die Konzentration der Proben bestimmt werden. Zur Kalkulation wurde die Software Softmax Pro 5.3 verwendet.

Das humane Plasma hat einen Gesamtproteingehalt von 65-80 g/l. α -Synuclein wird nur in geringen Mengen im humanen Plasma gemessen (El-Agnaf et al. 2003). Bei der Messung der α -Synucleinkonzentration im Plasma ist zu berücksichtigen, dass α -Synuclein möglicherweise mit anderen Plasmaproteinen um Bindungsstellen konkurrieren muss und Bindungsstellen unspezifisch besetzt werden.

Anhand der OD-Werte verschiedener Proben wurde eine Plasmaverdünnung von 1:50, 1:100 und 1:200 zum Probenscreening eingesetzt.

4. Auswahl und Verdünnung des Primärantikörpers

Zur Standardisierung des ELISA ist es notwendig, einen geeigneten Primärantikörper in optimaler Konzentration zu finden. Es wurden der anti- $\alpha/\beta/\gamma$ -Synuclein Antikörper und der anti- α/β -Synuclein Antikörper bei der Beschichtung mit dem monoklonalen Antikörper sowie der mouse anti- α -Synuclein Antikörper bei der Beschichtung mit dem polyklonalen Antikörper getestet.

Um falsch positive Signale zu vermeiden, wurde durch das Mitführen geeigneter Kontrollen geprüft, ob der Primärantikörper unspezifisch an die Mikrotiterplatte oder an Plasmaproteine ohne spezifisches Epitop bindet.

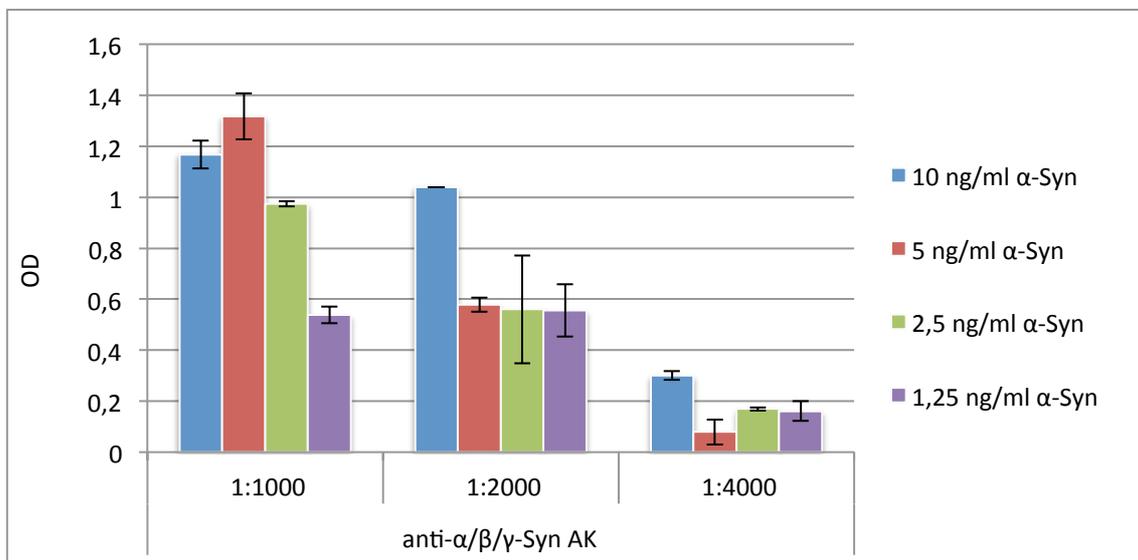


Abbildung 29: **Verschiedene Verdünnungen des Primärantikörpers.** OD-Werte in Abhängigkeit von der Verdünnung des Primärantikörpers. Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Zunächst wurde die optimale Verdünnung des anti- $\alpha/\beta/\gamma$ -Synuclein Antikörpers bestimmt und die Verdünnungen 1:1000, 1:2000 und 1:4000 verglichen. Das geringste Hintergrundsignal wurde bei einer Antikörperverdünnung von 1:2000 gemessen (vgl. Abbildung 30). Eine lineare Abnahme der Extinktionswerte war nur bei einer Verdünnung von 1:1000 zu erkennen (vgl. Abbildung 29). Wurde der

anti- $\alpha/\beta/\gamma$ -Synuclein Antikörper höher verdünnt, war keine Abstufung der Extinktionswerte bei abnehmender α -Synucleinkonzentration mehr erkennbar. Bei diesem Versuch wurden ab einer Verdünnung des Antikörpers von 1:2000 überwiegend unspezifische Bindungen gemessen.

Weitere Versuche ergaben abweichend, dass die höchste Sensitivität bei einer Antikörperverdünnung von 1:2000 erreicht wurde (vgl. Abbildung 20). Dies war auf die Verwendung einer anderen Charge des polyklonalen Antikörpers zurückzuführen.

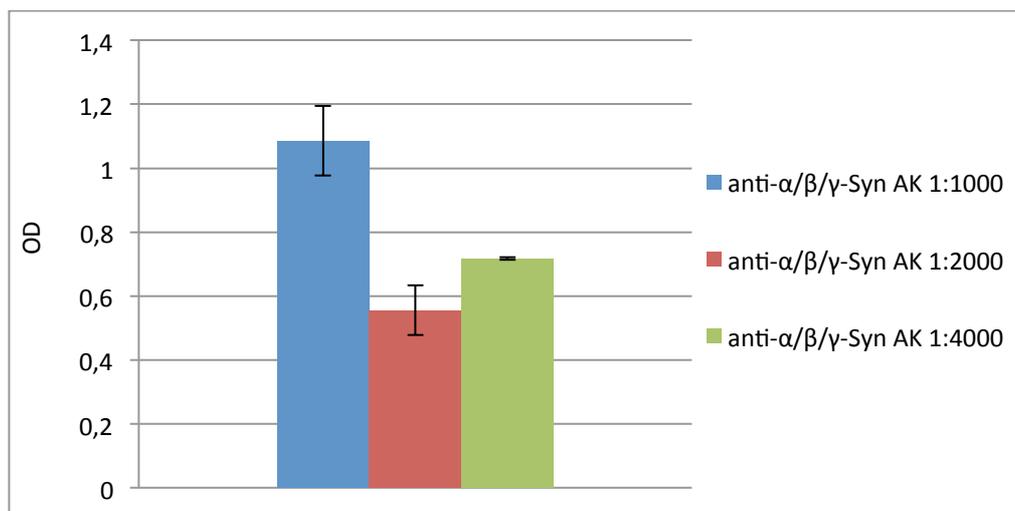


Abbildung 30: **Hintergrundsignal bei verschiedenen Verdünnungen des Primärantikörpers.** Inkubation mit α -Synuclein. Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Ein weiterer Antikörper, der zur Detektion von α -Synuclein untersucht wurde, war der anti- α/β -Synuclein Antikörper, der den N-Terminus von α -Synuclein erkennt. Als Sekundärantikörper wurde bei dieser Testung ein biotinylierter anti-goat-IgG verwendet. Die Abbildung 31 zeigt, dass der anti- α/β -Synuclein Antikörper α -Synuclein nicht nachweisen konnte. Das Hintergrundsignal betrug $2,45 \pm 0,18$.

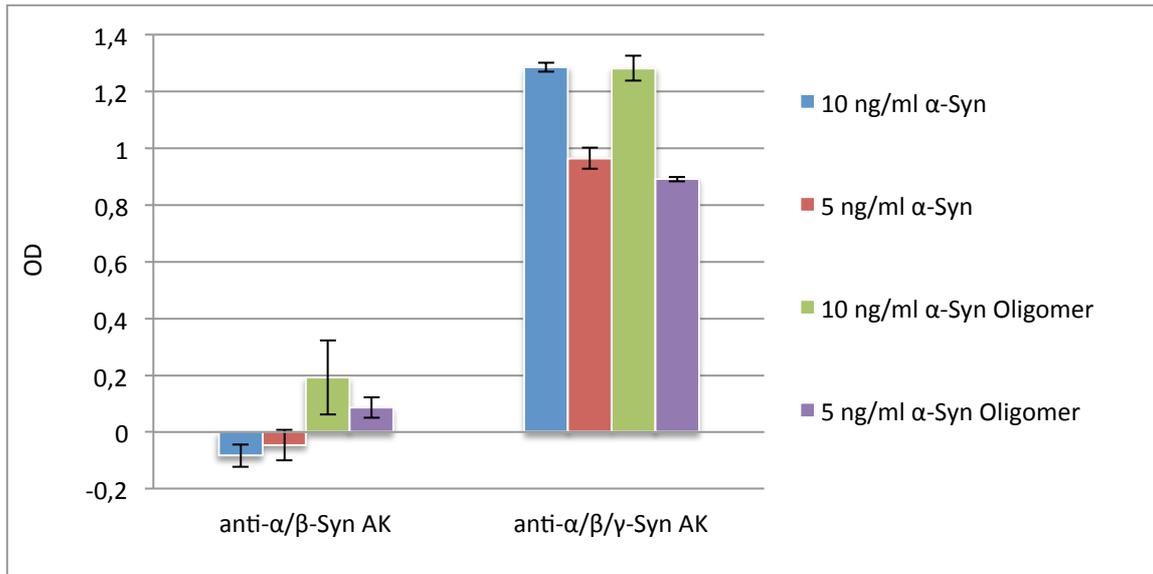


Abbildung 31: **Vergleich zweier Primärantikörper.** Doppelbestimmungen mit Angabe des Mittelwerts.

5. Auswahl und Verdünnung des Sekundärantikörpers

Eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper und ihre Verdünnung ist unter Abschnitt II, 2.7. zu finden.

Als optimal stellte sich bei der Testung der α -Synuclein-Standards eine Verdünnung des Sekundärantikörpers anti-rabbit IgG (whole molecule)-Biotin von 1:10000 heraus (vgl. Abbildungen 32 und 34). Abweichungen führten zu Sensitivitätsverlusten und einem erhöhten Hintergrundsignal (vgl. Abbildung 33).

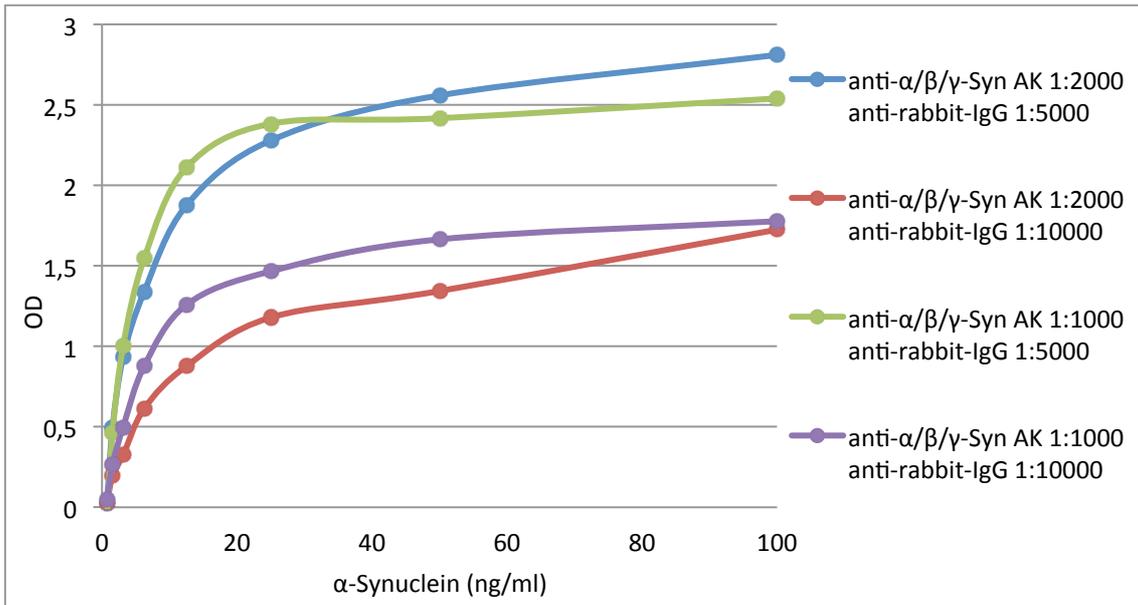


Abbildung 32: **Optimierung der Verdünnung des Primär- und Sekundärantikörpers bei der Messung von α -Synuclein.** OD-Werte in Abhängigkeit von der α -Synucleinkonzentration. Doppelbestimmungen mit Angabe des Mittelwerts.

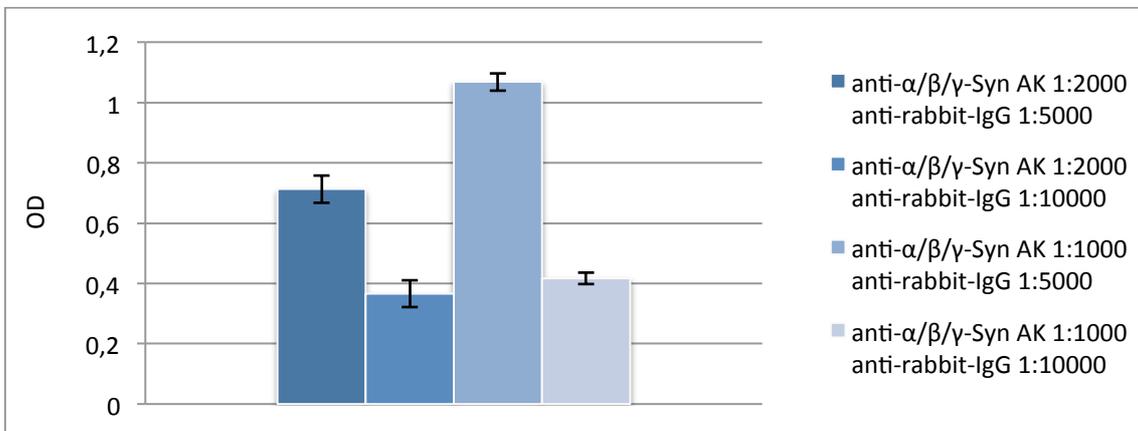


Abbildung 33: **Hintergrundsignal bei verschiedenen Verdünnungen des Primär- und Sekundärantikörpers.** Dreifachbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

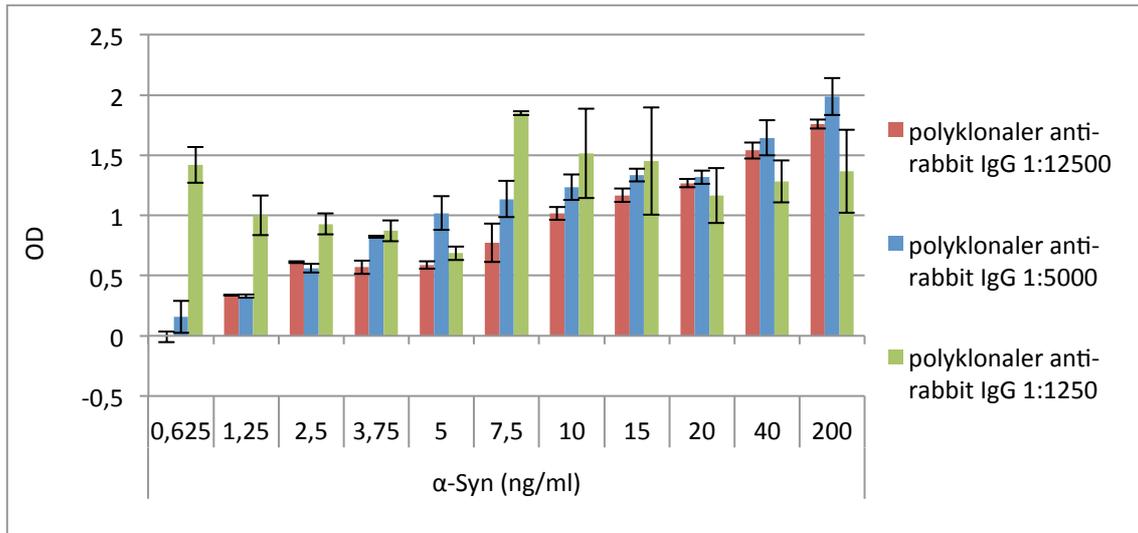


Abbildung 34: **Verschiedene Verdünnungen des polyklonalen anti-rabbit IgG (whole molecule)-Biotin.** OD-Werte in Abhängigkeit von der α -Synucleinkonzentration. Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Die Verdünnung des anti-rabbit IgG (whole molecule)-Biotin auf 1:10000, die bei der Messung von α Synuclein-Standards optimal war, erwies sich für die Untersuchung von Plasmaproben als zu gering konzentriert. Es konnte nur ein unspezifisches Hintergrundsignal gemessen werden. Bei der Messung der Plasmaproben wurde die höchste Sensitivität mit einer Verdünnung von 1:5000 des polyklonalen Sekundärantikörpers erzielt (vgl. Abbildung 35).

