

# **Entwicklung eines diagnostischen Assays zum Nachweis von alpha-Synuclein-Aggregaten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-  
Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Anja Schaffrath**

aus Eschweiler

Düsseldorf, Dezember 2022

aus dem Institut für Physikalische Biologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Gültekin Tamgüney
2. Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2023

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ferner erkläre ich, dass ich in keinem anderen Dissertationsverfahren mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen.

Düsseldorf, 22. Dezember 2022

---

Anja Schaffrath

## Abkürzungsverzeichnis

### Abkürzung

---

<b>A<math>\beta</math></b>	Amyloid-beta
<b>AD</b>	Alzheimer-Erkrankung (engl.: <i>Alzheimer's disease</i> )
<b>AF</b>	Autofluoreszenz
<b>AK</b>	Antikörper
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>AUC</b>	Fläche unter der Kurve (engl.: <i>area under the curve</i> )
<b><math>\alpha</math>-Syn</b>	$\alpha$ -Synuclein
<b>BC</b>	Pufferkontrolle (engl.: <i>buffer control</i> )
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>BS</b>	The Blocking Solution
<b>CC</b>	Fänger-AK-Kontrolle (engl.: <i>capture control</i> )
<b>CCCSS</b>	Cleveland-Clinics-Obstipations Punktesystem (engl.: Cleveland Clinic Constipation Scoring System)
<b>CD7</b>	Celldiscoverer 7
<b>CV%</b>	Varianzkoeffizient (engl.: <i>coefficient of variation</i> )
<b>DC</b>	Detektions-AK-Kontrolle (engl.: <i>detection control</i> )
<b>DLB</b>	Demenz mit Lewy-Körperchen (engl.: <i>dementia with Lewy bodies</i> )
<b>ELISA</b>	Enzymgekoppelter Immunabsorptionsassay (engl.: Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
<b>ENS</b>	Enterisches Nervensystem
<b>GFAP</b>	Saures Gliafaserprotein (engl.: <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
<b>GIT</b>	Gastrointestinaltrakt
<b>HC</b>	Gesunde Kontrolle (engl.: <i>healthy control</i> )
<b>IB</b>	Inklusionskörper (engl.: <i>Inklusion body</i> )
<b>iRBD</b>	Isolierte REM-Schlaf-Verhaltensstörung (engl.: <i>isolated rapid eye movement (REM) sleep behavior disorder</i> )
<b>LB</b>	Lewy-Körperchen (engl.: <i>Lewy bodies</i> )
<b>LCT</b>	Levodopa-Herausforderungstest (engl.: <i>Levodopa challenge test</i> )
<b>LN</b>	Lewy-Neuriten (engl.: <i>Lewy neurites</i> )
<b>LOD</b>	Nachweisgrenze (engl.: <i>limit of detection</i> )
<b>MDS</b>	Movement Disorder Society
<b>MDS-UPDRS III</b>	Skala zur Verlaufsbeobachtung bei PD Teil III (engl.: Movement Disorder Society's Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part III)
<b>MP</b>	Milchpulver
<b>MSA</b>	Multisystematrophie



---

<b>MRT</b>	Magnetresonanztomografie
<b>N/A</b>	Nicht vorhanden oder nicht durchgeführt (engl.: <i>not available</i> )
<b>NAC</b>	Nicht-A $\beta$ -Komponente (engl.: <i>non-A<math>\beta</math> component</i> )
<b>NACAP</b>	Nicht-A $\beta$ -Komponente des AD-Plaques-Vorläufers (engl.: <i>non-A<math>\beta</math> component of AD plaque precursor</i> )
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Natriumhydrogencarbonat
<b>NFL</b>	Neurofilament-Leichtkette (engl.: <i>neurofilament light chain</i> )
<b>NMSS</b>	Skala zur Erfassung nicht-motorischer Symptome (engl.: <i>Non-Motor Symptoms Scale</i> )
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate-buffered saline</i> )
<b>PC</b>	ProClin
<b>PD</b>	Parkinson-Krankheit (engl.: <i>Parkinson's disease</i> )
<b>PET</b>	Positronen-Emissions-Tomografie
<b>PI</b>	Proteaseinhibitor
<b>PKV</b>	Proben-Kontroll-Verhältnis
<b>PMT</b>	Photovervielfacher (engl.: <i>photomultiplier tube</i> )
<b>PNS</b>	Peripheres Nervensystem
<b>PSG</b>	Polysomnografie
<b>PTA</b>	Phosphorwolframsäure Hydrat (engl.: <i>sodium phosphotungstate hydrate</i> )
<b>PTMs</b>	Posttranslationale Modifikationen (engl.: <i>posttranslational modifications</i> )
<b>RBD</b>	REM-Schlaf-Verhaltensstörung (engl.: <i>rapid eye movement (REM) sleep behavior disorder</i> )
<b>RBDSQ</b>	iRBD-Screening-Fragebogen (engl.: <i>iRBD screening questionnaire</i> )
<b>ROC</b>	Grenzwertoptimierungskurve (engl.: <i>Receiver-operator characteristics</i> )
<b>SB</b>	SmartBlock
<b>SD</b>	Standardabweichung (engl.: <i>standard deviation</i> )
<b>SiNaPs</b>	Silikananopartikel
<b>sFIDA</b>	Oberflächenbasierte Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungs-Analyse (engl.: <i>surface-based fluorescence intensity distribution analysis</i> )
<b>SNpc</b>	Substantia nigra Pars compacta
<b>SPECT</b>	Einzelphotonen-Emissionscomputertomografie (engl.: <i>single photon emission computed tomography</i> )
<b>SRV</b>	Signal-Rausch-Verhältnis
<b>TEM</b>	Transmissionselektronenmikroskopie
<b>TIR</b>	Totale interne Reflexion
<b>TIRFM</b>	Interne Totalreflektionsfluoreszenzmikroskopie (engl.: <i>total internal reflection fluorescence microscopy</i> )
<b>ü. N.</b>	Über Nacht

---

---

<b>WT</b>	Wildtyp
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

---

**Einbuchstabencode der Aminosäuren**

A Alanin

C Cystein

G Glycin

H Histidin

L Leucin

N Asparagin

P Prolin

R Arginin

T Threonin

---

## Zusammenfassung

Fehlgefaltetes und aggregiertes  $\alpha$ -Synuclein ( $\alpha$ -Syn) ist das pathologische Merkmal von Synucleinopathien wie der Parkinson-Krankheit (PD), der Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB) und der Multisystematrophie (MSA). Daher werden Aggregate aus oligomerem und fibrillärem  $\alpha$ -Syn als vielversprechende Biomarker für die Entwicklung diagnostischer Tests und für die Arzneimittelentwicklung gesehen. Ein wertvoller Biomarker für die Diagnose von PD sollte eine frühzeitige Diagnose der Krankheit ermöglichen, bevor die neuronale Funktionalität irreversibel verloren geht und sich neurologische Symptome manifestieren. Die quantitative Messung von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Körperflüssigkeiten wie Liquor stellt eine Herausforderung dar, da hochempfindliche und spezifische Assays benötigt werden. In der Vergangenheit konzentrierte sich ein Großteil der Forschung auf die Quantifizierung von  $\alpha$ -Syn-Oligomeren in Liquor. Jedoch haben jüngste Studien gezeigt, dass pathologisches  $\alpha$ -Syn bei einigen Patienten in Geweben des Gastrointestinaltrakts (GIT) nachgewiesen werden kann. Dies deutet darauf hin, dass  $\alpha$ -Syn-Aggregate auch in Stuhl ausgeschieden werden.

In dieser Arbeit wurde der Oberflächenbasierte Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungs-Analyse (sFIDA, engl.: *surface-based fluorescence intensity distribution analysis*)-Assay verifiziert, einzelne Partikel von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhl zu detektieren und zu quantifizieren. Dazu wurden synthetische  $\alpha$ -Syn-Aggregate und Silikananopartikel (SiNaPs) als Standardanalyten sowie humane Stuhlproben für die Assayverifizierung verwendet. Anschließend wurde der sFIDA-Assay technisch auf seine Spezifität und Selektivität für  $\alpha$ -Syn-Aggregate validiert.

Nach erfolgreicher Validierung wurden  $\alpha$ -Syn-Aggregate in Stuhlproben von 94 Personen mit PD, 72 mit isolierter REM-Schlafverhaltensstörung (iRBD) und 51 ohne diagnostizierte neurologische Störung, die gesunde Kontrollen darstellen, quantifiziert. Hierbei wurden signifikant erhöhte Konzentrationen von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhl von iRBD-Patienten mit einer medianen Konzentration von 9,2 fM im Vergleich zu denen von gesunden Kontrollen (HC, engl.: *healthy controls*) mit einer Konzentration von 5,2 fM ( $p = 0,024$ ) oder PD-Patienten mit einer Konzentration von 3,8 fM ( $p < 0,001$ ) gemessen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass  $\alpha$ -Syn-Aggregate in Stuhl ausgeschieden werden und mit dem sFIDA-Assay gemessen werden können, was die Diagnose von prodromalen Synucleinopathien unterstützen könnte. Schließlich könnte der sFIDA-Assay bei klinischen Studien zur Krankheitsmodifikation von Nutzen sein, indem die Konzentrationen von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhlproben vor und während der Behandlung überwacht werden. Durch die nicht-invasive Methode der Probengewinnung ist eine longitudinale Überwachung vereinfacht und häufige Probennahme für eine lückenlose Überwachung möglich.