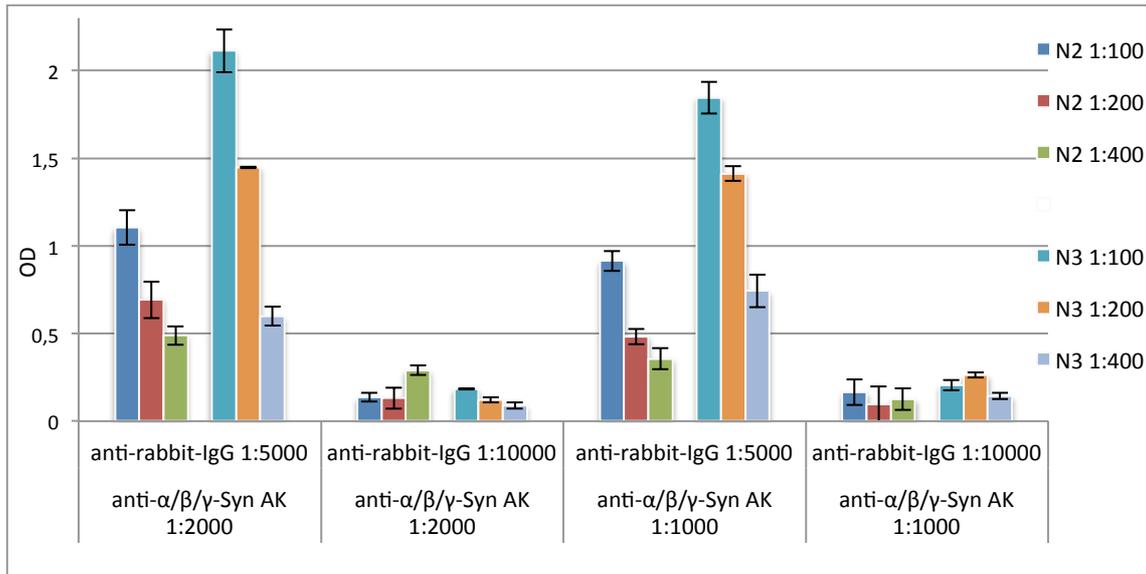


Abbildung 35: **Verdünnung des Primär- und Sekundärantikörpers bei der Messung von Plasma.** Gemessen wurden Plasma N2 und N3. OD-Werte in Abhängigkeit von der α -Synucleinkonzentration. Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Ein weiterer Sekundärantikörper war der monoklonale, biotinylierte anti-rabbit IgG. Es wurden die Antikörperverdünnungen 1:5000, 1:10000 und 1:20000 verglichen.

Der monoklonale anti-rabbit IgG (γ -chain specific)-Biotin lieferte stabile α -Synucleinverdünnungskurven (vgl. Abbildung 36). Die Hintergrundsignale waren mit OD-Werten von 0,26 bis 0,37 niedrig. Je höher die Verdünnung des Antikörpers war, desto niedriger fielen die Hintergrundsignale aus (vgl. Abbildung 37).

Allerdings ließ sich dieses Ergebnis nicht bei der Untersuchung von Plasma reproduzieren. Es wurden fünf verschiedene Plasmen in den Verdünnungen 1:25 bis 1:400 untersucht (nicht dargestellt).

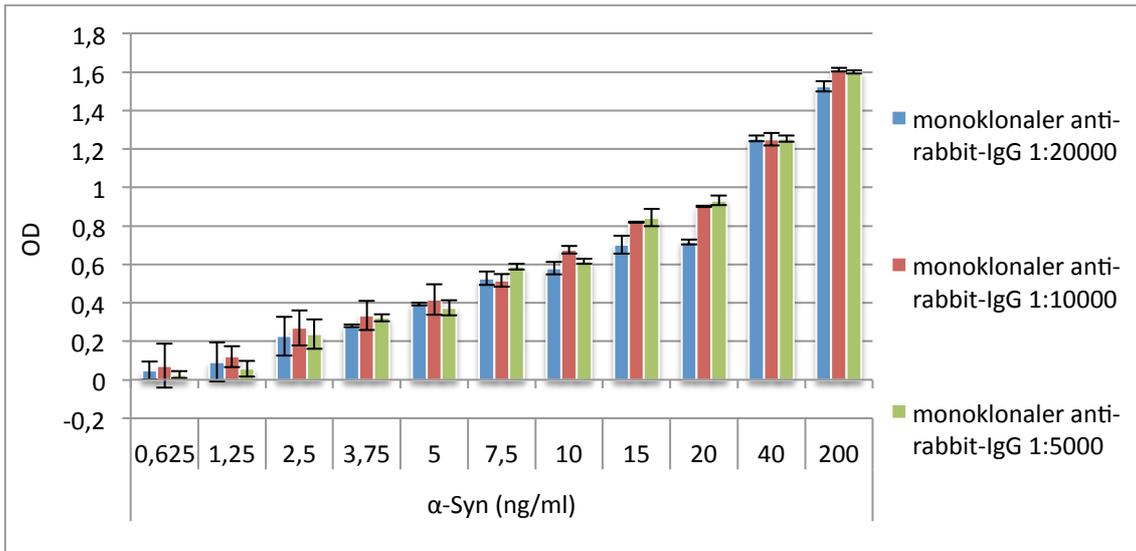


Abbildung 36: **Verschiedene Verdünnungen des monoklonalen anti-rabbit IgG (γ -chain specific)-Biotin.** OD-Werte in Abhängigkeit von der α -Synucleinkonzentration. Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

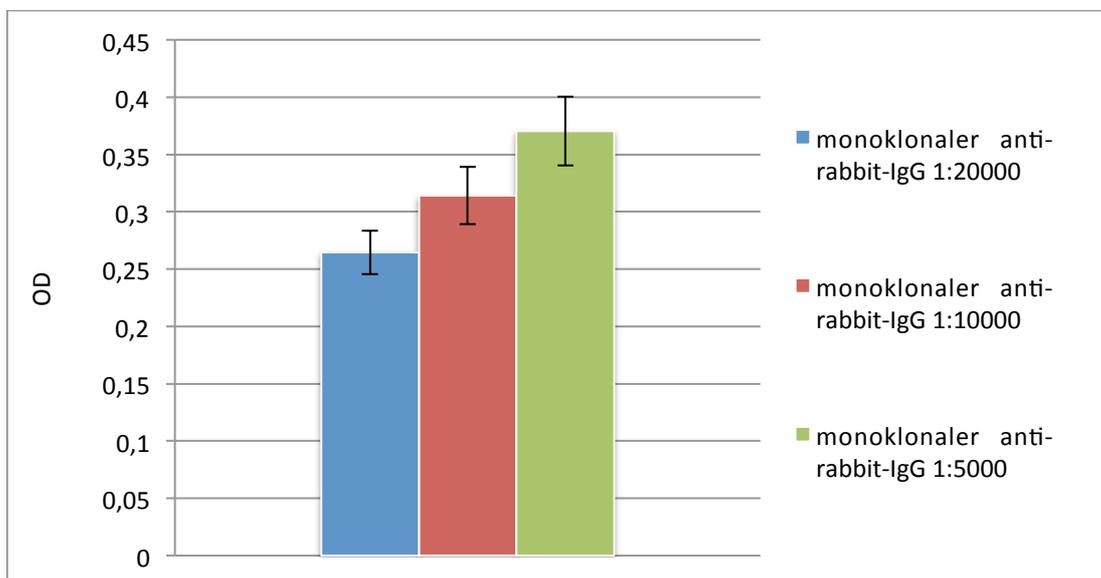


Abbildung 37: **Hintergrundsignal bei verschiedenen Verdünnungen des monoklonalen anti-rabbit IgG (γ -chain specific)-Biotin.** Vierfachbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

6. Amplifizierungssystem

Es wurde versucht, die Bindung des Primärantikörpers an α -Synuclein über einen POD-markierten Sekundärantikörper nachzuweisen. Der anti-rabbit IgG peroxidase-conjugate wurde in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Das Ergebnis waren hohe Hintergrundsignale, verbunden mit einer hohen Nachweisgrenze von α -Synuclein > 50 ng/ml (vgl. Abbildung 38).

Eine verbesserte Sensitivität des ELISA wurde mit einem Amplifizierungssystem erreicht. Hierbei war der Sekundärantikörper mit Biotin markiert. Anschließend wurde ein Streptavidin-POD-Komplex zugegeben. Streptavidin besitzt vier hochaffine Bindungsstellen für Biotin. Auf diese Weise konnte mehr Substrat (TMB) umgesetzt und die Nachweisgrenze verbessert werden (vgl. Abbildung 32).

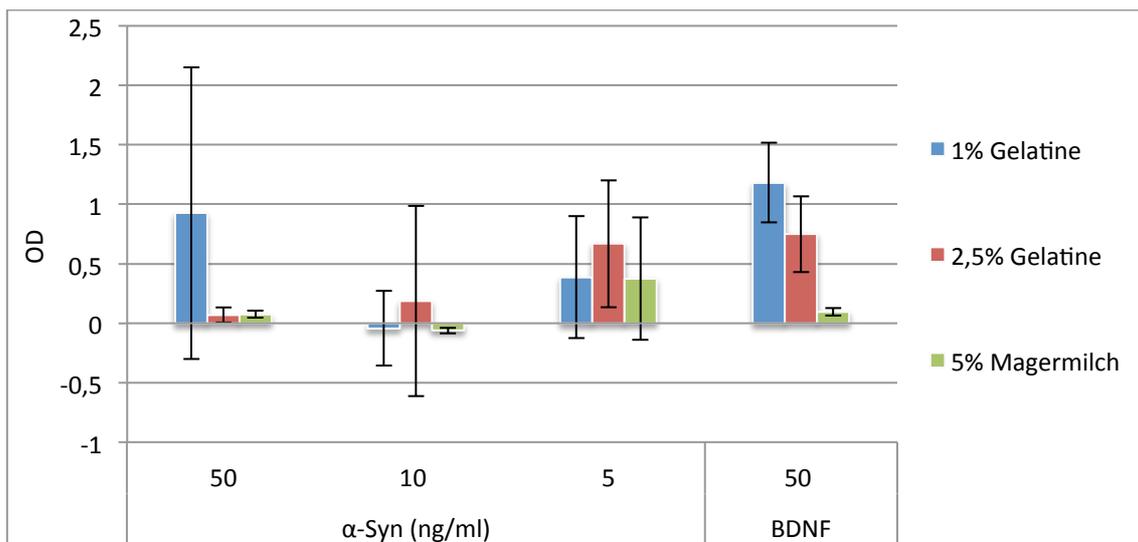
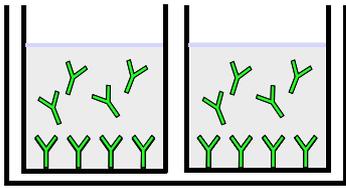
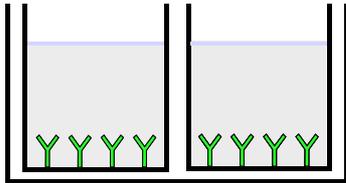


Abbildung 38: **POD-markierter Sekundärantikörper (anti-rabbit IgG peroxidase-conjugate) 1:5000 mit unterschiedlichen Blockierlösungen.** OD-Werte in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration. Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

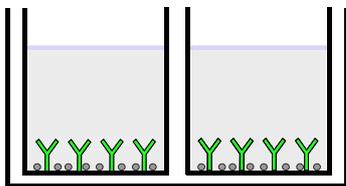
7. α -Synuclein-Nachweis unter den festgelegten Testbedingungen



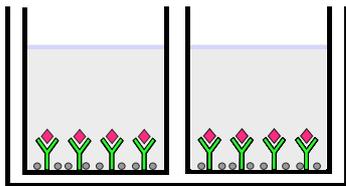
Beschichtung mit mouse anti- α -Synuclein Antikörper
(1 μ g/ml) in Bikarbonatpuffer (pH 9,6)
Inkubation über Nacht (18-24 h), 4 °C



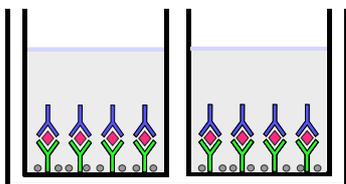
3 x waschen mit 300 μ l Waschpuffer
(PBS, 0,5% Tween[®] 20)



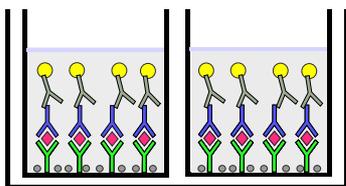
Blockierung mit 5% Magermilch in PBS mit 0,3%
Tween[®] 20
Inkubation über 75 min, RT



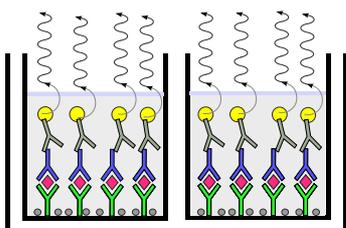
Inkubation mit Antigen in TBS mit 0,3% Tween[®] 20
über 4 h, RT. 5 x waschen.



Inkubation mit anti- $\alpha/\beta/\gamma$ -Synuclein Antikörper
1:2000 in TBS mit 0,3% Tween[®] 20 über 1,5 h, RT.
5 x waschen.



Inkubation mit anti-rabbit IgG (whole
molecule)-Biotin 1:5000 in TBS mit 0,3% Tween[®] 20
über 75 min, RT. 5 x waschen.



Inkubation mit Streptavidin-POD 1:5000
über 35 min, RT. 4 x waschen. Dann Substratzugabe
(TMB) und Detektion.

Abbildung 39: α -Synuclein-Nachweis unter den festgelegten Testbedingungen (Quelle: eigene Darstellung)

8. Validierung des ELISA

In der vorliegenden Arbeit wurde der ELISA zur Messung von α -Synuclein in Plasmaproben anhand folgender Parameter validiert:

- Sensitivität und Spezifität
- Intra- und Interassay-Variabilität
- Genauigkeit (Wiederfindung und Verdünnungslinearität)

8.1. Sensitivität

Für die quantitative Auswertung des ELISA wurde jeweils eine Standardkurve mittels der 4-Parameter-Funktion erstellt (vgl. Abschnitt II, 4.1.). Die Probenwerte sollten im messbaren, das bedeutet linearen Bereich der Standardkurve und oberhalb der Nachweisgrenze liegen. Um eine ausreichende Validierung zu gewährleisten, musste die Standardkurve mindestens sechs Probenwerte – ausgenommen des Leerwertes – enthalten (Hartmann et al. 1994).

Die Sensitivität beruht hauptsächlich auf der Affinität des Antikörpers zum Analyten und der Anzahl der möglichen Antikörperbindungsstellen. Zur Abschätzung der Sensitivität eines ELISA kann der Testmittelpunkt herangezogen werden, der die Lage der sigmoidalen Kurve auf der Konzentrationsachse beschreibt und mit der Affinität korreliert.

In Abbildung 40 zeigt die Standardkurve einen errechneten Testmittelpunkt von $C = 11,48$ ng/ml α -Synuclein. Um den Testmittelpunkt im annähernd linearen Verlauf der Standardkurve ist die Bestimmung unbekannter α -Synucleinkonzentrationen optimal.

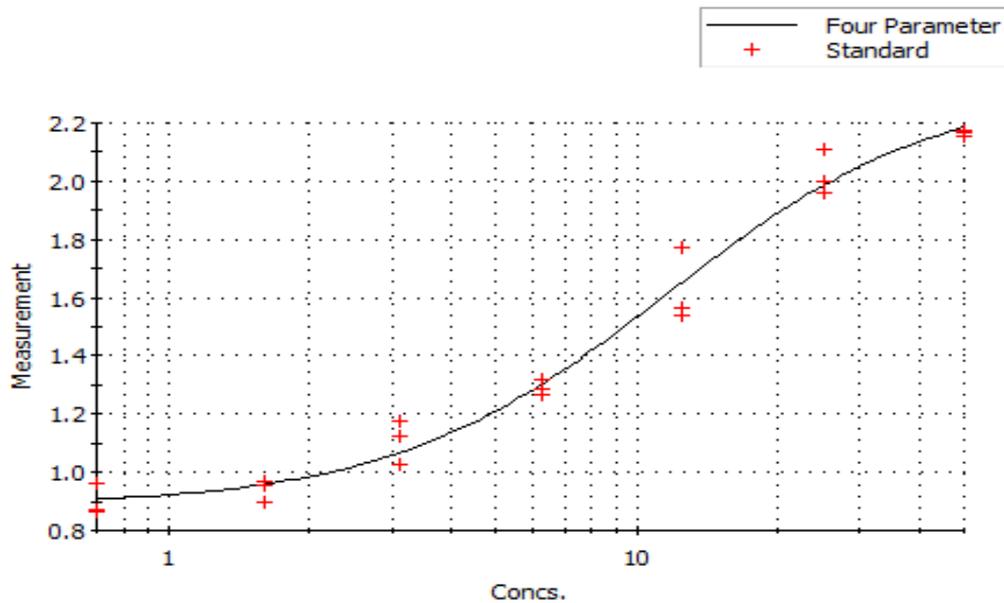


Abbildung 40: **Repräsentative Standardkurve in halblogarithmischer Darstellung unter den optimierten ELISA-Bedingungen.** Dreifachbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

Neben dem Testmittelpunkt ist die Nachweisgrenze ein weiteres Kriterium für die Sensitivität des ELISA. Die Nachweisgrenze (LOD, limit of detection) kann mit verschiedenen Methoden ermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde sie nach DIN 32645 (Deutsches Institut für Normung) als Mittelwert des Nullwertes zuzüglich dreier Standardabweichungen berechnet. Die Nachweisgrenze gibt den geringsten Konzentrationswert von α -Synuclein an, der mit einer ausreichenden statistischen Wahrscheinlichkeit noch nachgewiesen werden kann. Für die Sensitivität des ELISA ergab sich ein Wert von 1,37 ng/ml als untere Nachweisgrenze (vgl. Abbildung 40). Der Nullwert ist in 20facher Bestimmung angegeben.

Tabelle 5: **Nachweisgrenze des ELISA**

Probe	α -Synuclein Mittelwert (OD)	Standardabweichung (OD)	Nachweisgrenze (OD)	Nachweisgrenze (ng/ml)
Nullwert (n = 20)	0,490	0,152	0,944	1,37 ng/ml

Ziel war es, die Messbedingungen so zu optimieren, dass die erforderliche Empfindlichkeit des ELISA mit einer niedrigen Nachweisgrenze und einem niedrigen Testmittelpunkt erreicht wurde.

8.2. Intra- und Interassay-Variabilität

Um ein Messverfahren zu validieren, werden verschiedene Methoden eingesetzt. Eine davon ist die Bestimmung der Intra- und Interassay-Variabilität. Die Intraassay-Variabilität prüft, ob bei wiederholten Messungen von Plasmaproben im Zuge eines Versuchsdurchlaufs die Werte reproduziert werden können. Zur Ermittlung der Interassay-Variabilität werden die Plasmaproben auf verschiedenen ELISA-Platten gemessen. Jede Platte führt ihre Standardprobe in einer Verdünnungsreihe mit, anhand derer eine Standardkurve erstellt und die α -Synucleinkonzentration der Proben quantifiziert werden kann.

Dabei dient der Variationskoeffizient (VK) als relatives Maß für die Streuung der gemessenen Werte. Er bildet sich aus dem Quotienten von Standardabweichung und Mittelwert und wird in Prozent angegeben.

$$VK = s / X \cdot 100\%$$

VK: Variationskoeffizient (relative Streuung)

s: Standardabweichung

X: arithmetischer Mittelwert

Zur Validierung einer bioanalytischen Methode sollte der VK nicht größer als 15% sein (Karnes et al. 1991). Der Intraassay-VK wurde in der vorliegenden Arbeit durch mehrfache Messungen von 95 verschiedenen Plasmaproben (1:50, 1:100 oder 1:200 verdünnt) in Doppelbestimmungen ermittelt. Die Intraassay-Variabilität des Tests betrug 15,8% (n = 95).

Die Bestimmung des Interassay-VK erfolgte durch Messung von drei unterschiedlichen Proben (1:100 verdünnt) auf vier verschiedenen ELISA-Platten. Mit einem Wert von 22,4% (n = 4) lag die Interassay-Variabilität nicht im angestrebten Rahmen unter 15%.

8.3. Wiederfindung

Eine weitere wichtige Methode zur Bestimmung der Messgenauigkeit eines ELISA ist die Wiederfindung. Diese beschreibt das Verhältnis zwischen dem Messwert und der theoretisch erwarteten Analytkonzentration der Probe und wird wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{gemessene Konzentration (Plasmaverdünnung mit Antigenzusatz)}}{\text{theoretische Konzentration (Plasmaverdünnung und Antigenzusatz)}}$$

Die Wiederfindungsrate wird in Prozent angegeben. Im Idealfall liegt sie bei 100% und entspricht damit einer vollständigen Übereinstimmung der Erwartungs- und Messwerte. Der Toleranzbereich erstreckt sich auf Werte von +/- 25%.

Unterschiedliche Mengen an α -Synuclein wurden dem Verdünnungspuffer und den Plasmaverdünnungen (1:300 und 1:600) zugegeben und anschließend mittels ELISA gemessen. Die Extinktionswerte wurden quantifiziert und mit dem Erwartungswert verglichen.

Die mittlere Wiederfindung für alle Konzentrationen betrug 115% (vgl. Abbildung 41) und lag somit innerhalb der angestrebten Spannbreite von 75% bis 125%. Bei einer Verdünnung von 1:300 wurde eine Wiederfindung von 126% und bei einer Verdünnung von 1:600 eine Rate von 105% errechnet.

Insgesamt lag die Wiederfindung mit 115% (n = 12) im oberen Zielbereich, zeigte aber zugleich, dass mehr α -Synuclein gemessen wurde als theoretisch erwartet.

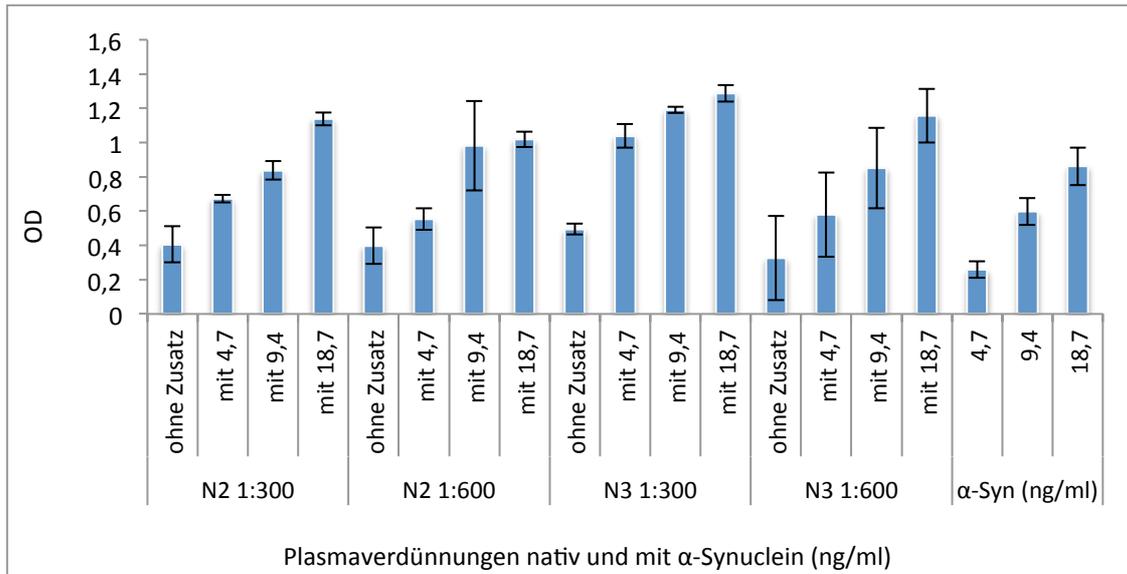


Abbildung 41: **Wiederfindung von α -Synuclein.** Plasmen N2 und N3 in den Verdünnungen 1:300 und 1:600 wurden mit jeweils drei definierten Konzentrationen von α -Synuclein versetzt. Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

8.4. Kreuzreaktivität

Ein wichtiger Faktor für die Spezifität eines ELISA ist neben der Affinität des Antikörpers zum Analyten die Kreuzreaktivität des Antikörpers zu anderen Plasmaproteinen. Mit Kreuzreaktion bezeichnet man das unspezifische Binden eines Antikörpers an ein anderes Molekül als den Analyten. Diese Bindung beruht auf gleichen oder ähnlichen Epitopen verschiedener Antigene und ist meist von geringerer Affinität. Dadurch kann bereits eine Verlängerung der Inkubationszeit das Hintergrundsignal, welches durch Kreuzreaktivität verursacht wird, reduzieren. Auch die Anwendung von Detergenzien kann niedrig-affine Interaktionen minimieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden Standards von β -Synuclein (10 ng/ml) und BDNF (50 ng/ml) inkubiert. Die eingesetzten Substanzen führten im untersuchten Konzentrationsbereich nicht zu falsch positiven Ergebnissen und zeigten somit keine Kreuzreaktion.

9. Stabilität von α -Synuclein-Standards

α -Synuclein liegt im nativen Zustand ungefaltet vor. In vitro kann α -Synuclein abhängig von bestimmten Milieubedingungen (hohe Temperaturen, niedriger pH-Wert), erhöhten α -Synucleinkonzentrationen, gering konzentrierten organischen Lösungsmitteln, Metallionen und Pestiziden verschiedene Konformationen einnehmen (Hashimoto et al. 1998, Hoyer et al. 2002, Uversky et al. 2001b, Uversky 2007, Munishkina et al. 2003). Die Konformationsänderung in partiell gefaltete Proteine ist komplett reversibel (Uversky et al. 2001b). Werden α -Synuclein-Aggregationsintermediate über einen längeren Zeitraum bei hohen Temperaturen inkubiert, bilden sich α -Synuclein-Oligomere (Uversky et al. 2001a).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Oligomerbildung von α -Synuclein zeit- und temperaturabhängig untersucht. Standards von α -Synuclein wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (5, 10 und 20 ng/ml in TBS/T) bei 37 °C und 50 °C für drei Tage im Wasserbad-Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Proben mittels des etablierten ELISA unter den in Abschnitt III, 7. aufgeführten, festgelegten Testbedingungen.

Die höchsten Extinktionswerte wurden bei frisch gelöstem α -Synuclein gemessen (vgl. Abbildung 42). Im Vergleich ergab die Messung von präinkubiertem α -Synuclein bei Temperaturen von 37 °C und 50 °C innerhalb von drei Tagen einen Abfall der α -Synucleinkonzentration im Durchschnitt um 41% bei 37 °C und 43% bei 50 °C.

Der verwendete Beschichtungsantikörper Syn211 und der Primärantikörper F-140 erkennen α -Synuclein-Monomere und -Oligomere (El-Agnaf et al. 2006, El-Agnaf 2014). Es zeigte sich, dass mit dem entwickelten ELISA neben der monomeren auch die oligomere Form gemessen werden konnte. Eine genaue Quantifizierung und Unterscheidung zwischen α -Synuclein-Monomeren und -Oligomeren war mithilfe des entwickelten ELISA und anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich.

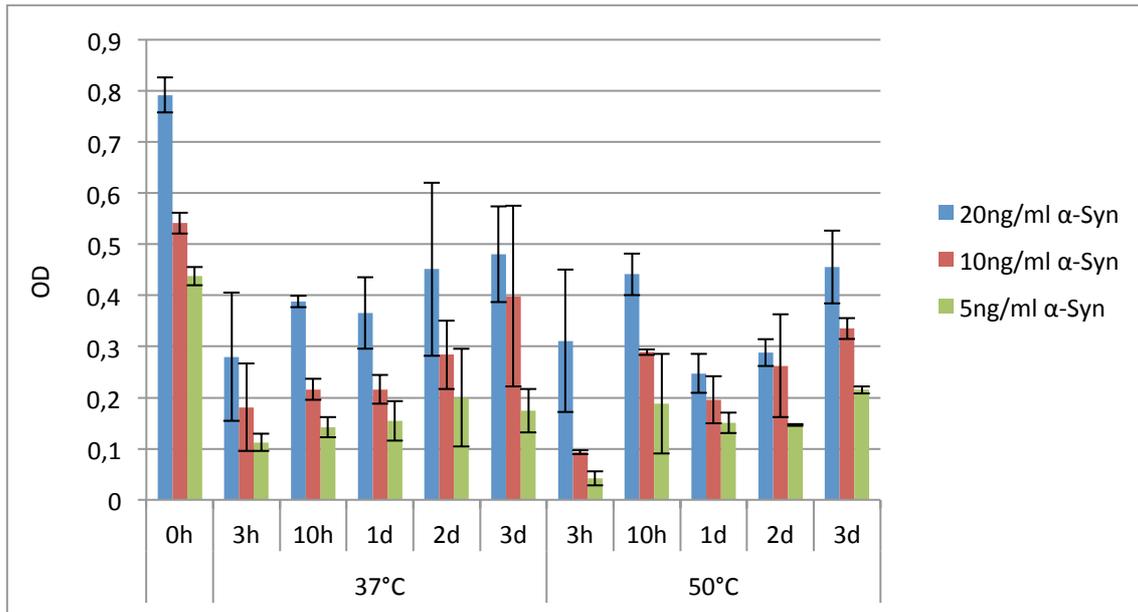


Abbildung 42: **Abnahme der α -Synucleinkonzentration in Standards bei Präinkubation.** Messung der Proben mittels ELISA unter festgelegten Bedingungen nach einer Inkubationszeit von bis zu drei Tagen bei 37 °C und 50 °C. Doppelbestimmungen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

10. Messergebnisse von α -Synuclein im Plasma

10.1. Demografische Daten

10.1.1. Normalkollektiv

Es wurden 95 Probanden (13 weiblich, 82 männlich) aus dem Normalkollektiv verglichen.

Tabelle 6: **Demografische Daten der Probanden.** Angabe des Alters mit MW \pm SD und Median; w = weiblich, m = männlich, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Anzahl	Alter (MW \pm SD)	Alter (Median) w/m	Anzahl w/m
95	42,9 \pm 13,8	40/42	13/ 82

Im Median waren die männlichen Probanden älter als die weiblichen Probanden. Bei den männlichen Probanden war bezüglich des Alters eine breitere Streuung zu sehen (vgl. Abbildung 43).

Die Daten wurden grafisch als Boxplot dargestellt. Dies ermöglicht einen visuellen Überblick über die Streuung der Werte einer Stichprobe. Der Median ist durch eine horizontale schwarze Linie innerhalb der Box gekennzeichnet (Wollschläger 2010). Die untere Grenze der Box befindet sich auf Höhe des ersten Quartils, die obere Grenze auf Höhe des dritten Quartils. Innerhalb der Box liegen die mittleren 50% der Daten. Oberhalb und unterhalb der Box erstrecken sich dünne Striche (engl. whiskers), die das 10%- und das 90%-Quantil begrenzen.

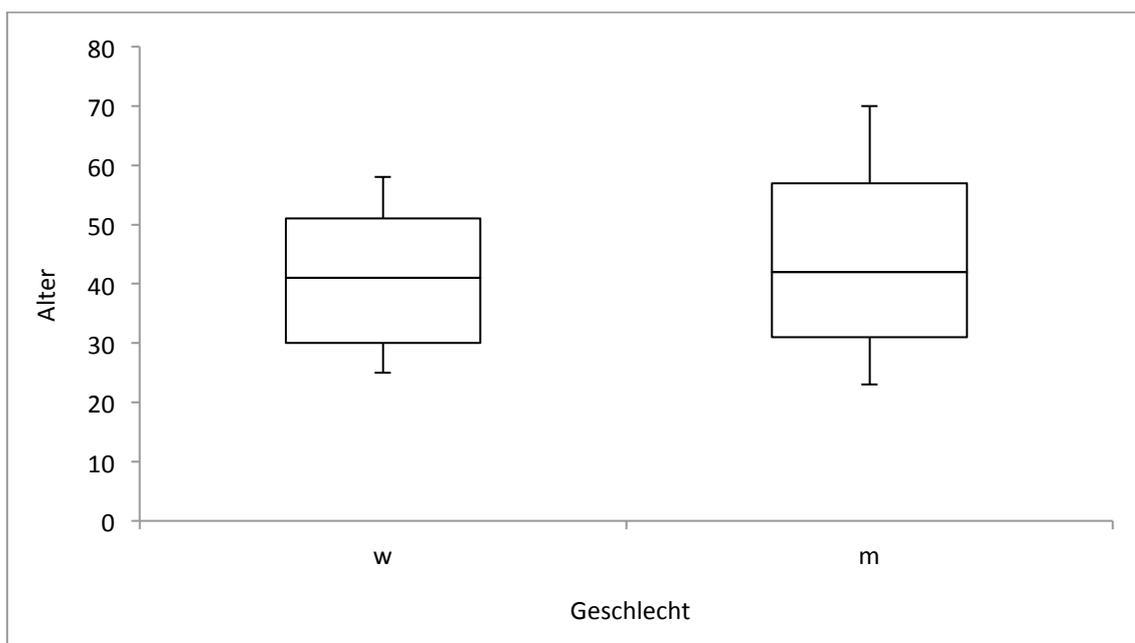


Abbildung 43: Alter nach Geschlecht beim Normalkollektiv; w = weiblich, m = männlich.

10.1.2. Patientenkollektiv

Die Plasmaproben von 10 Patienten mit AD, 10 Patienten mit DLB und 10 gesunden Kontrollprobanden im Alter zwischen 51 und 85 Jahren wurden getestet. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die demografischen Daten des Patientenkollektivs.

Tabelle 7: **Demografische Daten und α -Synucleinkonzentration im Plasma der DLB- und AD-Gruppe und der gesunden Kontrollpatienten.** Angabe der Daten mit MW, SD und Median; J = Jahre, w = weiblich, m = männlich, MW = Mittelwert, Syn = Synuclein, SD = Standardabweichung, AD = Patienten mit Alzheimer-Demenz, DLB = Patienten mit Lewy-Körperchen-Demenz.