---

## Abstract

Misfolded and aggregated  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) is the pathological hallmark of synucleinopathies like Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies (DLB), and multiple system atrophy (MSA). Thus, assemblies of oligomeric and fibrillar  $\alpha$ -syn are regarded as promising biomarkers for the development of diagnostic assays and novel targets for drug development. A valuable biomarker for PD diagnosis should allow disease detection at early stages before neuronal functionality is irreversibly lost and neurological symptoms manifest. The quantitative measurement of  $\alpha$ -syn aggregates in body fluids such as cerebrospinal fluid poses a challenge since highly sensitive and specific assays are needed. In the past, much research has focused on cerebrospinal fluid for  $\alpha$ -syn oligomer quantification. Recent studies, however, have shown that pathologic  $\alpha$ -syn can be detected in gastrointestinal tract tissues in some patients, suggesting that  $\alpha$ -syn aggregates may also be shed into stool.

In this work, the surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA)-assay was verified to detect and quantify single particles of  $\alpha$ -syn aggregates in stool. For this, synthetic  $\alpha$ -syn aggregates and silica nanoparticles (SiNaPs) as standard analytes and human stool homogenates were used for the verification of the assay. Subsequently, the sFIDA-assay was technically validated for its specificity and selectivity for  $\alpha$ -syn aggregates.

After successful validation of the sFIDA, stool samples of 94 individuals with PD, 72 with isolated rapid eye movement sleep behavior disorder (iRBD), and 51 without any diagnosed neurological disorder, representing healthy controls were quantified. Significantly elevated concentrations of  $\alpha$ -syn aggregates in stool of iRBD patients with a median concentration of 9.2 fM versus those of healthy controls (HC) with a median concentration of 5.2 fM ( $p = 0.024$ ) or PD patients with a median concentration of 3.8 fM, ( $p < 0.001$ ) were measured. The results show that  $\alpha$ -synuclein aggregates are excreted in stool and can be measured using the sFIDA assay, which could support the diagnosis of prodromal synucleinopathies. Finally, sFIDA could provide insight into potential disease modification in clinical trials by monitoring concentrations of  $\alpha$ -syn aggregates in stool samples before and during treatment. Due to the non-invasive method of sample collection, longitudinal monitoring is simplified and frequent sampling for consistent monitoring is possible.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis . . . . .	iv
Zusammenfassung . . . . .	vii
Abstract . . . . .	viii
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>ix</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Parkinson-Krankheit . . . . .	1
1.1.1 Klinische Merkmale . . . . .	3
1.1.2 Diagnose und Behandlung . . . . .	4
1.1.3 Neuropathologie . . . . .	6
1.1.4 Hypothesen zum Ursprung der $\alpha$ -Syn-Pathologie in PD . . . . .	9
1.2 $\alpha$ -Synuclein . . . . .	10
1.2.1 Struktur und physiologische Rolle . . . . .	10
1.2.2 Rolle von $\alpha$ -Syn in Synucleinopathien . . . . .	12
1.3 Oberflächenbasierte Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungs-Analyse (sFIDA)-Assay .	13
1.3.1 Interne Totalreflektionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF-Mikroskopie) und konfokale Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	16
1.3.2 Assayentwicklung . . . . .	18
1.3.2.1 Assayverifizierung . . . . .	18
1.3.2.2 Prozessentwicklung und Assayvalidierung . . . . .	22
1.4 Zielsetzung . . . . .	23
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1 Material . . . . .	24
2.1.1 Verwendete Puffer und Lösungen . . . . .	24
2.1.2 Verwendete Antikörper und Fluorophore . . . . .	27
2.2 Methoden . . . . .	28
2.2.1 Synthese Protein-gekoppelter Silikananopartikel (SiNaPs) . . . . .	28
2.2.1.1 Charakterisierung der SiNaPs . . . . .	29
2.2.2 Herstellung synthetischer Aggregate . . . . .	29
2.2.3 Antikörperkonjugierung . . . . .	29
2.3 Patienten . . . . .	31
2.4 Probenvorbereitung . . . . .	33
2.4.1 Stuhlhomogenisierung . . . . .	33
2.4.2 Natrium-phosphorwolframat (PTA)-Fällung von Stuhlproben . . . . .	33

2.5	sFIDA-Assayprotokoll . . . . .	34
2.5.1	Allgemeiner Ablauf des sFIDA-Assays . . . . .	34
2.5.2	Assayvalidierung und analytische Validierung . . . . .	35
2.5.2.1	Exp. 1: Titration des Fänger-AK und Test einer neuen Detektions-AK-Kombination . . . . .	45
2.5.2.2	Exp. 2: Test einer neuen Detektions-AK-Kombination mit dem EP-1536Y-AK gegen phosphoryliertes Serin 129 . . . . .	45
2.5.2.3	Exp. 3: Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Extraktion sowie Vergleich der Inkubationstemperatur und -zeit der Proben . . . . .	45
2.5.2.4	Exp. 4: Test des EP1536Y-AK als Fänger-AK . . . . .	46
2.5.3	Assayentwicklung zur Verringerung der Autofluoreszenz . . . . .	46
2.5.3.1	Exp. 5: Anpassung des Stuhlproben-Verdünnungspuffers . . . . .	47
2.5.3.2	Exp. 6: Auswahl des blockierenden Reagenzes und Vergleich von Stuhlprobenverdünnungen . . . . .	47
2.5.3.3	Exp. 7: Anpassung der Inkubationszeit des Blockierens und des Blockierungspuffers . . . . .	48
2.5.3.4	Exp. 8: Vergleich verschiedener Fänger-AK . . . . .	48
2.5.3.5	Exp. 9: Vergleich des Stuhl-Extraktionspuffers . . . . .	49
2.5.3.6	Exp. 10: Vergleich von frischen und gefrorenen Replikaten und Reproduzierbarkeit der Stuhlextraktion . . . . .	49
2.5.4	Assayvalidierung am IN Cell Analyzer 6500HS-Mikroskop . . . . .	50
2.5.4.1	Exp. 11: Vergleich von Stuhl-Verdünnungen . . . . .	50
2.5.4.2	Exp. 12: Titration der Detektions-AK-Konzentration und Vergleich von Fluorophor-Kombinationen . . . . .	50
2.5.4.3	Exp. 13: Analytische Validierung: Wiederfindungsrate von $\alpha$ -Syn-Aggregaten in verschiedenen Stuhlverdünnungen . . . . .	50
2.5.4.4	Exp. 14: PTA-Fällung von Stuhlproben . . . . .	51
2.5.4.5	Exp. 15: Vergleich verschiedener Fänger- und Detektions-AK . . . . .	51
2.5.4.6	Exp. 16: Vergleich des 4B21- und Syn211-AK als Detektions-AK . . . . .	52
2.5.5	Abschließende Assayvalidierung . . . . .	53
2.5.5.1	<i>Inter-Assay</i> Messungen . . . . .	54
2.5.5.2	Immundepletion . . . . .	54
2.6	Datenaufnahme und -analyse . . . . .	55
2.6.1	Datenaufnahme . . . . .	55
2.6.2	Datenanalyse . . . . .	56
2.6.3	Statistik . . . . .	57
2.6.3.1	Generelle Statistik . . . . .	57
2.6.3.2	Kalibrierung innerhalb der diagnostischen Validierung . . . . .	57

2.6.3.3	ROC-Analyse . . . . .	58
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>59</b>
3.1	Assayvalidierung und analytische Validierung . . . . .	59
3.1.1	Titration des Fänger-AK und Test einer neuen Detektions-AK-Kombination	59
3.1.2	Test einer neuen Detektions-AK-Kombination mit dem EP1536Y-AK gegen phosphoryliertes Serin 129 . . . . .	62
3.1.3	Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Extraktion sowie Vergleich der Inkubationstemperatur und -zeit der Proben . . . . .	63
3.1.4	Test des EP1536Y-AK als Fänger-AK . . . . .	67
3.2	Assayentwicklung zur Verringerung der Autofluoreszenz . . . . .	69
3.2.1	Anpassung des Stuhlproben-Verdünnungspuffers . . . . .	69
3.2.2	Auswahl des blockierenden Reagenzes und Vergleich von Stuhlprobenverdünnungen . . . . .	71
3.2.3	Anpassung der Inkubationszeit des Blockierens und des Blockierungspuffers	75
3.2.4	Vergleich verschiedener Fänger-AK . . . . .	76
3.2.5	Vergleich des Stuhl-Extraktionspuffers . . . . .	80
3.2.6	Anpassung der Probenverdünnung . . . . .	82
3.2.7	Vergleich von frischen und gefrorenen Stuhlproben und Reproduzierbarkeit der Stuhlextraktion . . . . .	82
3.3	Assayvalidierung am IN Cell Analyzer 6500HS-Mikroskop . . . . .	86
3.3.1	Vergleich von Stuhlverdünnungen . . . . .	86
3.3.2	Titration der Detektions-AK-Konzentration und Vergleich von Fluorophor-Kombinationen . . . . .	88
3.3.3	Analytische Validierung: Wiederfindungsrate von $\alpha$ -Syn-Aggregaten in verschiedenen Stuhlverdünnungen . . . . .	94
3.3.4	PTA-Fällung von Stuhlproben . . . . .	96
3.3.5	Vergleich verschiedener Fänger- und Detektions-AK . . . . .	97
3.3.6	Vergleich des 4B12- und Syn211-AK als Detektions-AK . . . . .	103
3.4	Abschließende Assayvalidierung und Quantitative Messung aller Stuhlproben . .	104
3.4.1	Abschließende Assayvalidierung . . . . .	104
3.4.1.1	sFIDA-Messungen sind sehr selektiv für $\alpha$ -Syn-Aggregate . . . .	105
3.4.1.2	sFIDA-Messungen von $\alpha$ -Syn-SiNaPs und Stuhlproben zeigen eine geringe <i>Intra-Assay</i> -Varianz . . . . .	107
3.4.1.3	Wiederholte sFIDA-Messungen von $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhlproben weisen eine hohe <i>Inter-Assay</i> -Varianz auf . . . . .	108
3.4.1.4	Der sFIDA detektiert attomolare Konzentrationen von $\alpha$ -Syn-SiNaPs . . . . .	108

3.4.1.5	Eine Immundepletion entfernt $\alpha$ -Syn-Aggregate aus Stuhlproben	109
3.4.2	Quantitative Messung aller Stuhlproben	110
3.4.2.1	Deskriptive Analyse der Patienten- und Kontroll-Kohorten	110
3.4.2.2	$\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen sind in Stuhl von iRBD-Patienten erhöht	113
<b>4</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b>	<b>115</b>
4.1	$\alpha$ -Syn-Aggregate sind in Stuhl vorhanden und können mittels sFIDA-Assay nachgewiesen werden	115
4.2	Abschließende Assayvalidierung und quantitative Probenmessung	120
4.3	Limitierungen und Ausblick	123
<b>5</b>	<b>Anhang</b>	<b>I</b>
5.1	Anhang Material und Methoden	I
5.1.1	Anhang Material	I
5.1.2	Anhang Methoden	IV
5.1.2.1	Datenanalyse	IV
5.2	Anhang Ergebnisse	VI
5.2.1	Auswahl des blockierenden Reagenzes und Vergleich von Stuhlprobenverdünnungen	VI
5.2.2	Vergleich des Stuhl-Extraktionspuffers	VI
5.2.3	Vergleich von frischen und gefrorenen Replikaten und Reproduzierbarkeit der Stuhlextraktion	VI
5.2.4	Analytische Validierung: Wiederfindungsrate von $\alpha$ -Syn-Aggregaten in verschiedenen Stuhlverdünnungen	VI
5.2.5	sFIDA-Messungen von $\alpha$ -Syn-Aggregaten sind sehr selektiv	XIII
5.2.6	sFIDA-Messungen von $\alpha$ -Synuclein SiNaPs und Stuhlproben zeigen eine geringe <i>Intra-Assay</i> Varianz	XIII
5.2.7	Immundepletion entfernt $\alpha$ -Syn-Aggregate aus Stuhlproben	XIII
5.2.8	Deskriptive Analyse der Patienten- und Kontroll-Kohorten	XIII
5.2.9	$\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen sind in Stuhl von iRBD-Patienten erhöht	XXVIII
	Manuskript	XXX
	Danksagung	XXXI
	Abbildungsverzeichnis	XXXIII
	Tabellenverzeichnis	XXXV
	Referenzen	XXXVII



# 1 Einleitung

Neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer-Krankheit (AD, engl.: *Alzheimer's disease*) oder die Parkinson-Krankheit (PD, engl.: *Parkinson's disease*) nehmen mit der zunehmend alternenden Gesellschaft an Häufigkeit zu, weswegen eine Erforschung dieser Erkrankungen immer mehr an Bedeutung gewinnt. Neurodegeneration beschreibt dabei fortschreitende, irreversible pathologische Prozesse, die entweder zu einem Funktionsverlust oder zum Untergang von Neuronen in verschiedenen Gehirnregionen führen, wobei eine Ausbreitung der Neurodegeneration stattfindet und unter anderem zu Neuroinflammation, oxidativem Stress oder mitochondrialen Fehlfunktionen führt. Im Verlauf der Krankheiten führt dies dann zu distinktiven klinischen Ausprägungen je nach befallenen Gehirnregionen. Die Schädigung der Neuronen ist mit fehlgefalteten Proteinen, wie Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) oder  $\alpha$ -Synuclein ( $\alpha$ -Syn) verknüpft. Eine intra- und extrazelluläre Akkumulation dieser fehlgefalteten Proteine in Neuronen ist dabei das Hauptmerkmal neurodegenerativer Erkrankungen [1, 2].

## 1.1 Die Parkinson-Krankheit

PD ist die häufigste neurodegenerative Bewegungsstörung und zählt zu den Synucleinopathien [3]. Synucleinopathien sind durch die Oligomerisierung, Aggregation und Akkumulierung von  $\alpha$ -Syn mit  $\beta$ -Faltblattreichen Strukturen gekennzeichnet [4]. Nach der AD ist PD die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung mit einer Prävalenz von 0,3% in der Gesamtpopulation westlicher Staaten, die mit steigendem Alter zunimmt und bei über 60-Jährigen bei 0,5% – 1% liegt [3, 5]. Die jährliche Inzidenz von PD liegt bei 8–18 pro 100.000 Einwohnern, wobei Männer eine anderthalbfach höhere Inzidenz als Frauen aufweisen [5, 6]. Eine Erkrankung von unter 50-Jährigen ist sehr selten. Die meisten Menschen erkranken ab einem Alter von 60 Jahren an PD [5]. Die Lebenserwartung nach einer PD-Diagnose liegt zwischen 7 und 14 Jahren, wobei die Sterblichkeit stark durch erhöhtes Alter und Demenz zunimmt [7].

PD wurde 1817 erstmals von James Parkinson in seinem „*Essay on the Shaking Palsy*“ beschrieben, in dem er die kardinalen Motorsymptome Ruhetremor, Rigor, Bradykinesie und posturale Instabilität aufführte (Abbildung 1.1) [8].

Dabei ist PD durch den fortschreitenden Verlust von dopaminergen Neuronen hauptsächlich in der Substantia nigra Pars compacta (SNpc) und Ablagerungen von sogenannten Lewy-Körperchen (LB, engl.: *Lewy bodies*) oder Lewy-Neuriten (LN, engl.: *Lewy-neurites*), deren Hauptbestandteil aggregiertes  $\alpha$ -Syn ist, charakterisiert [5, 9]. Durch den Mangel des Neurotransmitters Dopamin im Striatum entsteht eine Fehlfunktion der motorischen Basalganglienschleifen. Defizite von striatalem Dopamin in den Präsynapsen, eine reduzierte Verfügbarkeit der striatalen



**Abbildung 1.1 – Motorische Symptome von Patienten mit PD.**

Patienten mit PD weisen diverse motorische Symptome auf, von denen die Kardinalsymptome Ruhetremor in Beinen und Händen, Rückensteifigkeit, Bradykinesie im Zusammenhang mit einem schlurfenden, kurzschrittigen Gang und verkürzten Armschwingungen sowie posturale Instabilität sind. Das Gesicht ist zudem oft maskenhaft, der Oberkörper nach vorne gebeugt und die Ellenbogen, Knie sowie die Hüfte leicht gekrümmt. Abbildung modifiziert nach Smith (2018) [12].

postsynaptischen Dopaminrezeptoren oder eine Kombination aus beidem sind die Ursache der Motorsymptome [10, 11].

PD ist eine multifaktorielle Erkrankung und die genauen Ursachen ihrer Entstehung sind noch nicht aufgeklärt. Die meisten PD-Fälle treten sporadisch auf, wobei nur 10% – 15% auf eine genetisch bedingte, familiäre Form zurückzuführen sind. Bei der sporadischen Form zählen unter anderem das Alter, genetische Prädispositionen sowie Faktoren wie Toxine, Rauchen und andere Umweltfaktoren zu den Risikofaktoren [13, 14]. PD verursachende Mutationen werden sowohl autosomal dominant als auch rezessiv vererbt. Die Patienten, die an familiärer PD erkranken, weisen Mutationen wie z. B. die Punktmutationen A53T oder A30P im  $\alpha$ -Syn Gen SNCA auf [15, 16]. Weitere bekannte Gene, in denen Mutationen familiäre PD verursachen, sind unter anderem PARK2, das für Parkin 2, PINK1, das für die PTEN-induzierte Kinase 1, PARK7, das für die Proteindeglykase DJ-1, LRRK2, das für die Leucinreiche-Repeat-Serin/Threoninkinase 2, BST1, das für das Bone Marrow Stromal Cell Antigen 1 und MAPT, das für das Tau-Protein codiert [5, 17–

22]. Bisher konnten über 90 genetische Risiko-Loci identifiziert werden, die mit PD in Zusammenhang gebracht wurden [17]. Diese erblichen Formen von PD werden wie auch die sporadische Form von  $\alpha$ -Syn-Aggregation, mitochondrialen Fehlfunktionen, Beeinträchtigungen bei der Autophagie und oxidativem Stress in der Zelle begleitet [19].