	Gesunde Kontrollen	AD	DLB
Anzahl	10	10	10
Geschlecht (m/w)	2/8	1/9	7/3
Alter (J), MW (Median) \pm SD	67,9 (65) \pm 24,6	64,9 (64) \pm 20,7	75,7 (75) \pm 8,1
α -Syn (ng/ml), MW (Median) \pm SD	4,03 (2,25) \pm 3,93	6,93 (7,44) \pm 3,83	9,29 (4,16) \pm 14,70

Hinsichtlich des Alters ergab der Tukey-Test keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und der AD-Gruppe ($p = 0,76$), der DLB- und der AD-Gruppe ($p = 0,83$) und der DLB- und der Kontrollgruppe ($p = 0,41$).

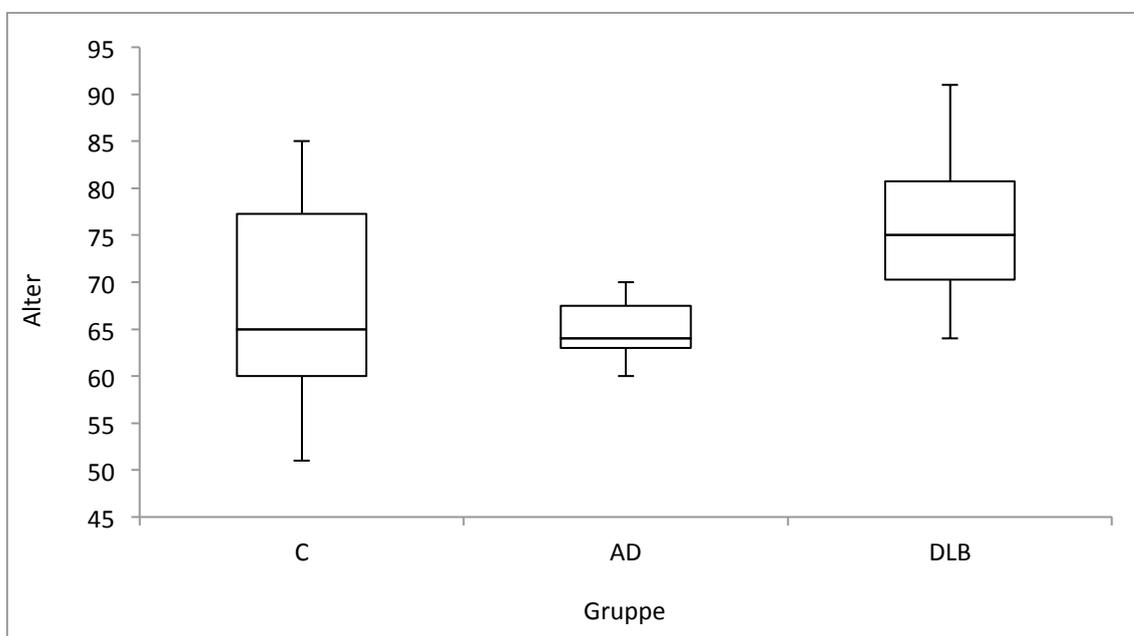


Abbildung 44: **Alter nach diagnostischer Gruppe beim Patientenkollektiv;** C = gesunde Kontrollpatienten, AD = Patienten mit Alzheimer-Demenz, DLB = Patienten mit Lewy-Körperchen-Demenz.

10.2. Messergebnisse und statistische Auswertung

Mit dem Ziel, die Spezifität und Sensitivität des ELISA zu verbessern, wurden verschiedene Optimierungsversuche ausgetestet und die Durchführung des ELISA entsprechend modifiziert. Die Plasmaproben kamen in einer Verdünnung von 1:50, 1:100 und 1:200 zum Einsatz, sodass die Messwerte im linearen Kurvenverlauf um den Testmittelpunkt (11,48 ng/ml) und oberhalb der Nachweisgrenze (1,37 ng/ml) lagen.

Die Mediane und Mittelwerte der α -Synucleinkonzentration im Plasma sind in den Tabellen 7 und 8 dargestellt. Um die weiblichen und männlichen Probanden im Normalkollektiv und die DLB-, AD- und Kontrollgruppe miteinander vergleichen zu können, wurde der Tukey-Test angewendet. Die statistische Berechnung erfolgte mit Hilfe des Open-Source-Programms R 3.0.1. Unterschiede zwischen Stichproben wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 5% betrug ($p < 0,05$).

11.2.1. Normalkollektiv

Um den Plasmaspiegel von α -Synuclein im Normalkollektiv zu bestimmen, wurden innerhalb einer Versuchsdurchführung 95 Plasmaproben in Doppelbestimmungen in die Wells von vier Mikrotiterplatten pipettiert und mittels ELISA untersucht. Zur Überprüfung der Intra- und Interassay-Variabilität wurden auf jeder Platte eine Standardverdünnungsreihe, drei Leerwerte und drei Referenzproben (N1, N2, N3) mitgeführt. Aus der Differenz der Extinktionswerte von Probe und Leerwert ergab sich mithilfe der Standardkurve die α -Synucleinkonzentration der Proben.

Tabelle 8: **α -Synucleinkonzentration im Plasma des Normalkollektivs**. Angabe der Daten mit MW, SD und Median; w = weiblich, m = männlich, MW = Mittelwert, Syn = Synuclein, SD = Standardabweichung.

Geschlecht	Anzahl	α -Syn (ng/ml), MW (Median) \pm SD
w	13	2,46 (2,35) \pm 1,36
m	82	4,42 (2,43) \pm 9,82

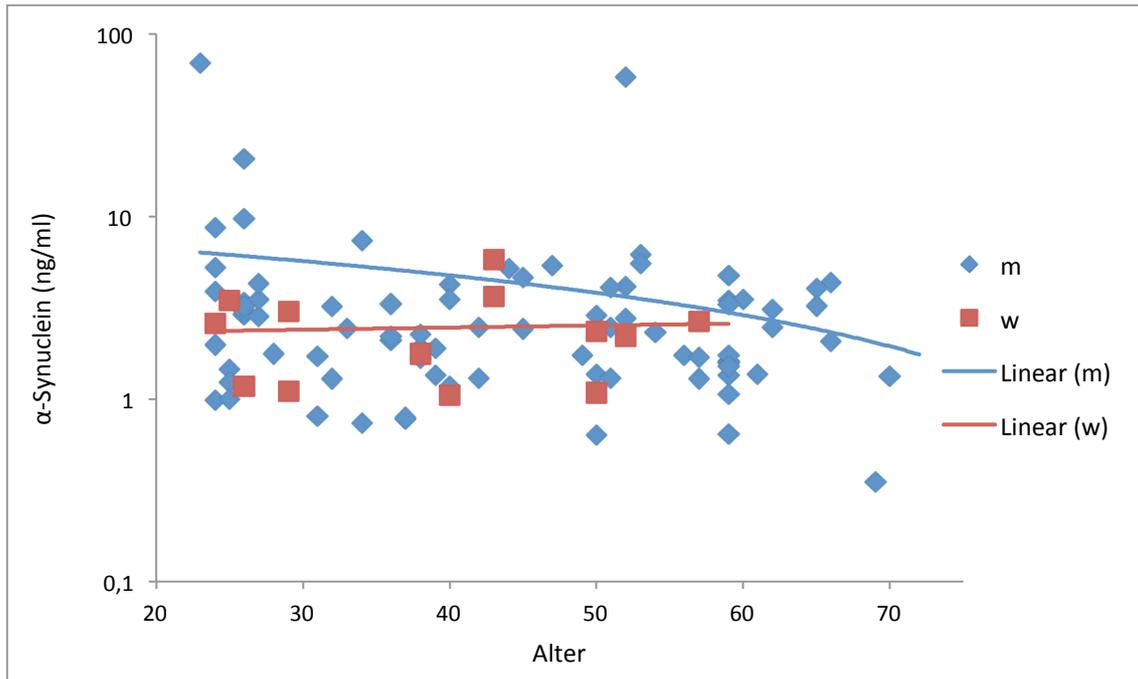


Abbildung 45: **Alter und α -Synucleinkonzentration im Plasma beim Normalkollektiv;** lineare Trendlinie für männliche und weibliche Probanden; w = weiblich, m = männlich.

Da die ermittelten Daten nicht normalverteilt waren, wurde die Korrelation nach der Spearman-Korrelation berechnet.

Dabei konnte festgestellt werden, dass die α -Synucleinkonzentration im Plasma des Normalkollektivs weder bei allen Probanden ($p = 0,73$) noch bei den männlichen Probanden ($p = 0,35$) oder den weiblichen Probanden ($p = 0,37$) vom Alter abhing.

Der Median für die α -Synucleinkonzentration war bei den männlichen Probanden (2,43 ng/ml) höher als bei den weiblichen Probanden (2,35 ng/ml).

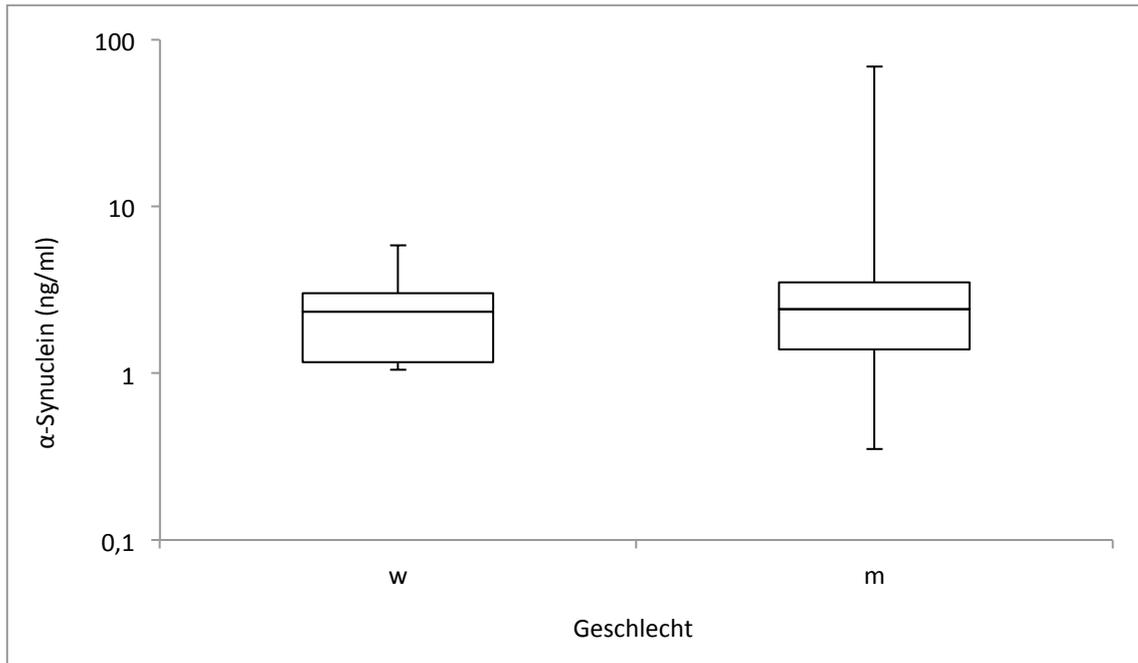


Abbildung 46: α -Synucleinkonzentration nach Geschlecht beim Normalkollektiv; w = weiblich, m = männlich.

11.2.2. Patientenkollektiv

Analog zur Messung des Normalkollektivs wurde die Plasmakonzentration von α -Synuclein im Patientenkollektiv bestimmt. Der Vergleich der α -Synucleinkonzentration im Plasma der diagnostischen Gruppen erfolgte anschließend mit dem Tukey-Test. Obwohl sich bei den gesunden Kontrollpatienten ($2,25 \text{ ng/ml} \pm 3,93$) eine niedrigere Plasmakonzentration von α -Synuclein als bei den Patienten mit AD ($6,93 \text{ ng/ml} \pm 3,83$, $p = 0,756$) und DLB ($9,20 \text{ ng/ml} \pm 14,70$, $p = 0,408$) ergab, war dieser Unterschied nicht signifikant. Es konnte auch kein signifikanter Unterschied zwischen den AD- und DLB-Patienten festgestellt werden ($p = 0,831$).

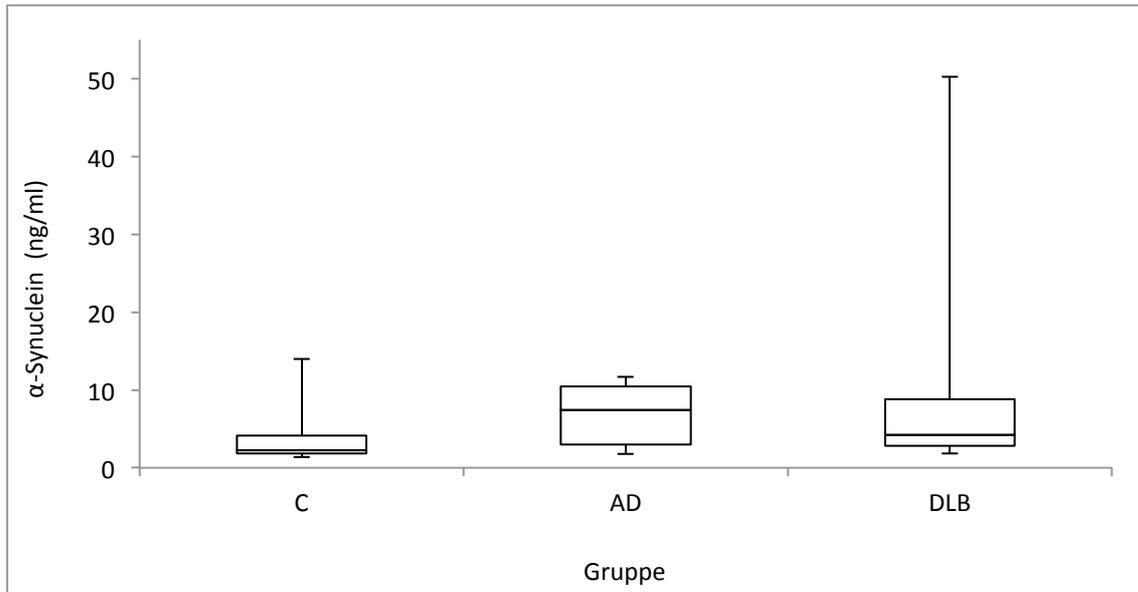


Abbildung 47: **α -Synucleinkonzentration nach diagnostischer Gruppe beim Patientenkollektiv**; Vergleich der α -Synucleinkonzentration im Plasma bei Patienten mit AD, DLB und gesunden Kontrollen. Mit dem Tukey-Test kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$); C = gesunde Kontrollpatienten, AD = Patienten mit Alzheimer-Demenz, DLB = Patienten mit Lewy-Körperchen-Demenz.

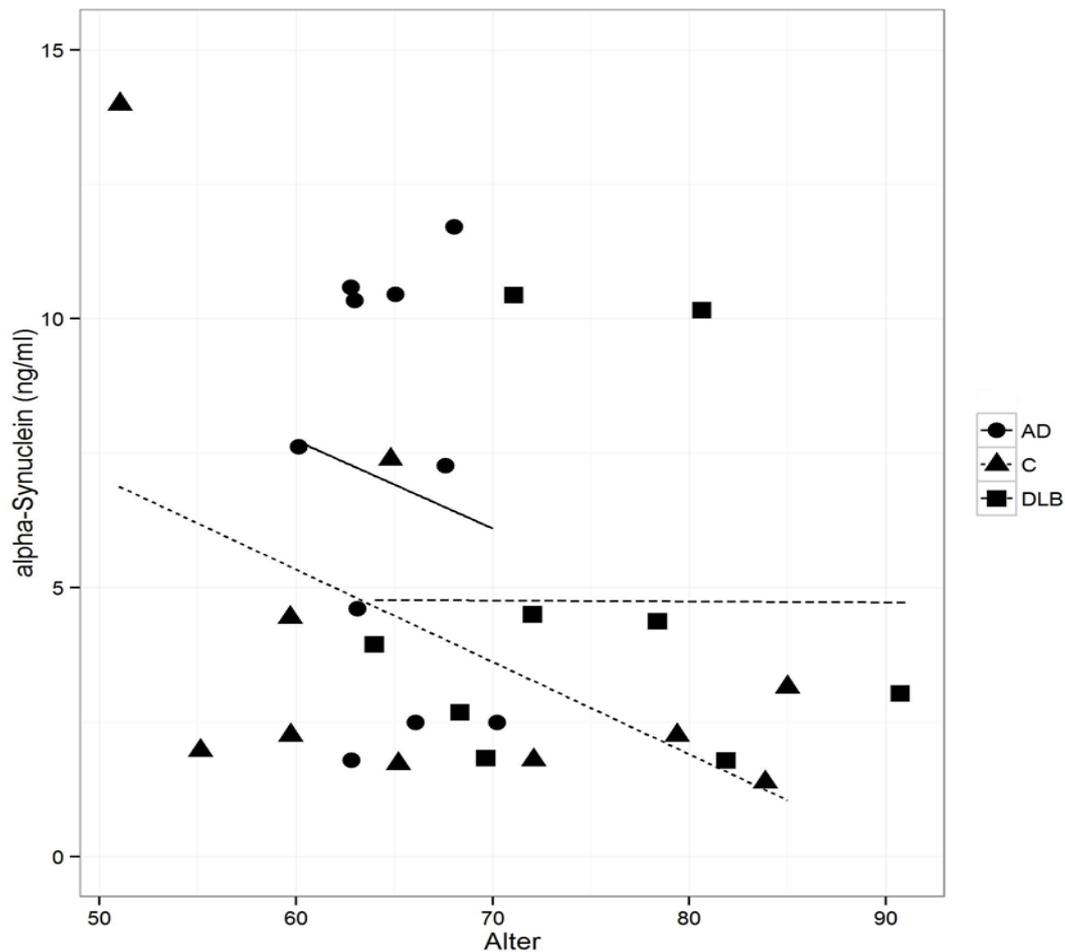


Abbildung 48: **Alter und α -Synucleinkonzentration beim Patientenkollektiv**; C = gesunde Kontrollpatienten, AD = Patienten mit Alzheimer-Demenz, DLB = Patienten mit Lewy-Körperchen-Demenz.