Bis heute basiert die Diagnose von PD hauptsächlich auf klinischen Symptomen. Bei der Diagnose werden motorische Funktionen und nicht-motorische Eigenschaften untersucht [13, 23]. Auch bildgebende Verfahren wie Einzelphotonen-Emissionscomputertomografie (SPECT) und Positronen-Emissions-Tomografie (PET) können zusätzlich zur Diagnose eingesetzt werden. Diese Verfahren sind allerdings sehr teuer und nicht für Routineanwendungen geeignet. Eine endgültige Diagnose kann erst post mortem gestellt werden [17, 24]. Da motorische Symptome erst in einer späten Phase, in der bereits ein Großteil an Neuronen unwiderruflich abgestorben ist, auftreten, ist eine Diagnose in einer prodromalen, frühen Phase von PD wünschenswert. Damit potenzielle Therapien möglichst wirksam sein können, sollte die Belastung durch pathologisches  $\alpha$ -Syn und der neuronale Verlust minimal sein.

Allerdings gibt es aktuell keinen Biomarker, der zur frühen Diagnose von PD genutzt werden kann. Da die LB und LN zu einem Großteil aus  $\alpha$ -Syn bestehen, werden beide als potenzielle Biomarker untersucht. Weitere potenzielle Biomarker, die alle im enterischen Nervensystem (ENS) exprimiert werden und während der Erkrankung pathologisch verändert sein können, sind z. B. saures Gliafaserprotein (GFAP, engl.: *glial fibrillary acidic protein*), phosphoryliertes  $\alpha$ -Syn, Tau oder Neurofilament-Leichtketten (NFL, engl.: *neurofilament light chain*) sein [25–28].

### 1.1.1 Klinische Merkmale

Prämotorische Symptome der PD können 10 oder mehr Jahre vor der Manifestierung von motorischen Symptomen einsetzen. Dazu zählen nicht-motorische Symptome wie Hyposmie mit Hypogeusie (Verlust des Geruchs und Geschmacks), REM-Schlafverhaltensstörungen (RBD, engl.: rapid eye movement (REM) sleep behaviour disorder), Depressionen und Konstipation [13, 29]. Dabei treten Apathie, übertriebene Tagesmüdigkeit, Schlafprobleme und Konstipation in 60 % – 70 % der Patienten vor der Diagnose auf [7]. Außerdem gehen die meisten Patienten mit isolierter RBD (iRBD), einer Parasomnie, die durch REM-Schlaf ohne Atonie und lebhaftes Träumen gekennzeichnet ist, innerhalb von 10 bis 20 Jahren nach der Diagnose in PD, DLB oder MSA über [30, 31]. iRBD-Patienten weisen ebenfalls viele nicht-motorische Symptome auf, die auch bei PD-Patienten beobachtet werden, darunter Hyposmie, orthostatische Hypotonie und gastrointestinale Funktionsstörungen [32]. Wichtig ist, dass iRBD-Patienten auch pathologische  $\alpha$ -Syn-Aggregate im zentralen und peripheren Nervensystem aufweisen [33, 34].

Kognitive Defizite in PD-Patienten setzen oft mit weiterem Fortschreiten der Krankheit ein. Patienten über 70 Jahre zeigen sehr häufig Beeinträchtigungen, unabhängig davon, mit welchem Alter PD begonnen hat. Diese Symptome sind sehr heterogen, wobei diese häufig erst unilateral beginnen und sich innerhalb der folgenden Jahre erst kontralaterale Symptome manifestieren [7]. Im Verlauf der Krankheit nehmen diese nicht-motorischen Symptome wie kognitive Beeinträchtigung, autonome Dysfunktionen und Schlafstörungen zu und führen im späten Verlauf zu den meisten Beeinträchtigungen von PD-Patienten [7, 29]. Die kardinalen Motorsymptome wie Tremor, Rigor, Bradykinesie und posturale Instabilität setzen erst ein, wenn die Neurodegeneration im Gehirn weit fortgeschritten ist und bereits bis zu 80 % der Neuronen in der SN abgestorben sind [7].

### 1.1.2 Diagnose und Behandlung

Die Diagnose von PD beruht noch immer auf klinischen Parametern, bei denen sowohl motorische Funktionen als auch nicht-motorische Eigenschaften wie psychiatrische und autonome Merkmale sowie Schlafstörungen untersucht werden [13, 23, 35]. Eine Diagnose findet meistens erst bei weit fortgeschrittener Krankheit statt, da sich dann erst die motorischen Symptome manifestieren. Erst durch eine Autopsie kann oftmals eine definitive Diagnose gestellt werden [4]. Hier zeigt sich, dass nur 75 % – 90 % der PD-Diagnosen korrekt gestellt werden, da auch einige klinische Eigenschaften mit denen anderer neurodegenerativer Erkrankungen übereinstimmen [36]. Aktuell fehlen diagnostische Tests und Biomarker, die dazu beitragen könnten, PD eindeutig und vor allem frühzeitig zu diagnostizieren [17]. Um eine möglichst akkurate Diagnose von PD zu gewährleisten, hat die Internationale Parkinson und Movement Disorder Society (MDS) Kriterien aufgestellt, die eine Verbesserung der bisher hauptsächlich genutzten Queens Square Brain Bank-Kriterien anstreben [13, 17]. So müssen Bradykinesie und mindestens ein weiteres kardinales Motorsymptom vorhanden sein und zusätzlich mindestens drei unterstützende Kriterien für eine eindeutige Diagnose. Zu den unterstützenden Kriterien zählen unter anderem ein unilateraler Beginn, eine sehr gute Reaktion auf Levodopa oder ein klinischer Verlauf von zehn oder mehr Jahren. Des Weiteren gibt es auch ausschließende Kriterien wie eine Vergangenheit mit wiederholten Kopfverletzungen, eine neuroleptische Behandlung zu Beginn der Symptome oder frühe, ausgeprägte autonome Beteiligung [17, 37].

Zusätzlich können bildgebende Verfahren wie Magnetresonanztomografie (MRT), SPECT oder PET verwendet werden, um PD zu diagnostizieren, auch wenn hier keine eindeutige Differenzialdiagnose zu anderen degenerativen Parkinsonismen möglich ist, da nur die Fehlfunktion oder der Verlust von dopaminergen Nervenenden detektiert werden kann [17, 20]. Eine positive Reaktion auf die Behandlung mit dopaminergen Medikamenten wie Levodopa ist zwar ebenfalls ein unterstützendes Kriterium für PD, allerdings kommt dies auch in anderen Formen von Par-

kinsonismen vor [38]. Dies verdeutlicht die Herausforderungen einer akkuraten Diagnose von PD.

Eine Diagnose von RBD, einer prodromalen Phase von PD, wird anhand einer durchgeführten Polysomnografie (PSG) gestellt. Dazu wird ein über Nacht verlaufendes PSG verwendet [39]. Zusätzlich zu einer PSG kann ebenfalls ein RBD-Screening-Fragebogen (RBDSQ, engl.: *REM sleep behavior disorder screening questionnaire*) als ergänzender Test durchgeführt werden, um RBD nachzuweisen [40]. Eine Diagnose für iRBD wird dann anhand der Richtlinien der American Academy of Sleep Medicine (AASM) für die Bewertung von Schlaf und damit verbundenen Ereignissen gestellt [41].

Zur Bestimmung des Krankheitsstadiums, in dem sich ein Patient befindet, wurden verschiedene Skalen und Tests entwickelt. Zu einer der ersten Skalen gehört die Hoehn-und-Yahr-Skala, die bereits 1967 entwickelt wurde und zum einen Patienten in drei Parkinsonismus-Typen, dem primären, sekundären und unbestimmten Typ unterteilt. Zum anderen wurde eine fünfstufige Skala zur Bestimmung der krankheitsbedingten Behinderung entworfen, bei der die Patienten von geringfügigen oder keinen Einschränkungen mit einseitiger Beteiligung (Stufe 1) über milde bis moderate Einschränkungen mit beidseitiger Beteiligung (Stufen 2–3) bis hin zu starken Einschränkungen durch eine vollständig entwickelte, schwer behindernde Krankheit (Stufen 4–5) eingestuft werden [42].

Ein weiterer standardmäßig verwendeter Test, der durch die MDS überarbeitet wurde, ist eine Skala zur Verlaufsbeobachtung bei PD (MDS-UPDRS, engl.: MDS-Unified Parkinson's Disease Rating Scale). Der Test dient ebenfalls der Bestimmung des Schweregrades von PD anhand einer Gesamtsumme an Punkten, die aus den vier Teilen des Tests bestehen. Der erste Teil erfasst nicht-motorische Erlebnisse des Alltagslebens, der zweite Teil motorische Erlebnisse des Alltagslebens, der dritte Teil umfasst motorische Untersuchungen und der vierte Teil motorische Komplikationen, wobei alle Teile die gleichen fünf Antwortmöglichkeiten von 0 = normal, 1 = leicht, 2 = mild, 3 = moderat und 4 = schwerwiegend besitzen [43].