Die receiver operating characteristics (ROC) ist eine Methode zur Evaluierung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität des ELISA. Sie prüft, wie gut der Test zwischen „gesund“ und „krank“ unterscheidet, und letztlich, ob α -Synuclein als diagnostischer Biomarker eingesetzt werden kann.

Die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC, area under curve) bestimmt die diagnostische Genauigkeit. Ein Test eignet sich dann zur Differenzierung zweier Gruppen, wenn sich die ROC-Kurve signifikant von der Diagonalen unterscheidet und AUC gegen 1 geht. Das diagnostische Potenzial von α -Synuclein, AD- bzw. DLB-Patienten von Gesunden abzugrenzen, ist in den Abbildungen 49 und 50 grafisch dargestellt.

Für die Daten wurde die AUC berechnet und mit dem Wilcoxon-Test nach Mann-Whitney analysiert, ob statistisch signifikante Unterschiede vorliegen. Die AUC zur Unterscheidung von AD-Patienten und Kontrollprobanden wurde mit einem Wert von 0,75 (95% Konfidenzintervall; 0,514-0,987, $p = 0,06$) und von DLB-Patienten und Kontrollprobanden mit einem Wert von 0,67 (95% Konfidenzintervall; 0,420-0,920, $p = 0,212$) berechnet. Die AUC unterschieden sich in beiden Fällen nicht signifikant ($p > 0,05$) von der Diagonalen. Auch für eine Unterscheidung zwischen AD- und DLB-Patienten ergab sich keine ausreichende Trennschärfe (nicht dargestellt).

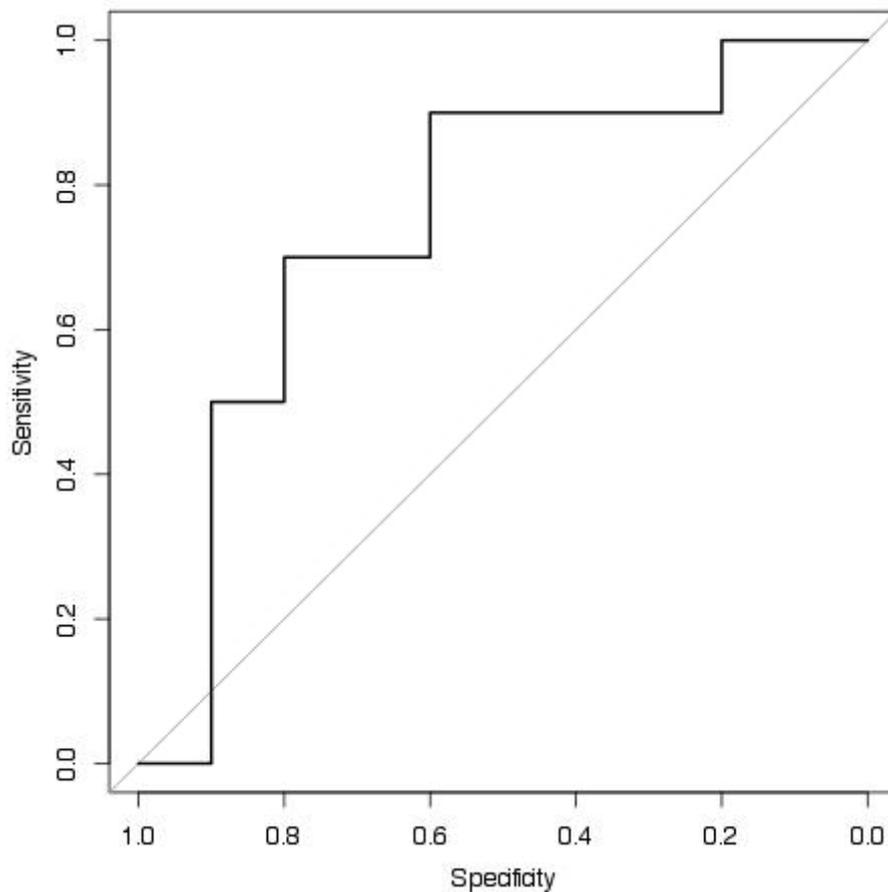


Abbildung 49: **ROC-Kurve zur Evaluation von α -Synuclein als diagnostischem Biomarker.** Vergleich AD-Patienten mit gesunden Kontrollpatienten (AUC = 0,75, $p = 0,06$).

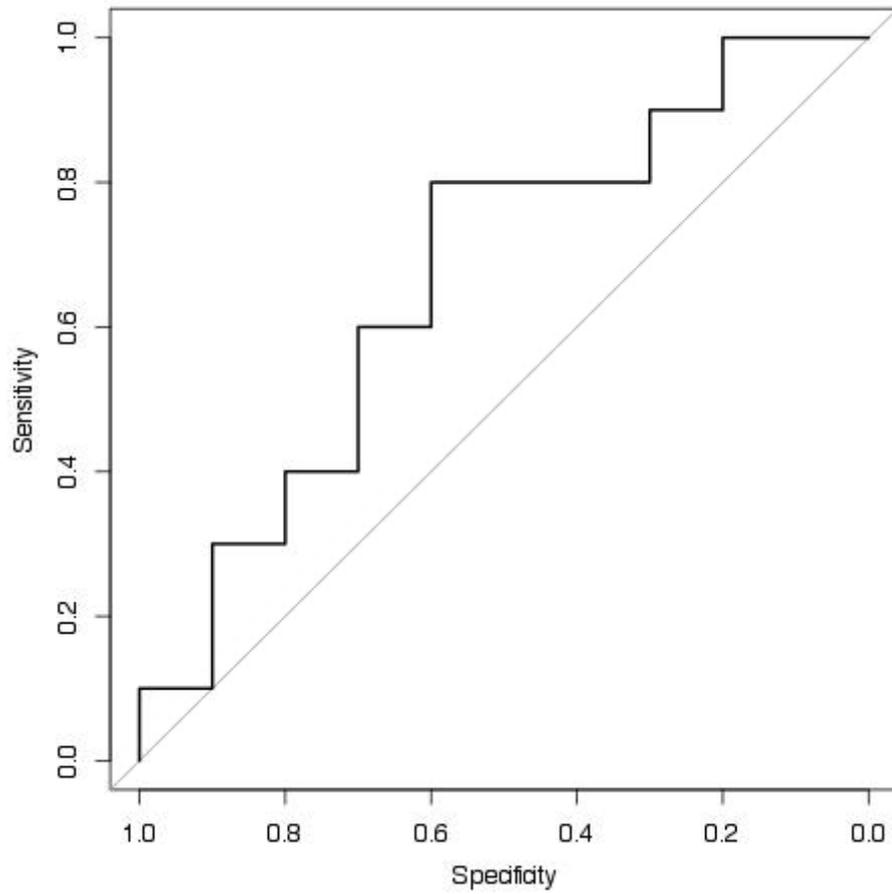


Abbildung 50: **ROC-Kurve zur Evaluation von α -Synuclein als diagnostischem Biomarker.** Vergleich DLB-Patienten mit gesunden Kontrollpatienten (AUC = 0,67, p = 0,212).

IV Diskussion

1. ELISA-Entwicklung

Mit dem Ziel, α -Synuclein in humanem Plasma quantitativ zu bestimmen, mussten zunächst die optimalen Bedingungen zur Durchführung des ELISA festgelegt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA verwendet, der das Messen von sehr niedrigen Antigenkonzentrationen in Proben ermöglicht. Diese Technik zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität (Raem und Rauch 2007) aus, die durch einen Antikörperüberschuss und eine hohe Selektivität, da zwei verschiedene Epitope erkannt werden, bedingt ist.

Primär wird die Sensitivität eines ELISA durch die Affinität des Antikörpers zum Antigen bestimmt. Dabei beeinflusst der Beschichtungsantikörper die Sensitivität des Sandwich-ELISA maßgeblich. Wird beim Sandwich-ELISA ein affinerer Antikörper zur Beschichtung als zur Detektion verwendet, ist das Testverfahren sensitiver als umgekehrt (Porstmann und Kiessig 1992).

Zum Einsatz kamen monoklonale und polyklonale Antikörper. Vorteile monoklonaler Antikörper sind eine hohe Sensitivität, ein breiter Messbereich und eine geringe Anfälligkeit für Störfaktoren (Porstmann und Kiessig 1992). Sie erkennen ein spezifisches Epitop des Antigens und können mit gleicher Spezifität und Affinität hergestellt werden. Dadurch lassen sich reproduzierbare Ergebnisse erzielen. Polyklonale Antikörper binden mehrere Epitope eines spezifischen Antigens. Je nach Charge können sich die polyklonalen Seren u.a. in der Spezifität unterscheiden. Daher ist ein Vergleich von verschiedenen ELISA nur bedingt möglich.

Im Zuge der ELISA-Entwicklung mussten Antikörper- und Antigenkonzentrationen empirisch ermittelt werden.

Beim Beschichten ist auf eine maximale Bindungskapazität der Oberfläche der Mikrotiterplatte zu achten. Die Konzentration des Beschichtungsantikörpers sollte 10 $\mu\text{g/ml}$ nicht übersteigen. Höhere Konzentrationen können spezifische Bindungen vermindern, indem sich die Beschichtungsantikörper gegenseitig sterisch stören.

Dadurch bilden sich instabile Multischichten (Butler 2000). Diese fördern durch Wechselwirkung zwischen den Beschichtungsantikörpern die Dissoziation des gebundenen Antikörpers während der Versuchsdurchführung. Wird die Beschichtungskonzentration zu niedrig gewählt, bleiben bestimmte Stellen an der Plattenoberfläche unbeschichtet (Gibbs 2001).

Zur Bestimmung einer geeigneten Antikörperbeschichtung des mouse anti- α -Synuclein Antikörpers wurden unterschiedliche Konzentrationen aufsteigend von 0,5 bis 4 $\mu\text{g/ml}$ und Leermessungen aufgetragen. Als optimal erwies sich eine Beschichtungskonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$.

Eine wesentliche Anforderung an den entwickelten ELISA war eine Messempfindlichkeit von α -Synuclein bei einer Konzentration zwischen 1 bis 80 ng/ml . In diesem Bereich war in vorangegangenen Studien die α -Synucleinkonzentration im Blut ermittelt worden (vgl. Tabelle 9). Die Plasmaverdünnung wurde nach Messung verschiedener Plasmen in unterschiedlichen Verdünnungen und nach mehreren Versuchsdurchläufen so festgelegt, dass die Extinktionswerte im Messbereich oberhalb der Nachweisgrenze lagen und den geringsten Anteil an Ausreißern zeigten.

Die untere Nachweisgrenze des entwickelten Sandwich-ELISA betrug 1,37 ng/ml . Der Mittelwert der gemessenen α -Synucleinkonzentration im Plasma des Normalkollektivs lag bei 3,39 ng/ml und war somit im messbaren Bereich.

Als problematisch stellte sich bei der Messung humaner Plasmaproben das unspezifische Hintergrundsignal heraus. Das Hintergrundsignal wird unter anderem durch unspezifisch adsorbierte Plasmamoleküle und Antikörper verursacht. Als Negativkontrollen wurden bei jeder ELISA-Durchführung ein Leerwert (kein Antigen) und eine Konjugat-Kontrolle (kein spezifischer Antikörper) mitgeführt (Paulie et al. 2006).

Um die Empfindlichkeit des ELISA zu erhöhen, sollten unspezifische Bindungen minimiert werden. Verschiedene Blockierlösungen und Verdünnungspuffer wurden hierzu getestet.

Im Vergleich aller untersuchten Blockierlösungen in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen erzielte 5% Magermilchpulver in PBS mit 0,3% Tween[®] 20 die

beste blockierende Wirkung mit guter Reduktion des Hintergrundsignals. Auf diese Weise konnte die maximale Antikörperbindung bei gleichzeitig minimaler, unspezifischer Bindung des Nachweissystems erreicht werden. Ungeblockte, mit BSA oder Gelatine geblockte Platten ergaben ein höheres Hintergrundsignal.

Die Absättigung freier Bindungsstellen ist abhängig von der Molekülmasse der Blockierlösung. Das Phosphoprotein Casein und gelöstes Milchpulver, das Casein enthält, sind aufgrund ihrer kleinen Molekülmasse in dieser Hinsicht sehr effektiv (Vogt et al. 1987, Pratt und Roser 1989, Esser 2010).

Bei der Verwendung von Tierseren als Blockierlösung können endogene Moleküle mit den humanen Antikörpern der Plasmaprobe binden, wodurch das unspezifische Hintergrundsignal reduziert wird (Fujii et al. 1989). Nachteilig kann es durch die endogenen Moleküle der Tierseren zu einer Kontamination des Nachweissystems und somit zu einer Maskierung spezifischer Bindungsstellen kommen. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit Ziegenserum trotz guter blockierender Eigenschaften in weiteren Versuchen nicht mehr verwendet.

Eine effektive Reduktion unspezifischer Bindungen wird auch durch den Zusatz des Detergens Tween[®] 20 in den Verdünnungs- und Waschpuffern erreicht. In manchen Fällen ist die alleinige Verwendung eines detergenschaltigen Verdünnungspuffers ohne zusätzlichen Einsatz einer Blockierlösung zur Verbesserung des spezifischen Signals ausreichend (Mohammad und Esen 1989, Esser 2010).

Bei Tween[®] 20 handelt es sich um ein nicht-ionisches Detergens, das hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Proteinen und der Festphase der Mikrotiterplatte verhindert. Wird es gering konzentriert eingesetzt, stört es die spezifische Antigen-Antikörper-Bindung nicht (Luttmann et al. 2008).

Neben dem Einsatz von Tween[®] 20 beeinflusst auch die Oberfläche der Polystyrolplatte das spezifische Signal (Ravindranath et al. 1994). Als feste Phase ist Polystyrol beim ELISA das geeignetste und verbreitetste Material (Chessum und Denmark 1978). Es wurden zwei Polystyrolplatten miteinander verglichen. Bei der MaxiSorp Platte beruht die Bindung auf hydrophoben und hydrophilen Wechselwirkungen. Die Immobilizer Amino Platte ermöglicht eine kovalente Bindung von Molekülen über elektrophile Gruppen.

Plasmaproben und Standards von α -Synuclein wurden in Verdünnungsreihen auf die MaxiSorp Platten und Immobilizer Amino Platten aufgetragen. Beide zeigten im gewünschten Messbereich eine lineare Verdünnbarkeit der Proben. Bezüglich der Sensitivität des ELISA und des unspezifischen Hintergrundsignals konnte mit der MaxiSorp Platte ein besseres Ergebnis erzielt werden.

Eine Veränderung des pH-Werts des Beschichtungspuffers hatte nur einen geringfügigen Effekt auf die Sensitivität des entwickelten ELISA. Ein Karbonatpuffer mit einem pH-Wert von 9,6 wurde mit einer phosphatgepufferten Salzlösung mit einem pH-Wert von 7,2 verglichen. Der pH-Wert des verwendeten Beschichtungspuffers kann die Ladungsdichte der Mikrotiterplatte beeinflussen und somit die Bindungsaffinität des Beschichtungsantikörpers an die Plattenoberfläche (Geerligs et al. 1988).

Mit dem Karbonatpuffer (pH-Wert 9,6) war eine effiziente Immobilisierung des Beschichtungsantikörpers zu erreichen.

Die Intraassay-Variabilität gibt die Streuung der Messwerte innerhalb einer Versuchsdurchführung an. Zur Berechnung wurden drei verschiedene Plasmaverdünnungen (1:50, 1:100, 1:200) 95 mal gemessen. Es ergab sich ein VK von 15,8%.

Die Interassay-Variabilität drückt die Reproduzierbarkeit des ELISA bei wiederholten Messungen der Plasmaproben an unterschiedlichen Tagen aus. Mit einem VK von 22,8% lag auch dieser Wert oberhalb der geforderten 15% (Karnes et al. 1991) und zeigte, dass keine ausreichende Genauigkeit des ELISA bei der Messung von Plasmaproben vorlag.