Da auch nicht-motorische Symptome mit fortschreitender PD zunehmen und für die Lebensqualität von entscheidender Bedeutung sind, wurde 2007 ein Test entwickelt, der diese nicht-motorischen Symptome und deren Fortschritt oder eine mögliche Reaktion auf eine Behandlung, die Skala der nicht-motorischen Symptome (NMSS, engl.: Non-Motor Symptoms Scale) entwickelt. Die Skala untersucht die folgenden neun relevanten Bereiche:

1. Herz-Kreislauf-System
2. Schlaf/Müdigkeit
3. Stimmung/Kognition
4. Wahrnehmungsprobleme/Halluzinationen

5. Aufmerksamkeit/Gedächtnis
6. Magen-Darm-Trakt
7. Urin
8. Sexualfunktion
9. Verschiedenes

Die NMSS wird dabei von medizinischen Fachkräften bewertet und durch einen Fragebogen erhoben. Die Punktzahl für jede Frage basiert auf der Multiplikation des Schweregrades (von 0 bis 3) und der Häufigkeit in Punkten (von 1 bis 4) [44].

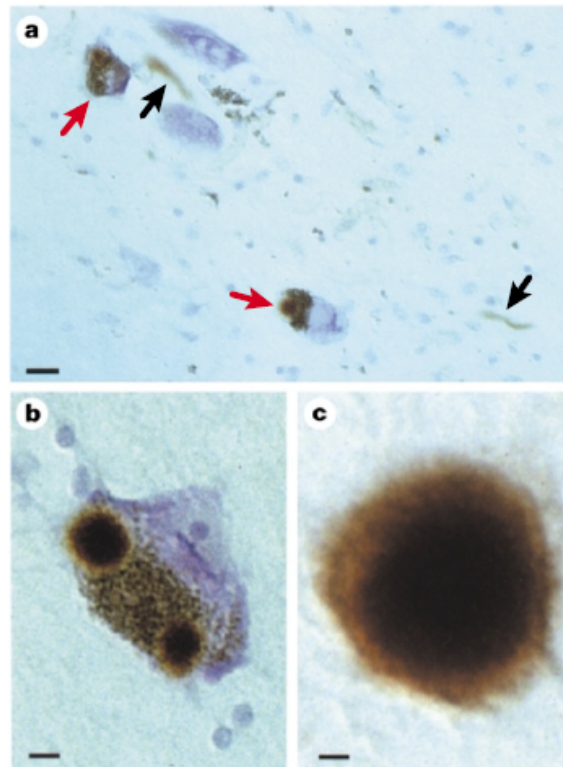
Zusätzlich kann ebenfalls die kognitive Leistung mittels DemTect, der milde kognitive Beeinträchtigungen und frühe Demenz testet, durchgeführt werden, da oft kognitive Defizite mit weiterem Fortschreiten der PD einsetzen. Bei dem DemTect werden fünf Aufgaben absolviert, die ein breites Spektrum an kognitiven Fähigkeiten abdecken: eine Wortliste abrufen, eine Zahlenumkodierung, Test der semantischen Wortgewandtheit, Umkehrung der Zahlenreihenfolge und ein verzögerter Abruf der Wortliste [45].

Nach einer PD-Diagnose kann aktuell nur eine symptomatische Behandlung durchgeführt werden, bei der Dopamin ersetzt wird, um so motorische Symptome abzumildern. Typischerweise werden Dopamin-Vorläufer wie Levodopa oder L-DOPA oder auch Dopamin-Agonisten wie Amantadin und Ropinirol verwendet [19, 46]. Allerdings führen längerfristige Gaben und höhere Konzentrationen zu starken Nebenwirkungen. Auch die nicht-motorischen Symptome nehmen im Verlauf der Krankheit zu, für die es häufig keine oder nur limitierte Behandlungsmöglichkeiten gibt, wodurch die Lebensqualität der PD-Patienten stark abnimmt [7, 17, 19, 29].

### 1.1.3 Neuropathologie

Während PD finden charakteristische neuropathologische Veränderungen im Gehirn statt. Die neuropathologischen Kennzeichen für PD sind sphärische Körper, bestehend aus fehlgefalteten Proteinen, den LB und spindel- oder fadenförmigen LN deren Hauptbestandteil fehlgefaltetes  $\alpha$ -Syn ist (Abbildung 1.2) [47, 48]. Je nach Fortschritt der Krankheit sind bestimmte Teile des Gehirns von den neuropathologischen Veränderungen betroffen. Braak und Kollegen haben PD in sechs neuropathologische Krankheitsstadien unterteilt (Abbildung 1.3), bei denen die Verteilung der LB und LN als sogenannte Inklusionskörper (IB, engl.: *inklusion bodies*) im Gehirn, der sogenannten Lewy-Pathologie, betrachtet werden. In den präsymptomatischen Phasen (Phasen 1–2) sind die IB auf die Medulla oblongata/Pons und den Riechkolben/Nukleus olfactorius anterior beschränkt. Die nächsten Regionen, die von der Krankheit betroffen sind, sind die SNpc und

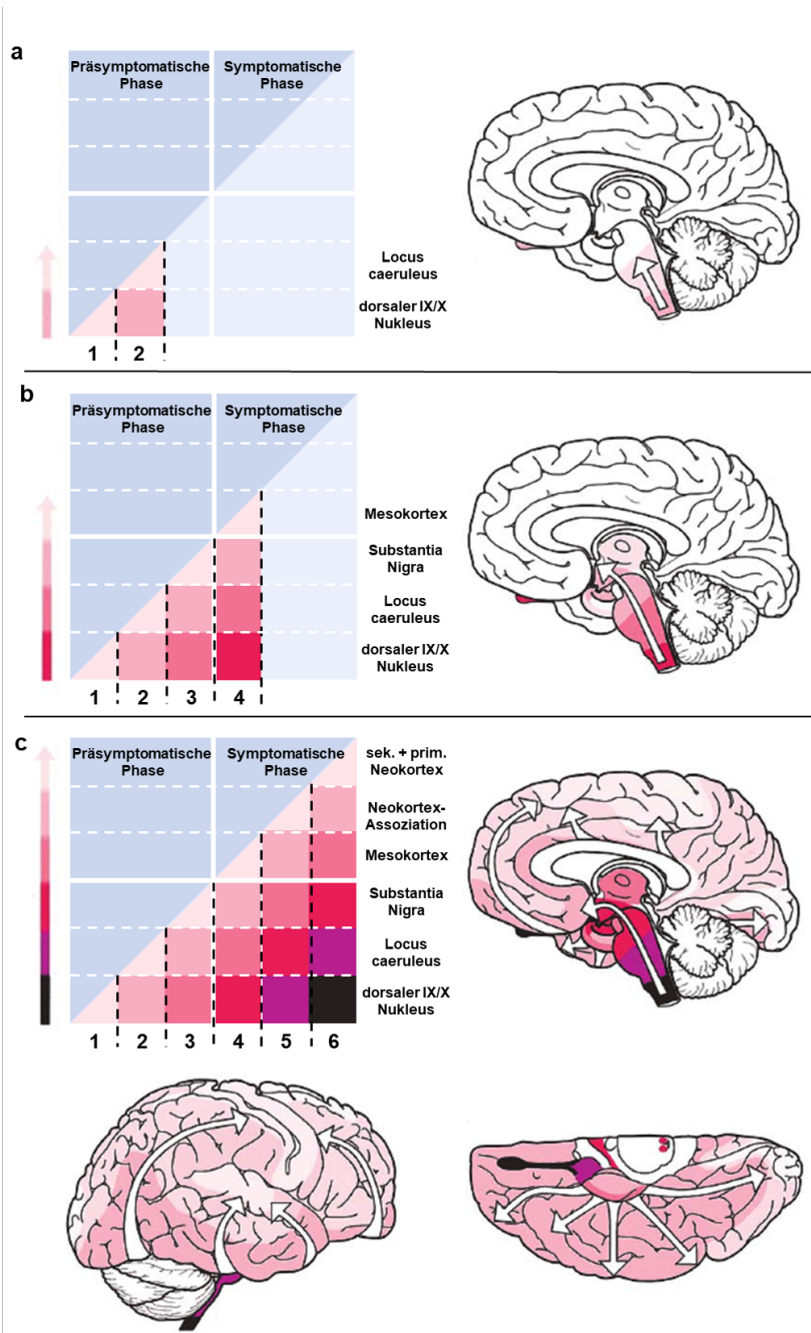
andere Nuklei des Mittel- und Vorderhirns (Phasen 3–4). Während dieser Phasen etwa treten die ersten klinischen Symptome auf. In den letzten Phasen 5–6 zeigen sich neuropathologische Änderungen auch im Neokortex [9, 49, 50].