2. α -Synuclein als potenzieller Biomarker

Biomarker sind Parameter, die objektiv gemessen werden können und Hinweise auf einen normalen oder krankhaft veränderten, biologischen Prozess im Körper geben

(Biomarkers Definitions Working Group 2001). Dadurch können schwierige Diagnosen gesichert oder erst ermöglicht werden.

Die Diagnosestellung von demenziellen Erkrankungen wird trotz verbesserter klinischer Kriterien (McKeith et al. 2005) meist erst posthum durch eine neuropathologische Untersuchung ermöglicht (Jellinger 2003b, Jellinger 2008). Insbesondere in frühen Stadien lässt sich die richtige Diagnose aufgrund einer atypischen Symptomatik und eines heterogenen Krankheitsbilds häufig nicht eindeutig stellen. Erste Symptome treten auf, wenn 60% bis 80% der Neuronen in der Substantia nigra ausgefallen sind (Jankovic 2005). Andere Studien belegen, dass bereits bei einem Funktionsverlust von 29% bis 31% der dopaminergen Nervenzellen Beschwerden einsetzen (Greffard et al. 2006, Hilker et al. 2005). Bisher sind noch keine laborchemischen Biomarker zur Früherkennung von Synucleinopathien und zum Einsatz in der Klinik verfügbar.

α -Synuclein spielt eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Synucleinopathien und wird aufgrund seiner pathophysiologischen Bedeutung als potenzieller Biomarker gesehen (Stefanis 2012). Mit Entdeckung einer Mutation auf dem α -Synuclein-Gen, die die seltene autosomal-dominant vererbte Parkinson-Krankheit verursacht, wurde der Einfluss von α -Synuclein auf die Entstehung des PD deutlich (Polymeropoulos et al. 1997). Noch im selben Jahr wurde α -Synuclein als Hauptbestandteil in Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten nachgewiesen (Spillantini et al. 1997).

Bei den Synucleinopathien akkumuliert α -Synuclein im Nervensystem als Amyloid in Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten bzw. als Papp-Lantos-Körper im Zytoplasma von Oligodendrozyten (Jellinger 2008, Wakabayashi et al. 2010). Auch bei der AD, die zwar den Tauopathien zugeordnet wird, finden sich α -Synuclein-Aggregate in Nervenzellkörpern (Lewis et al. 2010).

α -Synuclein galt als rein intrazelluläres Protein, bis der Nachweis in humanem Liquor und Plasma gelang (El-Agnaf et al. 2003). Diese Erkenntnis bahnte den Weg für einen möglichen Einsatz von α -Synuclein als leicht zugänglichem Biomarker für Screening-Untersuchungen. Im Liquor ist die α -Synucleinkonzentration deutlich geringer als im Plasma. Verglichen mit Liquor hat Plasma einen höheren Gesamtproteingehalt, was zu Störeffekten beim ELISA führen kann. Proteine der Blutproben können unspezifisch an

Antikörper des ELISA binden mit der Folge falsch positiver oder falsch negativer Messergebnisse.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein sensitiver und spezifischer Sandwich-ELISA zur Bestimmung von humanem α -Synuclein im Plasma etabliert und validiert. Danach erfolgte die Untersuchung von 95 Plasmaproben aus dem Normalkollektiv und 30 Plasmaproben aus dem Patientenkollektiv.

Im Normalkollektiv konnte bei den untersuchten Probanden geschlechtsunabhängig keine Korrelation zwischen dem Alter und der α -Synucleinkonzentration festgestellt werden. Bei Patienten mit PD wird von einem geschlechtsspezifischen Unterschied ausgegangen. Das Risiko, an PD zu erkranken, ist bei Männern im Vergleich zu Frauen erhöht (Dluzen und McDermott 2000, de Lau et al. 2004). Dies lässt vermuten, dass körpereigenes Östrogen einen protektiven Effekt bei der Entstehung des PD hat (Dziedziejko et al. 2009). Weitere Untersuchungen postulieren α -Synuclein im Plasma ausschließlich bei Männern als potenziellen Biomarker für den Krankheitsverlauf von PD (Caranci et al. 2013).

Im Patientenkollektiv konnte in der vorliegenden Arbeit kein statistisch signifikanter Unterschied der α -Synucleinkonzentration im Plasma zwischen DLB-Patienten, AD-Patienten und gesunden Kontrollpatienten gemessen werden.

Bisher veröffentlichte Arbeiten beschreiben sehr variable α -Synucleinkonzentrationen im Plasma oder Serum. Bei der Messung von α -Synuclein im Blut wurden im Vergleich mit gesunden Kontrollpatienten sowohl erhöhte als auch geringere Konzentrationen bei PD-Patienten sowie kein Unterschied zwischen PD-Patienten und gesunden Kontrollen ermittelt (vgl. Tabelle 9).

In Studien wurden die Konzentrationen von α -Synuclein (Tinsley et al. 2010), α -Synuclein-Oligomeren (EL-Agnaf et al. 2006) und phosphoryliertem α -Synuclein (Foulds et al. 2011) bei Patienten mit Synucleinopathien und gesunden Kontrollpatienten untersucht. EL-Agnaf et al. verglichen die Konzentration von α -Synuclein-Oligomeren bei 34 PD- und 27 gesunden Kontrollpatienten. Es wurde ein 3,5fach höheres Signal ($OD > 0,5$) bei PD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe

gemessen (EL-Agnaf et al. 2006). In zwei weiteren Studien waren die α -Synucleinkonzentrationen im Blut ebenfalls erhöht (Lee et al. 2006, Duran et al. 2010). In der größeren der beiden Untersuchungen evaluierten Lee et al. die α -Synucleinkonzentration von PD-Patienten (n = 105) mit gesunden Kontrollprobanden (n = 51) mittels ELISA-Kit und stellten eine erhöhte α -Synucleinkonzentration bei PD-Patienten ($p < 0,001$) fest (Lee et al. 2006).

Ein konträres Ergebnis wurde von einer Forschergruppe mittels Western Blot gemessen. Die α -Synucleinkonzentrationen im Plasma waren bei den 27 PD-Patienten im Vergleich zu den 11 gesunden Kontrollprobanden signifikant niedriger ($p = 0,001$). Es gab keinen Unterschied bezüglich des Geschlechts (Li et al. 2007). In weiteren Arbeiten wurden bei PD-Patienten ebenfalls geringere α -Synucleinkonzentrationen als bei Gesunden mittels ELISA gemessen (Laske et al. 2011, Gorostidi et al. 2012). Eine mögliche Ursache für die erniedrigte α -Synucleinkonzentration im Blut könnte die Anreicherung von α -Synuclein in den Neuronen sein.

In einer Kohortenstudie wurden die Konzentrationen von α -Synuclein, α -Synuclein-Oligomeren, phosphoryliertem α -Synuclein und phosphorylierten α -Synuclein-Oligomeren bei 32 Patienten mit PD und 30 Gesunden bestimmt (Foulds et al. 2011). Die Konzentration von α -Synuclein ($p = 0,244$), α -Synuclein-Oligomeren ($p = 0,221$) und phosphoryliertem α -Synuclein-Oligomeren ($p = 0,181$) unterschied sich bei Patienten mit PD und den gesunden Kontrollprobanden nicht signifikant. Die Konzentration von phosphoryliertem α -Synuclein war bei den PD-Patienten höher als bei der Kontrollgruppe ($p = 0,053$).

In weiteren Studien ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den PD-Patienten und der Kontrollgruppe (Mata et al. 2010, Shi et al. 2010, Park et al. 2011, Smith et al. 2012, Caranci et al. 2013, Foulds et al. 2013).

Tabelle 9: Übersicht über die α -Synucleinkonzentration im Blut von Patienten mit PD und anderen Synucleinopathien. HC = gesunde Kontrollgruppe, C = Kontrollgruppe, AD = Patienten mit Alzheimer-Demenz, DLB = Patienten mit Lewy-Körperchen-Demenz, MSA = Patienten mit Multisystematrophie, PD = Patienten mit Morbus Parkinson, nt = nicht behandelt, t = behandelt.

	Methode	Probenmaterial	Probanden	Synucleinkonzentration	Ergebnis
El-Agnaf et al. 2006	ELISA	Plasma	27 C 34 PD/DLB	keine Angabe	OD-Werte bei PD signifikant höher als bei C (p = 0,002)
Lee et al. 2006	ELISA	Plasma	51 C 105 PD 38 MSA	C 76,1 pg/ml PD 79,9 pg/ml MSA 78,1 pg/ml	- signifikant höher bei PD (p < 0,001) und bei MSA (p = 0,019) als bei C - signifikant höher bei PD als bei MSA (p = 0,016)
Duran et al. 2010	ELISA	Plasma	53 ntPD 42 tPD 60 C	12-17 ng/ml	signifikant höher bei PD als bei C (p = 0,0229)
Mata et al. 2010	Luminex assay	Plasma	78 HC 86 PD	C 48,6 ng/ml PD 46,9 ng/ml	kein signifikanter Unterschied
Shi et al. 2010	Luminex assay	Plasma	122 HC 126 PD 33 AD	C 49,2 ng/ml PD 43,6 ng/ml AD 36,8 ng/ml	kein signifikanter Unterschied
Foulds et al. 2011	ELISA	Plasma	30 HC 32 PD	0,001-6 μ g/ml	kein signifikanter Unterschied (p = 0,244)
Park et al. 2011	ELISA	Plasma	29 C 23 PD	keine Angabe	kein signifikanter Unterschied
Smith et al. 2012	ELISA	Serum	9 HC 14 PD 11 APS	1,3-28,4 ng/ml	kein signifikanter Unterschied (p = 0,70)
Caranci et al. 2013	ELISA	Plasma	110 HC 69 PD	C 10,07 ng/ml PD 10,55 ng/ml	kein signifikanter Unterschied
Foulds et al. 2013	ELISA	Plasma	91 HC 189 PD	C 12221,5 ng/ml PD 1777,1 ng/ml	kein signifikanter Unterschied (p = 0,058)
Li et al. 2007	Western Blot	Plasma	11 HC 27 PD	keine Angabe	signifikant niedriger bei PD als bei C (p = 0,001)
Laske et al. 2011	ELISA	Serum	40 HC 40 DLB 80 AD	C 8,1 ng/ml DLB 4,7 ng/ml AD 7,0 ng/ml	signifikant niedriger bei DLB als bei C (p = 0,001) und bei AD (p = 0,006)
Gorostidi et al. 2012	ELISA	Plasma	109 C 134 PD	C 617 ng/ml PD 386,5 ng/ml	signifikant niedriger bei PD als bei C (p = 0,010)

Gründe für die widersprüchlichen Ergebnisse bei der Bestimmung von α -Synuclein im Blut könnten methodische Unterschiede der ELISA-Durchführung, verschiedene

Testverfahren, die Nichtberücksichtigung von Störvariablen und Studien mit zu kleiner Fallzahl sein. Insbesondere bei Studien mit geringer Fallzahl kann das Ergebnis durch die Vernachlässigung von Komorbiditäten oder eine unzureichende Randomisierung beeinflusst werden.

Ein möglicher Störfaktor bei der Messung von α -Synuclein im Blut ist sein hoher Anteil in Erythrozyten. Über 98% von α -Synuclein im humanem Blut wurde in Erythrozyten nachgewiesen (Shi et al. 2010, Barbour et al. 2008). Durch die Messung des sP-Selectins und Hämoglobins in den Blutproben kann die α -Synucleinkonzentration überprüft und korrigiert werden (Shi et al. 2010). Der Rolle der Hämolyse als mögliche Störvariable wurde in den bisherigen Studien meist nur unzureichend berücksichtigt.

Bei der Messung von α -Synuclein im Liquor ergaben die meisten Studien eine reduzierte α -Synucleinkonzentration bei Patienten mit PD verglichen mit der Kontrollgruppe (Tokuda et al. 2006, Mollenhauer et al. 2008, Hong et al. 2010, Shi et al. 2010, Parnetti et al. 2011, Hall et al. 2012, Kang et al. 2013). Es fand sich zudem eine signifikant geringere α -Synucleinkonzentration im Liquor bei Patienten mit Synucleinopathien als bei Patienten mit einer anderen neurologischen Erkrankung (Mollenhauer et al. 2010).

Ein widersprüchliches Ergebnis lieferte eine Studie, bei der höhere Konzentrationen von α -Synuclein-Oligomeren im Liquor bei PD-Patienten verglichen mit Kontrollprobanden gemessen wurden (Tokuda et al. 2010).

Zudem konnte auch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezüglich der α -Synucleinkonzentration im Liquor festgestellt werden (Foulds et al. 2012, Ohrfelt et al. 2009, Borghi et al. 2000).

Mit dem Nachweis von α -Synuclein in weiteren Organen und Körperflüssigkeiten eröffnen sich neue Möglichkeiten für den Einsatz als Biomarker. Bei Patienten mit PD wurden vermehrt α -Synuclein-Ablagerungen im peripheren Nervensystem nachgewiesen (Donadio et al. 2014). Auch Doppler et al. fanden in über der Hälfte der Patienten mit PD α -Synuclein-Ablagerungen in der Haut, jedoch bei keinem der Probanden der Kontrollgruppe (Doppler et al. 2014). Damit könnte die Hautbiopsie das Diagnostikspektrum für Synucleinopathien erweitern (Hoepken et al. 2008).

Auch der Speicheltest wird als diagnostische Methode zur Differenzierung zwischen PD und anderen Synucleinopathien diskutiert. In einer auf Autopsie-Befunden basierenden Studie zeigte sich eine Lewy-Pathologie in der Glandula submandibularis bei Patienten mit PD (Del Tredici et al. 2010). Bei der Untersuchung von Speichel konnte eine geringere α -Synucleinkonzentration bei PD-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollpatienten festgestellt werden (Devic et al. 2011).

Aufgrund des Nachweises von Lewy-Körperchen und -Neuriten im enterischen Nervensystem bei präsymptomatischen Patienten wurde postuliert, dass PD im Magen-Darm-Trakt beginnt und sich von dort in das zentrale Nervensystem ausbreitet (Del Tredici et al. 2002, Braak et al. 2003, Wakabayashi und Takahashi 1997). Untersuchungen von Kolonbiopsien zeigten, dass bei Patienten, die im Verlauf an PD erkrankten, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe bereits α -Synuclein nachweisbar war (Shannon et al. 2012).

Als mögliche Biomarker für Synucleinopathien wurden weitere Proteine mit pathogenetischer Bedeutung untersucht.

Mutationen auf dem Gen DJ-1 (Park7) verursachen eine autosomal-rezessive, seltene Form der Early-onset-PD (Bonifati et al. 2003). Es wird angenommen, dass DJ-1 aufgrund seiner antioxidativen und neuroprotektiven Wirkung auch die Entstehung der sporadischen PD beeinflusst (Taira et al. 2004). Der protektive Effekt von DJ-1 beruht auf seinem regulierenden Einfluss bei der Gentranskription, der erhöhten Bildung von Glutathion und der vermehrten Expression des Hitzeschockproteins 70 (Zhou und Freed 2005, Shendelman et al. 2004). DJ-1 verhindert zudem Störungen der mitochondrialen Funktion (McCoy und Cookson 2011, Kamp et al. 2010, Heo et al. 2012). Die Untersuchung des Proteins DJ-1 im Blut von PD- und Kontrollpatienten ergab jedoch kein eindeutiges Resultat (Waragai et al. 2006, Maita et al. 2008, Shi et al. 2010).

Um zwischen gesunden Kontrollen und Patienten mit PD, AD und MSA besser zu differenzieren, kann es hilfreich sein, mehrere Biomarker gleichzeitig einzusetzen. Die in der Demenzforschung bereits verwendeten Tau-Proteine und β -Amyloid ($A\beta$) ermöglichen zusammen mit weiteren Markern nicht nur eine Unterscheidung der verschiedenen Gruppen, sondern korrelieren auch mit der Schwere der Erkrankung und dem Krankheitsverlauf (Shi et al. 2011). Um den Abbau kognitiver Fähigkeiten bei

PD-Patienten einzuschätzen, sind die Konzentrationen von A β und das Verhältnis von A β zum Tau-Protein und BDNF im Liquor geeignet (Leverenz et al. 2011, Siderowf et al. 2010).

Aktuelle Studienergebnisse geben einen Ausblick auf die Möglichkeit, in den nächsten Jahren effektive Biomarker zur Früh- und Differenzialdiagnostik der Synucleinopathien zu etablieren. Wichtige Anforderungen an Studien sind eine zuverlässige Methode zur Bestimmung von α -Synuclein mit Validierung des Testverfahrens und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in unabhängigen großen Kohortenstudien (Chahine et al. 2014). Es stehen verschiedene Proteine als potenzielle Marker und unterschiedliches Probenmaterial zur Verfügung. Der Einsatz von α -Synuclein als Biomarker im Liquor ist vielversprechend (Tokuda et al. 2010, Mollenhauer et al. 2011). Bisher konnte jedoch noch kein laborchemischer Biomarker mit ausreichendem Evidenzgrad identifiziert werden.

V Zusammenfassung

Die Zunahme von neurodegenerativen Erkrankungen bedeutet nicht nur aus medizinischer, sondern auch aus sozialer und gesundheitspolitischer Sicht eine besondere Herausforderung für unsere Gesellschaft (Eller und Williams 2011). Die Prävalenz von PD nimmt innerhalb von 30 Jahren von 0,6% in der Altersgruppe der 65- bis 69-Jährigen auf 3,5% bei den über 85-Jährigen zu (de Rijk et al. 1997). Aufgrund der demografischen Entwicklung ist in den kommenden Jahren ein weiterer Anstieg der Patientenzahlen zu erwarten. Bisher gibt es noch keinen zuverlässigen, laborchemischen Biomarker, der eine Frühdiagnose von Synucleinopathien oder eine Aussage über den Verlauf der Erkrankung ermöglicht (Eller und Williams 2009).

Bereits veröffentlichte Studien weisen auf einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Synucleinopathie und der α -Synucleinkonzentration im Blut hin. Jedoch ergaben die Untersuchungen widersprüchliche Ergebnisse bezüglich einer möglichen Korrelation und der Höhe der α -Synucleinkonzentration.

Ziel dieser Arbeit war es, einen sensitiven und spezifischen Sandwich-ELISA zum Nachweis humanen α -Synucleins in Standards und Plasmaproben zu entwickeln. Für die Durchführung des ELISA mussten geeignete mono- und polyklonale Antikörper, Beschichtungs- und Verdünnungspuffer, Blockierlösungen und das optimale Amplifizierungs- und Nachweissystem gewählt werden. Zwar konnte eine ausreichende Sensitivität, jedoch keine hinreichende Genauigkeit des ELISA für den quantitativen Nachweis von α -Synuclein im Plasma erzielt werden.

Im nächsten Schritt wurden 95 Plasmaproben eines Normalkollektivs und jeweils 10 Plasmaproben von Patienten mit AD, DLB und einer gesunden Kontrollgruppe getestet. Dabei lag der Fokus auf möglichen Unterschieden zwischen der α -Synucleinkonzentration beim Normal- und Patientenkollektiv und dem Alter der Probanden. Die α -Synucleinkonzentration wurde mit Hilfe des entwickelten ELISA bestimmt.

Das Ergebnis der vorliegenden Studie zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der α -Synucleinkonzentration bei Patienten mit AD, DLB und der gesunden

Kontrollgruppe. Zudem konnte kein Zusammenhang zwischen der α -Synucleinkonzentration und dem Alter der Patienten festgestellt werden.

Zusammenfassend könnte α -Synuclein ein potenzieller Biomarker sein, der sich als Indikator für spezifische pathophysiologische Prozesse der Synucleinopathien eignet (Stefanis 2012). Dabei erscheint die liquorbasierte Diagnostik von α -Synuclein als vielversprechend, da Studienergebnisse eine höhere Übereinstimmung bei der Untersuchung von Liquor als von Blut ergaben (Kasuga und Ikeuchi 2012). Jedoch sind bisherige Ergebnisse nicht ausreichend präzise und verlässlich genug, um α -Synuclein als Biomarker im klinischen Alltag zur Sicherung von Diagnosen einzusetzen (Eller und Williams 2011).

VI Literaturverzeichnis

Aarsland D, Zaccai J, Brayne C (2005) A systematic review of prevalence studies of dementia in Parkinson's disease. *Mov Disord* 20: 1255-63.

Aarsland D, Rongve A, Nore SP, Skogseth R, Skulstad S, Ehrt U, Hoprekstad D, Ballard C (2008) Frequency and case identification of dementia with Lewy bodies using the revised consensus criteria. *Dement Geriatr Cogn Disord* 26: 445-52.

Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25: 239-52.

Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, Sherman H, Yu I, Shah B, Weir D, Thompson C, Szu-Tu C, Trinh J, Aasly JO, Rajput A, Rajput AH, Jon Stoessl A, Farrer MJ (2013) Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord* 28: 811-3.

Auluck PK, Caraveo G, Lindquist S (2010) alpha-Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26: 211-33.

Barbour R, Kling K, Anderson JP, Banducci K, Cole T, Diep L, Fox M, Goldstein JM, Soriano F, Subert P, Chilcote TJ (2010) Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neurodegener Dis* 5: 55-9.

Bartels T, Ahlstrom LS, Leftin A, Kamp F, Haass C, Brown MF, Beyer K (2010) The N-terminus of the intrinsically disordered protein α -synuclein triggers membrane binding and helix folding. *Biophys J* 99: 2116-24.

Biomarkers Definitions Working Group (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69: 89-95.

Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F, Krieger E, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, van Duijn CM, Oostra B, Meco G, Heutink P (2003) DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci* 24: 159-60.

Borghi R, Marchese R, Negro A, Marinelli L, Forloni G, Zaccheo D, Abbruzzese G, Tabaton M (2000) Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neurosci Lett* 287: 65-7.

Bostantjopoulou S, Katsarou Z, Papadimitriou A, Veletza V, Hatzigeorgiou G, Lees A (2001) Clinical features of parkinsonian patients with the alpha-synuclein (G209A) mutation. *Mov Disord* 16: 1007-13.

- Braak H, Rüb U, Gai WP, Del Tredici K (2003) Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm* 110: 517-36.
- Breydo L, Wu JW, Uversky VN (2012) A-synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1822: 261-85.
- Butler JE (2000) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Immunoassay* 21: 165-209.
- Caranci G, Piscopo P, Rivabene R, Traficante A, Rizzo B, Castellano AE, Ruggieri S, Vanacore N, Confaloni A (2013) Gender differences in Parkinson's disease: focus on plasma α -synuclein. *J Neural Transm* 120: 1209-15.
- Celej MS, Sarroukh R, Goormaghtigh E, Fidelio GD, Ruyschaert JM, Raussens V (2012) Toxic prefibrillar α -synuclein amyloid oligomers adopt a distinctive antiparallel β -sheet structure. *Biochem J* 443: 719-26.
- Chahine LM, Stern MB, Chen-Plotkin A (2014) Blood-based biomarkers for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 1: 99-103.
- Chandra S, Gallardo G, Fernández-Chacón R, Schlüter OM, Südhof TC (2005) Alpha-synuclein cooperates with CSP alpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 123: 383-96.
- Cheng F, Vivacqua G, Yu S (2011) The role of α -synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. *J Chem Neuroanat* 42: 242-8.
- Chessum BS, Denmark JR (1978) Inconstant ELISA. *Lancet* 1: 161.
- Clayton DF, George JM (1999) Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res* 58: 120-9.
- Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding T T, Williamson RE, Lansbury PT Jr (2000) Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 571-6.
- Cookson MR, Xiomerisiou G, Singleton A (2005) How genetics research in Parkinson's disease is enhancing understanding of the common idiopathic forms of the disease. *Curr Opin Neurol* 18: 706-11.
- Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM (1998) Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem* 273: 9443-9.
- de Lau LM, Giesbergen PC, de Rijk MC, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM (2004) Incidence of parkinsonism and Parkinson disease in a general population: the Rotterdam Study. *Neurology* 63: 1240-4.

Del Tredici K, Hawkes CH, Ghebremedhin E, Braak H (2010) Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 119: 703-13.

Del Tredici K, Rüb U, De Vos RA, Bohl JR, Braak H (2002) Where does parkinson disease pathology begin in the brain? *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 413-26.

de Rijk MC, Tzourio C, Breteler MM, Dartigues JF, Amaducci L, Lopez-Pousa S, Manubens-Bertran JM, Alperovitch A, Rocca WA (1997) Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62: 10-5.

Devic I, Hwang H, Edgar JS, Izutsu K, Presland R, Pan C, Goodlett DR, Wang Y, Armaly J, Tumas V, Zabetian CP, Leverenz JB, Shi M, Zhang J (2011) Salivary alpha-synuclein and DJ-1: potential biomarkers for Parkinson's disease. *Brain* 134: e178.

Dluzen DE, McDermott JL (2000) Gender differences in neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system: implications for Parkinson's disease. *J Gend Specif Med* 3: 36-42.

Donadio V, Incensi A, Leta V, Giannoccaro MP, Scaglione C, Martinelli P, Capellari S, Avoni P, Baruzzi A, Liguori R (2014) Skin nerve alpha-synuclein deposits: a biomarker for idiopathic Parkinson disease. *Neurology* 82: 1362-9.

Doppler K, Ebert S, Uçeyler N, Trenkwalder C, Ebentheuer J, Volkmann J, Sommer C (2014) Cutaneous neuropathy in Parkinson's disease: a window into brain pathology. *Acta Neuropathol* 128: 99-109.

den Dunnen WF (2013) Neuropathological Diagnostic Considerations in Hyperkinetic Movement Disorders. *Front Neurol* 4: 7.

Duran R, Barrero FJ, Morales B, Luna JD, Ramirez M, Vives F (2010) Plasma alpha-synuclein in patients with Parkinson's disease with and without treatment. *Mov Disord* 25: 489-93.

Dziedziejko V, Białecka M, Machoy-Mokrzyńska A, Kłodowska-Duda G, Chlubek D (2009) The role of estrogens in Parkinson's disease. *Postepy Hig Med Dosw* 63: 627-33.

El-Agnaf OM (2014) Alpha-synuclein antibodies and uses thereof. United States Patent and Trademark Office (USPTO). US20140241987.

El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Curran MD, Gibson MJ, Court JA, Schlossmacher MG, Allsop D (2006) Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 20: 419-25.

El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, Curran MD, Court JA, Mann DM, Ikeda S, Cookson MR, Hardy J, Allsop D (2003) Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J* 17: 1945-7.

Eller M, Williams DR (2011) α -Synuclein in Parkinson disease and other neurodegenerative disorders. *Clin Chem Lab Med* 49: 403-8.

Eller M, Williams DR (2009) Biological fluid biomarkers in neurodegenerative parkinsonism. *Nat Rev Neurol* 5: 561-70.

Esser P (2010) Blocking Agent and Detergent in ELISA. *Thermo Scientific Nunc Bulletin* 9: 337-40.

Farlow J, Pankratz ND, Wojcieszek J, Foroud T (2014) Parkinson Disease Overview. (Hrsg) Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K. *GeneReviews*[®], Seattle (WA): University of Washington.

Foulds PG, Diggle P, Mitchell JD, Parker A, Hasegawa M, Masuda-Suzukake M, Mann DM, Allsop D (2013) A longitudinal study on α -synuclein in blood plasma as a biomarker for Parkinson's disease. *Sci Rep* 3: 2540.

Foulds PG, Yokota O, Thurston A, Davidson Y, Ahmed Z, Holton J, Thompson JC, Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, Gerhard A, Allsop D, Mann DM (2012) Post mortem cerebrospinal fluid α -synuclein levels are raised in multiple system atrophy and distinguish this from the other α -synucleinopathies, Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis* 45: 188-95.

Foulds PG, Mitchell JD, Parker A, Turner R, Green G, Diggle P, Hasegawa M, Taylor M, Mann D, Allsop D (2011) Phosphorylated α -synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 25: 4127-37.

Fujii K, Tsuji M, Murota K, Terato K, Shimozuru Y, Nagai Y (1989) An improved enzyme-linked immunosorbent assay of anti-collagen antibodies in human serum. *J Immunol Methods* 124: 63-70.

Geerligs HJ, Weijer WJ, Bloemhoff W, Welling GW, Welling-Wester S (1988) The influence of pH and ionic strength on the coating of peptides of herpes simplex virus type 1 in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 106: 239-44.

Greffard S, Verny M, Bonnet AM, Beinis JY, Gallinari C, Meaume S, Piette F, Hauw JJ, Duyckaerts C (2006) Motor score of the Unified Parkinson Disease Rating Scale as a good predictor of Lewy body-associated neuronal loss in the substantia nigra. *Arch Neurol* 63: 584-8.

Gelpi E, Navarro-Otano J, Tolosa E, Gaig C, Compta Y, Rey MJ, Martí MJ, Hernández I, Valldeoriola F, Reñé R, Ribalta T (2014) Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov Disord* 29: 1010-8.

George JM, Jin H, Woods WS, Clayton DF (1995) Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 15: 361-72.

Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM (2001) A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem* 276: 2380-6.

Gibbs J (2001) Optimizing the Immobilization of Protein and Other Biomolecules. ELISA Technical Bulletin-No.2, Corning Inc. Life Sciences: Acton, Massachusetts.

Gilman S, Low PA, Quinn N, Albanese A, Ben-Shlomo Y, Fowler CJ, Kaufmann H, Klockgether T, Lang AE, Lantos PL, Litvan I, Mathias CJ, Oliver E, Robertson D, Schatz I, Wenning GK (1998) Consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *J Auton Nerv Syst* 74: 189-92.

Goedert M (2001) Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2: 492-501.

Gorostidi A, Bergareche A, Ruiz-Martínez J, Martí-Massó JF, Cruz M, Varghese S, Qureshi MM, Alzahmi F, Al-Hayani A, López de Munáin A, El-Agnaf OM (2012) Alpha-synuclein levels in blood plasma from LRRK2 mutation carriers. *PLoS One* 7: e52312.

Gosavi N, Lee HJ, Lee JS, Patel S, Lee SJ (2002) Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar alpha-synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion. *J Biol Chem* 277: 48984-92.

Graham JG, Oppenheimer DR (1969) Orthostatic hypotension and nicotine sensitivity in a case of multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 32: 28-34.

Greggio E, Bisaglia M, Civiero L, Bubacco L (2011) Leucine-rich repeat kinase 2 and alpha-synuclein: intersecting pathways in the pathogenesis of Parkinson's disease? *Mol Neurodegener* 6: 6.

Hall S, Öhrfelt A, Constantinescu R, Andreasson U, Surova Y, Bostrom F, Nilsson C, Håkan W, Decraemer H, Någga K, Minthon L, Londos E, Vanmechelen E, Holmberg B, Zetterberg H, Blennow K, Hansson O (2012) Accuracy of a panel of 5 cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of patients with dementia and/or parkinsonian disorders. *Arch Neurol* 69: 1445-52.

Han H, Weinreb PH, Lansbury PT Jr (1995) The core Alzheimer's peptide NAC forms amyloid fibrils which seed and are seeded by beta-amyloid: is NAC a common trigger or target in neurodegenerative disease? *Chem Biol* 2: 163-9.

Hartmann C, Massart DL, McDowall RD (1994) An analysis of the Washington Conference Report on bioanalytical method validation. *J Pharm Biomed Anal* 12: 1337-43.

Hashimoto M, Hsu LJ, Sisk A, Xia Y, Takeda A, Sundsmo M, and Masliah E (1998) Human recombinant NACP/alpha-synuclein is aggregated and fibrillated in vitro: relevance for Lewy body disease. *Brain Res* 799: 301-6.

Heo JY, Park JH, Kim SJ, Seo KS, Han JS, Lee SH, Kim JM, Park JI, Park SK, Lim K, Hwang BD, Shong M, Kweon GR (2012) DJ-1 null dopaminergic neuronal cells exhibit defects in mitochondrial function and structure: involvement of mitochondrial complex I assembly. *PLoS One* 7: e32629.

Hernández-Alcoceba R, Saniger L, Campos J, Núñez MC, Khaless F, Gallo MA, Espinosa A, Lacal JC (1997) Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design. *Oncogene* 15: 2289-301.

Hilker R, Schweitzer K, Coburger S, Ghaemi M, Weisenbach S, Jacobs AH, Rudolf J, Herholz K, Heiss WD (2005) Nonlinear progression of Parkinson disease as determined by serial positron emission tomographic imaging of striatal fluorodopa F 18 activity. *Arch Neurol* 62: 378-82.

Hoepken HH, Gispert S, Azizov M, Klinkenberg M, Ricciardi F, Kurz A, Morales-Gordo B, Bonin M, Riess O, Gasser T, Kögel D, Steinmetz H, Auburger G (2008) Parkinson patient fibroblasts show increased alpha-synuclein expression. *Exp Neurol* 212: 307-13.

Hong DP, Xiong W, Chang JY, Jiang C (2011) The role of the C-terminus of human α -synuclein: intra-disulfide bonds between the C-terminus and other regions stabilize non-fibrillar monomeric isomers. *FEBS Lett* 585: 561-6.

Hong Z, Shi M, Chung KA, Quinn JF, Peskind ER, Galasko D, Jankovic J, Zabetian CP, Leverenz JB, Baird G, Montine TJ, Hancock AM, Hwang H, Pan C, Bradner J, Kang UJ, Jensen PH, Zhang J (2010) DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain* 133: 713-26.

Hoyer W, Antony T, Cherny D, Heim G, Jovin TM, Subramaniam V (2002) Dependence of alpha-synuclein aggregate morphology on solution conditions. *J Mol Biol* 322: 383-93.

Jakes R, Spillantini MG, Goedert M (1994) Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett* 345: 27-32.

Jankovic J (2005) Progression of Parkinson disease: are we making progress in charting the course? *Arch Neurol* 62: 351-2.