**Abbildung 1.2 – Lewy-Körperchen (LB) und Lewy-Neuriten (LN) sind Hauptmerkmale der  $\alpha$ -Syn-Pathologie bei PD.**

LB und LN in der SNpc und anderen Hirnregionen definieren die Neuropathologie der PD. Lichtmikroskopische Aufnahmen von Objekten, die mit  $\alpha$ -Syn-AK markiert wurden, zeigen zwei pigmentierte Nervenzellen, von denen jede ein  $\alpha$ -Syn-positives LB (rote Pfeile) und ebenfalls immunpositive LN (schwarze Pfeile) enthält; Skala: 20  $\mu$ m (a), eine pigmentierte Nervenzelle mit zwei  $\alpha$ -Syn-positiven LB; Skala: 8  $\mu$ m (b) und einem  $\alpha$ -Syn-positiven extrazellulären LB; Skala: 4  $\mu$ m (c). Abbildung modifiziert nach Goedert (2001) [51].

Durch die unnatürlichen Ablagerungen werden in der Folge selektiv dopaminergene Neurone geschädigt, was zur Ausprägung der motorischen Defizite führt [50]. LB finden sich dabei im Cytoplasma von Nervenzellen, wohingegen LN in den Axonen neuronaler Zellen zu finden sind [52]. Sie enthalten eine Reihe verschiedener Proteine, die in zelluläre Prozesse involviert sind, wie Filamentproteine und Proteine, die für die Proteolyse zuständig sind und welche nitriert, phosphoryliert oder ubiquitiniert sind [52, 53]. Lewy-Körperchen sind ebenfalls in anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie AD, DLB und MSA zu finden [53–55].



**Abbildung 1.3 – Unterteilung der PD in sechs neuropathologische Krankheitsstufen nach Braak und Kollegen.**

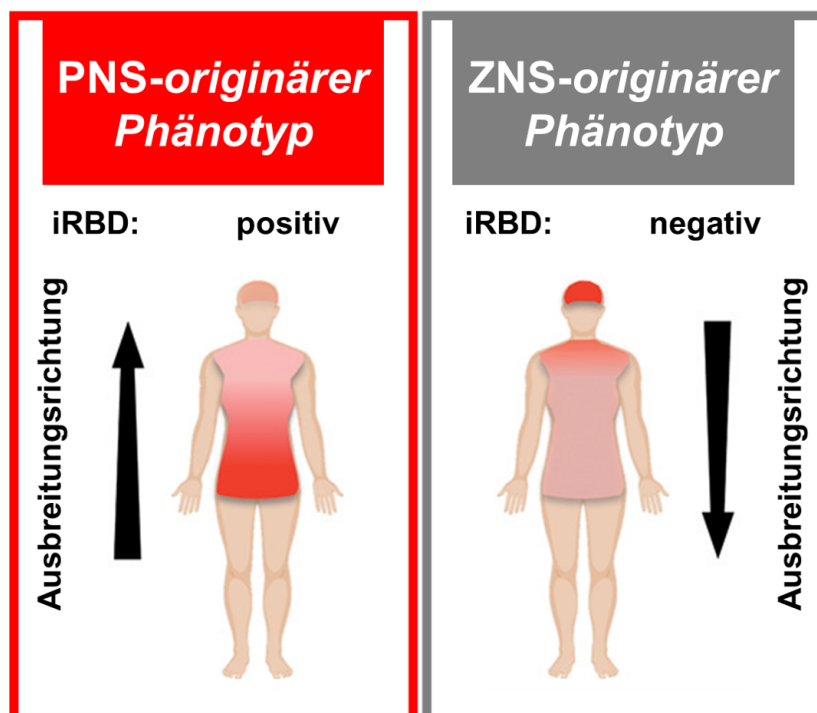
Die ersten Läsionen erscheinen in Stufe 1 im Riechkolben, im Nucleus olfactorius anterior und im dorsalen Nucleus des Vagusnervs (Nucleus dorsalis nervi vagi). Von dort breitet sich die Pathologie hauptsächlich auf einem aufsteigenden Weg weiter aus. In Stufe 2 finden sich LB zusätzlich im Locus caeruleus. Beide Phasen zählen zu der präsymptomatischen Phase (a). Die Ausbreitung schreitet in Stufe 3 in Richtung Amygdala, Vorderhirn und SNpc fort. Der zerebrale Mesokortex ist in Stufe 4 erstmals betroffen und ab diesem Zeitpunkt beginnt vermutlich die symptomatische Phase (b). In den letzten Stufen sind in Stufe 5 der Neokortex und in Stufe 6 die Assoziationsgebiete erster Ordnung und die Primärfelder des Neokortex involviert (c). Der Grad der Schwere der Läsionen wird durch zunehmend dunklere Schattierungen dargestellt (pink, rot, violett, schwarz). Abbildung modifiziert nach Braak et al. (2003) [50].



### 1.1.4 Hypothesen zum Ursprung der $\alpha$ -Syn-Pathologie in PD

Dadurch, dass PD eine sehr heterogene Krankheit ist, sind die Ursachen für die Entstehung und Ausbreitung im Körper nicht abschließend geklärt [20]. Im Zusammenhang mit den Befunden von pathologischem  $\alpha$ -Syn im enterischen Nervensystem (ENS) und dem dorsalen Nucleus des Vagusnervs sowie dem vorderen Riechkolben als den frühesten Läsionsstellen bei PD postulierten Braak und Kollegen die *Dual-Hit*-Hypothese, die besagt, dass sich die  $\alpha$ -Syn-Pathologie vom Riechkolben zu den Schläfenlappen und vom ENS über retrograden axonalen Transport über den Vagusnerv zum zentralen Nervensystem (ZNS) ausbreitet [56, 57].

Dies kann durch das propagierende prionartige Verhalten von  $\alpha$ -Syn bezüglich Aggregation und Verteilung begründet werden [58]. Diese Annahme wurde durch diverse Arbeiten sowohl bestätigt, als auch widerlegt. Gegner stellen die Hypothese auf, dass die Pathologie im ZNS beginnt und sich von dort aus im Körper verteilt (Abbildung 1.4). Mittlerweile gehen aber auch einige Forscher davon aus, dass beide Phänotypen existieren.



**Abbildung 1.4 – Illustration der hypothetischen Phänotypen, gemäß denen sich LB im Körper ausbreiten.**

Auf der linken Seite ist der erste, periphere Nervensystem (PNS)-*originäre* Phänotyp dargestellt, der mit dem Vorhandensein von iRBD assoziiert ist und bei dem davon ausgegangen wird, dass sich die Pathologie vom PNS, also vom Rumpf, ins Gehirn ausbreitet. Die rechte Seite stellt den gegenläufigen ZNS-*originären* Phänotyp dar. Hier beginnt die Pathologie im Gehirn und breitet sich von dort im Rumpf aus. Abbildung modifiziert nach Borghammer et al. (2019) [58].

Der PNS-*originäre* Phänotyp ist dabei stark mit dem Vorhandensein von RBD während der prodromalen Phase von PD assoziiert, während der ZNS-*originäre* Phänotyp häufiger iRBD negativ

ist [58].

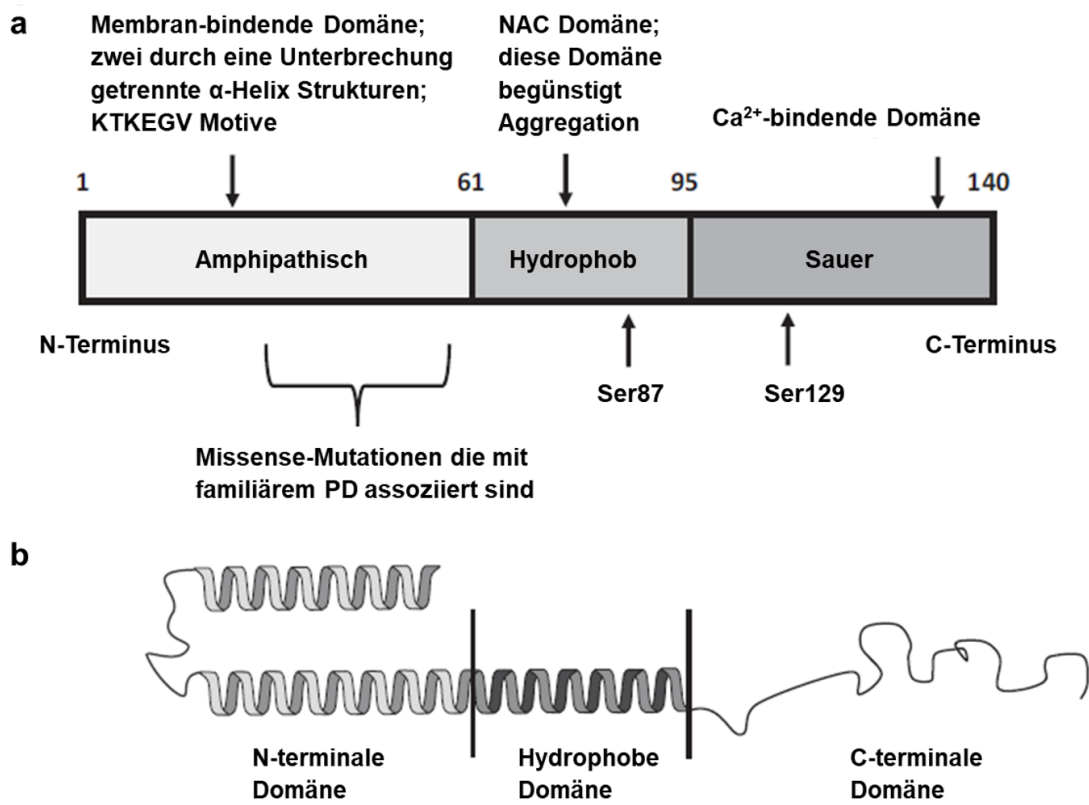
## 1.2 $\alpha$ -Synuclein

### 1.2.1 Struktur und physiologische Rolle

$\alpha$ -Syn gehört zusammen mit  $\beta$ - und  $\gamma$ -Synuclein zu der Synuclein-Familie, welche überwiegend in Neuronen exprimiert werden und in Wirbeltieren auffallend hoch konserviert sind [59]. Erstmals wurde es 1988 als „Synuclein“ im Nukleus und präsynaptischen Nervenenden im Torpedofisch beschrieben [60]. Das humane  $\alpha$ -Syn war zunächst im Zusammenhang mit dem Amyloid der Alzheimer-Krankheit (AD) unter dem Namen nicht-A $\beta$ -Komponente des AD-Plaque-Vorläufers (NACAP, engl.: non-A $\beta$  component of AD plaque precursor) beschrieben worden [61]. Es wurde als Bestandteil in Amyloid Plaques nachgewiesen und liegt in großen Mengen im Gehirn vor. Nachdem aus humanen Hirnproben ein Protein aufgereinigt und sequenziert wurde, wurde festgestellt, dass es mit NACAP übereinstimmt. Daraufhin wurde es  $\alpha$ -Syn genannt [62].

$\alpha$ -Syn ist ein 140 Aminosäuren (AS) langes, 14,5 kDa großes, saures Protein, das vom SNCA-Gen auf Chromosom 4q22.1 codiert wird. Die Primärsequenz von  $\alpha$ -Syn wird in drei Domänen unterteilt: N-terminale Membran-bindende  $\alpha$ -Helix-Domäne, Amyloid-bindende zentrale, nicht-A $\beta$ -Komponente (NAC, engl.: *non-A $\beta$  component*) Domäne und C-terminale, saure Domäne [63]. Die N-terminale Domäne (Aminosäuren (AS) 1–60) ist positiv geladen und enthält ein stark konserviertes KTKEGV-Motiv. Die Kernregion NAC (AS 61–95) ist an der Aggregation beteiligt, da sie Kreuz- $\beta$ -Strukturen bilden kann, die typisch für amyloide Strukturen sind. Durch die geordnete Anordnung von  $\beta$ -Faltblattfilamenten parallel zur Längsachse der Fibrille sind diese amyloiden Strukturen im Gegensatz zur physiologischen Form resistenter gegen den Proteaseabbau [64]. Die C-terminale Domäne (AS 96–140) ist ein saurer Schwanz, der als *random-coil*-Struktur aufgrund der negativen Ladung und geringen Hydrophobizität vorliegt (Abbildung 1.5 a). Der C-Terminus in trunkierter Form induziert Aggregation [63, 65]. Im Zytosol liegt  $\alpha$ -Syn als intrinsisch ungeordnetes Protein vor und nimmt bei Bindung an Lipidmembranen eine  $\alpha$ -helikale Struktur ein (Abbildung 1.5 b) [66]. Mutationen, die mit der seltenen familiären PD assoziiert sind, befinden sich alle im Bereich der N-terminalen Domäne bis auf eine erst kürzlich entdeckte Mutation in der NAC-Domäne. Insgesamt wurden bisher die 11 Missense-Mutationen A53T, A30P, E46K, H50Q, A18T, A29S, A53E, A53V, A30G, G51D und E83Q in Zusammenhang mit PD gebracht [15, 16, 67–74].

$\alpha$ -Syn besitzt diverse Stellen, an denen posttranslationale Modifikationen (PTMs, engl.: *post-translational modifications*) stattfinden, wie z. B. Phosphorylierungen an Serin 129 (S129), Acetylierungen, Nitrierungen, Ubiquitinierungen oder Trunkierungen, wobei eine Phosphorylierung



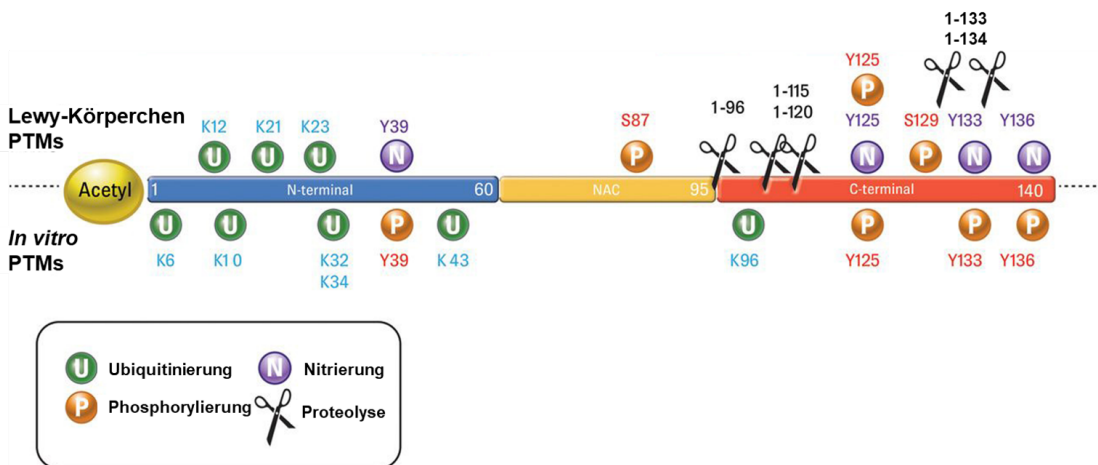
**Abbildung 1.5 – Schematische Darstellung der  $\alpha$ -Syn-Domänen (a) sowie der membrangebundenen Struktur (b).**

Das Protein wird in die drei Domänen N-terminale Domäne, die an Membranen bindet, die hydrophobe NAC-Domäne, die Aggregation fördert und die negativ geladene, Kalzium-bindende C-terminale Domäne unterteilt.  $\alpha$ -Syn ist 140 AS lang und verschiedene Mutationen, die sich hauptsächlich in der N-terminalen Domäne befinden, sind mit frühem, familiärem PD assoziiert (a). Im Zytosol liegt  $\alpha$ -Syn ungefaltet vor und nimmt bei Membranbindung N-terminal eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur ein (PDB: 1XQ3). Abbildung modifiziert nach Török et al. (2016) [66].

an S129, Nitrierungen oder Trunkierungen hauptsächlich in LB abgelagertem  $\alpha$ -Syn vorkommen (Abbildung 1.6). Diese können nicht nur die physiologischen Funktionen von  $\alpha$ -Syn verändern, sondern auch die Aggregatbildung und somit die Neurotoxizität beeinflussen [75].

Über die physiologische Rolle von  $\alpha$ -Syn ist bisher wenig bekannt. Das Protein wird vorwiegend im Gehirn unter anderem im Neokortex, Hippocampus und SNpc exprimiert und befindet sich hauptsächlich in der präsynaptischen Region von Nervenzellen.

Es wird vermutet, dass  $\alpha$ -Syn die neuronale Plastizität erhält und diverse weitere Funktionen erfüllt. Dazu zählen neuronale Differenzierung, Neurotransmitterausschüttung, Funktion als Chaperon und Beteiligung an der Regulation der Dopamin-Biosynthese [59, 63, 65, 76, 77].  $\alpha$ -Syn interagiert mit Membranen und verschiedene Untersuchungen an Modellorganismen zeigen, dass  $\alpha$ -Syn ebenfalls am Vesikeltransport über den SNARE-Komplex beteiligt ist [60, 78].



**Abbildung 1.6 – Mögliche posttranslationale Modifikationen (PTMs) an  $\alpha$ -Syn in LB (obere PTMs) oder *in vitro* (untere PTMs).**

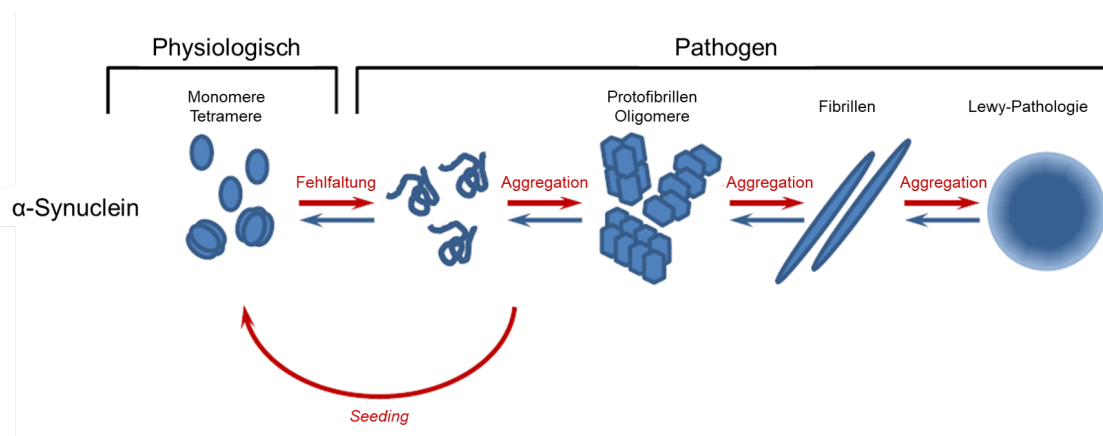
Typische PTMs sind Ubiquitinierung, Phosphorylierung, Nitrierung oder Trunkierung durch Proteolyse. Abbildung modifiziert nach Schmidt et al. (2013) [79].