Jellinger KA (2008) A critical reappraisal of current staging of Lewy-related pathology in human brain. *Acta Neuropathol* 116: 1-16.

Jellinger KA (2003a) General aspects of neurodegeneration. *J Neural Transm Suppl* 65: 101-44.

Jellinger KA (2003b) Alpha-synuclein pathology in Parkinson's and Alzheimer's disease brain: incidence and topographic distribution--a pilot study. *Acta Neuropathol* 106: 191-201.

Jones D, Morgan C, Cockcroft S (1999) Phospholipase D and membrane traffic. Potential roles in regulated exocytosis, membrane delivery and vesicle budding. *Biochim. Biophys Acta* 1439: 229-44.

Kalinderi K, Bostantjopoulou S, Fidani L (2016) The genetic background of Parkinson's disease: current progress and future prospects [online]. *Acta Neurol Scand* DOI: 10.1111/ane.12563.

Kang JH, Irwin DJ, Chen-Plotkin AS, Siderowf A, Caspell C, Coffey CS, Waligórska T, Taylor P, Pan S, Frasier M, Marek K, Kiebertz K, Jennings D, Simuni T, Tanner CM, Singleton A, Toga AW, Chowdhury S, Mollenhauer B, Trojanowski JQ, Shaw LM (2013) Association of cerebrospinal fluid β -amyloid 1-42, T-tau, P-tau181, and α -synuclein levels with clinical features of drug-naive patients with early Parkinson disease. *JAMA Neurol* 70: 1277-87.

Kamp F, Exner N, Lutz AK, Wender N, Hegermann J, Brunner B, Nuscher B, Bartels T, Giese A, Beyer K, Eimer S, Winklhofer KF, Haass C (2010) Inhibition of mitochondrial fusion by α -synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *EMBO J* 29: 3571-89.

Karnes HT, Shiu G, Shah VP (1991) Validation of bioanalytical methods. *Pharm Res* 8: 421-6.

Kasuga K, Ikeuchi T (2012) Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers for dementia with lewy bodies. *Brain Nerve* 64: 505-13.

Kiely AP, Asi YT, Kara E, Limousin P, Ling H, Lewis P, Proukakis C, Quinn N, Lees AJ, Hardy J, Revesz T, Houlden H, Holton JL (2013) α -Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? *Acta Neuropathol* 125: 753-69.

Kim TD, Paik SR, Yang CH (2002) Structural and functional implications of C-terminal regions of alpha-synuclein. *Biochemistry* 41: 13782-90.

Klatka LA, Schiffer RB, Powers JM, Kazee AM (1996) Incorrect diagnosis of Alzheimer's disease. A clinicopathologic study. *Arch Neurol* 53: 35-42.

Koller WC, Montgomery EB (1997) Issues in the early diagnosis of Parkinson's disease. *Neurology* 49: 10-25.

Krüger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Eppelen JT, Schols L, Riess O (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18: 106-8.

Lashuel HA, Overk CR, O'Uerlati A, Masliah E (2013) The many faces of α -Synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat Rev Neurosci* 1: 38-48.

Laske C, Fallgatter AJ, Stransky E, Hagen K, Berg D, Maetzler W (2011) Decreased α -synuclein serum levels in patients with Lewy body dementia compared to Alzheimer's disease patients and control subjects. *Dement Geriatr Cogn Disord* 31: 413-6.

Lavedan C, Leroy E, Dehejia A, Buchholtz S, Dutra A, Nussbaum RL, Polymeropoulos MH (1998) Identification, localization and characterization of the human gamma-synuclein gene. *Hum Genet* 103, 106-12.

Lee PH, Lee G, Park HJ, Bang OY, Joo IS, Huh K (2006) The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neural Transm* 113: 1435-9.

Leverenz JB, Watson GS, Shofer J, Zabetian CP, Zhang J, Montine TJ (2011) Cerebrospinal fluid biomarkers and cognitive performance in non-demented patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 17: 61-4.

Lewis KA, Su Y, Jou O, Ritchie C, Foong C, Hynan LS, White CL 3rd, Thomas PJ, Hatanpaa KJ (2010) Abnormal neurites containing C-terminally truncated alpha-synuclein are present in Alzheimer's disease without conventional Lewy body pathology. *Am J Pathol* 177: 3037-50.

Li QX, Mok SS, Laughton KM, McLean CA, Cappai R, Masters CL, Culvenor JG, Horne MK (2007) Plasma alpha-synuclein is decreased in subjects with Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 204: 583-8.

Lorenzen N, Lemminger L, Pedersen JN, Nielsen SB, Otzen DE (2014) The N-terminus of α -synuclein is essential for both monomeric and oligomeric interactions with membranes. *FEBS Lett* 588: 497-502.

Litic S, Perovic M, Mladenovic A, Raicevic N, Ruzdijic S, Rakic L, Kanazir S (2004) Alpha-synuclein is expressed in different tissues during human fetal development. *J Mol Neurosci* 22: 199-204.

Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D (2008) *Der Experimentator: Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, München.

Maita C, Tsuji S, Yabe I, Hamada S, Ogata A, Maita H, Iguchi-Ariga SM, Sasaki H, Ariga H (2008) Secretion of DJ-1 into the serum of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 431: 86-9.

Mata IF, Shi M, Agarwal P, Chung KA, Edwards KL, Factor SA, Galasko DR, Ginghina C, Griffith A, Higgins DS, Kay DM, Kim H, Leverenz JB, Quinn JF, Roberts JW, Samii A, Snapinn KW, Tsuang DW, Yearout D, Zhang J, Payami H, Zabetian CP (2010) SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level. *Arch Neurol* 67: 1350-6.

Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH (1988) Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 8, 2804-15.

Maroteaux L, Scheller RH (1991) The rat brain synucleins; family of proteins transiently associated with neuronal membrane. *Brain Res Mol Brain Res* 11: 335-43.

McKeith IG, Dickson DW, Lowe J, Emre M, O'Brien JT, Feldman H, Cummings J, Duda JE, Lippa C, Perry EK, Aarsland D, Arai H, Ballard CG, Boeve B, Burn DJ, Costa D, Del Ser T, Dubois B, Galasko D, Gauthier S, Goetz CG, Gomez-Tortosa E, Halliday G, Hansen LA, Hardy J, Iwatsubo T, Kalaria RN, Kaufer D, Kenny RA, Korczyn A, Kosaka K, Lee VM, Lees A, Litvan I, Londos E, Lopez OL, Minoshima S, Mizuno Y, Molina JA, Mukaetova-Ladinska EB, Pasquier F, Perry RH, Schulz JB, Trojanowski JQ, Yamada M; Consortium on DLB (2005) Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology* 65: 1863-72.

McCoy MK, Cookson MR (2011) DJ-1 regulation of mitochondrial function and autophagy through oxidative stress. *Autophag* 7: 531-2.

Meuvis J, Gerard M, Desender L, Baekelandt V, Engelborghs Y (2010) The conformation and the aggregation kinetics of α -synuclein depend on the proline residues in its C-terminal region. *Biochemistry* 49: 9345-52.

Mohammad K, Esen A (1989) A blocking agent and a blocking step are not needed in ELISA, immunostaining dot-blot and western blots. *J Immunol Methods* 117: 141-5.

Mollenhauer B, Trautmann E, Taylor P, Manninger P, Sixel-Döring F, Ebentheuer J, Trenkwalder C, Schlossmacher MG (2013) Total CSF α -synuclein is lower in de novo Parkinson patients than in healthy subjects. *Neurosci Lett* 532: 44-8.

Mollenhauer B, Locascio JJ, Schulz-Schaeffer W, Sixel-Döring F, Trenkwalder C, Schlossmacher MG (2011) α -Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: a cohort study. *Lancet Neurol* 10: 230-40.

Mollenhauer B, Cullen V, Kahn I, Krastins B, Outeiro TF, Pepivani I, Ng J, Schulz-Schaeffer W, Kretschmar HA, McLean PJ, Trenkwalder C, Sarracino DA, Vonsattel JP, Locascio JJ, El-Agnaf OM, Schlossmacher MG (2008) direct quantification of CSF alpha-synuclein by ELISA and first cross-sectional study in patients with neurodegeneration. *Exp Neurol* 2: 315-25.

Munishkina LA, Phelan C, Uversky VN, Fink AL (2003) Conformational behavior and aggregation of alpha-synuclein in organic solvents: modeling the effects of membranes. *Biochemistry* 42: 2720-30.

Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VM (2000) Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci* 20: 3214-20.

Ohrfelt A, Grognet P, Andreasen N, Wallin A, Vanmechelen E, Blennow K, Zetterberg H (2009) Cerebrospinal fluid alpha-synuclein in neurodegenerative disorders-a marker of synapse loss? *Neurosci Lett* 450: 332-5.

Park MJ, Cheon SM, Bae HR, Kim SH, Kim JW (2011) Elevated levels of α -synuclein oligomer in the cerebrospinal fluid of drug-naïve patients with Parkinson's disease. *J Clin Neurol* 7: 215-22.

Parnetti L, Chiasserini D, Bellomo G, Giannandrea D, De Carlo C, Qureshi MM, Ardah MT, Varghese S, Bonanni L, Borroni B, Tambasco N, Eusebi P, Rossi A, Onofri M, Padovani A, Calabresi P, El-Agnaf O (2011) Cerebrospinal fluid Tau/ α -synuclein ratio in Parkinson's disease and degenerative dementias. *Mov Disord* 26: 1428-35.

Paulie S, Perlmann P, Perlmann H (2006) Enzyme-linked Immunosorbent Assay. (Hrsg) Celis JE, Hunter T, Carter N, Simons K, Small K, Shotton D. *Cell Biology, Four-Volume Set: Cell Biology: A Laboratory Handbook, Third Edition, Volume 1*. Elsevier Academic Press Inc, 533-8.

Periquet M, Fulga T, Myllykangas L, Schlossmacher MG, Feany MB (2007) Aggregated alpha-synuclein mediates dopaminergic neurotoxicity in vivo. *J Neurosci* 27: 3338-46.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045-7.

Porstmann T, Kiessig ST (1992) Enzyme-Immunoassays Techniques. An Overview. *J Immunol Methods* 150: 5-21.

Pratt RP, Roser B (1989) Comparison of blocking agents for ELISA. *Thermo Scientific Nunc Bulletin* 7: 1-3.

Raem AM, Rauch P (2007) *Immunoassays*. Spektrum Akademischer Verlag (Elsevier GmbH), München.

Rahkonen T, Eloniemi-Sulkava U, Rissanen S, Vatanen A, Viramo P, Sulkava R (2003) Dementia with Lewy bodies according to the consensus criteria in a general population aged 75 years or older. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74: 720-4.

Ravindranath MH, Ravindranath RM, Morton DL, Graves MC (1994) Factors affecting the fine specificity and sensitivity of serum antiganglioside antibodies in ELISA. *J Immunol Methods* 169: 257-72.

Roberts HL, Brown DR (2015) Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric α -synuclein. *Biomolecules* 5: 282-305.

Shannon KM, Keshavarzian A, Dodiya HB, Jakate S, Kordower JH (2012) Is alpha-synuclein in the colon a biomarker for premotor Parkinson's disease? Evidence from 3 cases. *Mov Disord* 27: 716-9.

Shendelman S, Jonason A, Martinat C, Leete T, Abeliovich A (2004) DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biol* 2: e362.

Shi M, Bradner J, Hancock AM, Chung KA, Quinn JF, Peskind ER, Galasko D, Jankovic J, Zabetian CP, Kim HM, Leverenz JB, Montine TJ, Ginchina C, Kang UJ, Cain KC, Wang Y, Aasly J, Goldstein D, Zhang J (2011) Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression. *Ann Neurol* 69: 570-80.

Shi M, Zabetian CP, Hancock AM, Ginchina C, Hong Z, Yearout D, Chung KA, Quinn JF, Peskind ER, Galasko D, Jankovic J, Leverenz JB, Zhang J (2010) Significance and confounders of peripheral DJ-1 and alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 480: 78-82.

Shim YS, Roe CM, Buckles VD, Morris JC (2013) Clinicopathologic study of Alzheimer's disease: Alzheimer mimics. *J Alzheimers Dis* 35: 799-811.

Siderowf A, Xie SX, Hurtig H, Weintraub D, Duda J, Chen-Plotkin A, Shaw LM, Van Deerlin V, Trojanowski JQ, Clark C (2010) CSF amyloid β 1-42 predicts cognitive decline in Parkinson disease. *Neurology* 75: 1055-61.

Sidhu A, Wersinger C, Vernier P (2004) Does alpha-synuclein modulate dopaminergic synaptic content and tone at the synapse? *Faseb J* 18: 637-47.

Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K (2003) Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302: 841.

Smith LM, Schiess MC, Coffey MP, Klaver AC, Loeffler DA (2012) α -Synuclein and anti- α -synuclein antibodies in Parkinson's disease, atypical Parkinson syndromes, REM sleep behavior disorder, and healthy controls. *PLoS One* 7: e52285.

Spatola M, Wider C (2014) Genetics of Parkinson's disease: the yield. *Parkinsonism Relat Disord* 20: 35-8.

- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388: 839-40.
- Stefanis L (2012) α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a009399.
- Surgucheva I, Weisman AD, Goldberg JL, Shnyra A, Surguchov A (2008) Gamma-synuclein as a marker of retinal ganglion cells. *Mol Vis* 14: 540-8.
- Surguchov A, Surgucheva I, Solessio E, Baehr W (1999) Synoretin-A new protein belonging to the synuclein family. *Mol Cell Neurosci* 13: 95-103.
- Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Arigo SM, Takahashi K, Ariga H (2004) DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* 5: 213-8.
- Tinsley RB, Kotschet K, Modesto D, Ng H, Wang Y, Nagley P, Shaw G, Horne MK (2010) Sensitive and specific detection of alpha-synuclein in human plasma. *J Neurosci Res* 88: 2693–700.
- Tokuda T, Qureshi MM, Ardah MT, Varghese S, Shehab SA, Kasai T, Ishigami N, Tamaoka A, Nakagawa M, El-Agnaf OM (2010) Detection of elevated levels of α -synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology* 75: 1766-72.
- Tokuda T, Salem SA, Allsop D, Mizuno T, Nakagawa M, Qureshi MM, Locascio JJ, Schlossmacher MG, El-Agnaf OM (2006) Decreased alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 162-6.
- Uéda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T (1993) Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* 90: 11282-6.
- Uversky VN (2007) Neuropathology, biochemistry and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem* 103: 17-37.
- Uversky VN, Lee HJ, Li J, Fink AL, Lee SJ (2001a) Stabilization of partially folded conformation during alpha-synuclein oligomerization in both purified and cytosolic preparations. *J Biol Chem* 276: 43495-8.
- Uversky VN, Li J, Fink AL (2001b) Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation. *J Biol Chem* 276: 10737-44.
- Vogt RF Jr, Phillips DL, Henderson LO, Whitfield W, Spierto FW (1987) Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. *J Immunol Methods* 101: 43-50.

Wakabayashi K, Mori F, Tanji K, Orimo S, Takahashi H (2010) Involvement of the peripheral nervous system in synucleinopathies, tauopathies and other neurodegenerative proteinopathies of the brain. *Acta Neuropathol* 120: 1-12.

Wakabayashi K, Takahashi H (1997) Neuropathology of autonomic nervous system in Parkinson's disease. *Eur Neurol* 38: 2-7.

Waragai M, Wei J, Fujita M, Nakai M, Ho GJ, Masliah E, Akatsu H, Yamada T, Hashimoto M (2006) Increased level of DJ-1 in the cerebrospinal fluids of sporadic Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 34: 967-72.

Wenning GK, Jellinger KA (2005) The role of alpha-synuclein in the pathogenesis of multiple system atrophy. *Acta Neuropathol* 109: 129-40.

Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT Jr (1996) NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35: 13709-15.

Wollschläger D (2010) *R kompakt: Der schnelle Einstieg in die Datenanalyse*. Springer, Berlin.

Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Munoz DG, de Yébenes JG (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55: 164-73.

Zhou W, Freed CR (2005) DJ-1 up-regulates glutathione synthesis during oxidative stress and inhibits A53T alpha-synuclein toxicity. *J Biol Chem* 280: 43150-8.

VII Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität zu Tübingen unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Batra durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Köhler und Frau Stransky.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Stransky von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Herrn Höfler eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 08.03.2016

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Batra für die Möglichkeit, in seiner Klinik an der Dissertation zu arbeiten und für die Betreuung während dieser Zeit. Den freundlichen Kontakt und die hilfreiche Zusammenarbeit wusste ich stets zu schätzen.

Ebenfalls möchte ich Frau Stransky für die sehr gute Einarbeitung und Betreuung meiner Laborarbeiten und die wertvolle Unterstützung bei allen Abschnitten meiner Arbeit danken. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Köhler.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mich immer unterstützt und zum maßgeblichen Gelingen der Dissertation beigetragen haben. Für die zahlreichen Gespräche und Hilfestellungen möchte ich mich zudem bei Daniel, Ogi, Jelena und Adina bedanken.