### 1.2.2 Rolle von $\alpha$ -Syn in Synucleinopathien

PD, DLB und MSA sind Synucleinopathien, die durch die Oligomerisierung, Aggregation und Akkumulation von  $\alpha$ -Syn in Zusammenschlüssen, die reich an Kreuz- $\beta$ -Strukturen sind, gekennzeichnet sind. Dies stellt ein kritisches Ereignis in der Entstehung dieser Krankheiten dar [47, 53, 80–82]. Da sich  $\alpha$ -Syn-Fibrillen in LB und LN in Neuronen bei PD und DLB oder in neuronalen und glialen zytoplasmatischen Inklusionen bei MSA ablagern, wird angenommen, dass kleine, oligomere Intermediate von  $\alpha$ -Syn, die noch löslich sind, für Neuronen die toxischste Form sind (s. Abbildung 1.7) [83–85].

Neben dem Nervensystem und Liquor, wurden  $\alpha$ -Syn-Aggregate ebenfalls in der Haut, der Nasenschleimhaut, in Speichel, in Tränen, in Urin und in Blut von PD-Patienten nachgewiesen, welche alle als mögliche Quelle zur Diagnose von Synucleinopathien dienen könnten [86–94]. Histologische Befunde zeigen auch, dass enterische Neuronen in der gastrointestinalen Submukosa von PD-Patienten pathologisches  $\alpha$ -Syn, sogar schon während der prodromalen Phase enthalten [9, 95, 96].

Darüber hinaus deuten mehrere Studien darauf hin, dass pathologische  $\alpha$ -Syn-Aggregate prionenähnliche Eigenschaften haben. Diese ermöglichen es ihnen, sich zu vermehren und zu wachsen, sich zwischen Neuronen im Nervensystem zu verbreiten und sich über große Entfernungen im Gehirn und im Körper auszubreiten, einschließlich vom ENS zum ZNS und umgekehrt [97–101]. Frühere Ergebnisse bei transgenen TgM83<sup>+/-</sup>-Mäusen, die humanes  $\alpha$ -Syn exprimieren, haben gezeigt, dass  $\alpha$ -Syn-Fibrillen, die für eine orale Herausforderung verwendet wurden, die Schleimhautbarriere des Gastrointestinaltraktes (GIT) überwinden konnten, wonach sie in das Nervensystem eindringen und eine Synucleinopathie in diesen Mäusen auslösten [102]. Zu-



**Abbildung 1.7 – Aggregation von  $\alpha$ -Syn über Oligomere, Protofibrillen, Fibrillen und schließlich die Ablagerung in Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten.**

Die prionenähnlichen Eigenschaften von  $\alpha$ -Syn führen dazu, dass aggregiertes Protein in andere Zellen transportiert wird und dort als Keim für neue Aggregate dient (*Seeding*). Abbildung modifiziert nach Kalia et al. (2013) [104].

sätzlich konnte in C57BL/6-Mäusen nachgewiesen werden, dass A $\beta$ 42 nach einer Injektion in die Blutbahn wieder mit dem Kot ausgeschieden wird und die Ausscheidung vom Mikrobiom beeinflusst wird [103].

Studien wiesen auch einen Zusammenhang von verstärkter  $\alpha$ -Syn Aggregation und einem veränderten Mikrobiom bei PD-Patienten nach. Die Veränderungen führen zu einer Inflammation des GIT wodurch die Schleimhaut permeabler wird und  $\alpha$ -Syn-Aggregate die Schleimhaut einfacher passieren können [105]. Auf Basis dieser Daten kann die Hypothese aufgestellt werden, dass humane pathologische  $\alpha$ -Syn-Aggregate, die z. B. von betroffenen enterischen Neuronen freigesetzt werden, ebenfalls die Schleimhaut des Magen-Darm-Trakts durchdringen und mit dem Stuhl ausgeschieden werden. Dies würde einen ähnlichen Mechanismus wie die umweltbedingte Ausscheidung von Prionen im Kot von Hirschen und Elchen, die mit der chronisch zehrenden Krankheit der Hirschartigen (engl.: Chronic Wasting Disease) infiziert sind oder von Schafen und Ziegen, die mit Scrapie infiziert sind, beinhalten [106, 107].

### 1.3 Oberflächenbasierte

#### Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungs-Analyse (sFIDA)-Assay

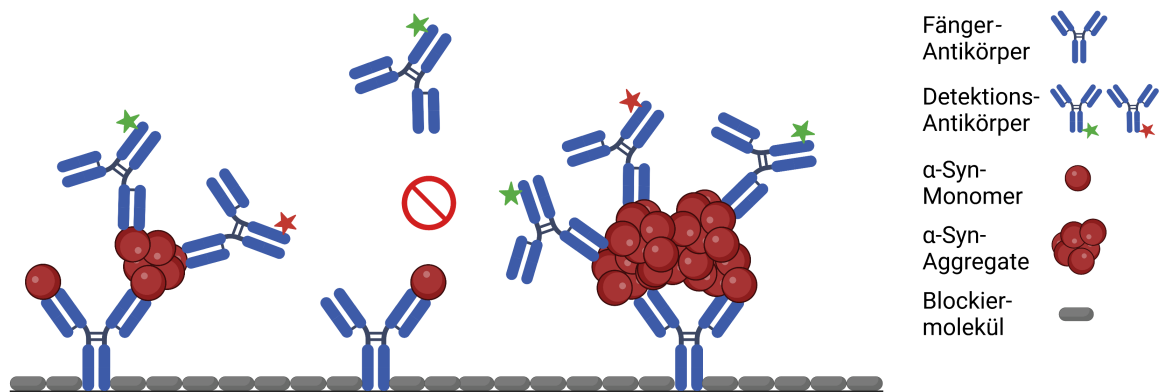
Es ist immer noch eine Herausforderung, Proteinaggregate in Körperflüssigkeiten zu detektieren, da die erwartete Konzentration sehr gering ist, was eine hohe Sensitivität eines Assays voraussetzt, die Standardverfahren wie z. B. der enzymgekoppelte Immunabsorptionsassay (ELISA, engl.: Enzyme-linked Immunosorbent Assay) nicht bieten. Die polymorphen Eigenschaften, also verschiedene Molekulargewicht, Aussehen, Struktur und Dynamik von Oligomeren sollten bei

der Detektion der Proteinaggregate unterschieden werden, da diese Eigenschaften die Toxizität der Aggregate bestimmen können. Zusätzlich erschwert die Kurzlebigkeit und konformative Ähnlichkeit von Oligomeren deren spezifische Detektion [108–110]. Da in verschiedenen Proteinen die gleiche, für Amyloid-Fibrillen übliche Kreuz- $\beta$ -Struktur vorkommt, führt dies zu einem unspezifischen Amyloid-Zustand. Somit teilen sich Oligomere unabhängig von der Sequenz eine konformationsabhängige Struktur, was eine Differenzierung weiter erschwert [111, 112].

Außerdem sind Monomere in einem großen Überschuss vorhanden, sodass die Tests eine hohe Spezifität für Oligomere aufweisen müssen. Der oberflächenbasierte Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungs-Analyse (sFIDA, engl.: *surface-based fluorescence intensity distribution analysis*)-Assay ist eine aggregatspezifische Quantifizierungsplattform zur Detektion einzelner, klinisch relevanter Proteine. Er beruht auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA und kombiniert diesen mit hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie [113]. Der sFIDA-Assay wurde ursprünglich dazu entwickelt, Prion-Aggregate zu detektieren und wurde für die klinische Quantifizierung von  $A\beta_{1-42}$ -Aggregaten in Liquor optimiert [114–116].

Für den Assay wird ein Fänger-Antikörper (AK) an der Glasoberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert, um das Zielprotein zu binden. Die Immobilisierung kann entweder nicht-kovalent direkt an die Oberfläche über die Fc-Region des Fänger-AK, an die mit Protein-A oder -G bedeckte Oberfläche oder über eine kovalente Bindung erfolgen [117, 118]. Noch freie Oberfläche wird mit einem blockierenden Reagenz gesättigt, sodass unspezifische Bindungen verhindert werden [119]. Als Nächstes wird das gebundene Zielprotein durch eine Mischung aus zwei AK, von denen jeder mit einem unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist (Detektionssonden), markiert (Abbildung 1.8). Als Fänger- und Detektions-AK werden AK mit überlappenden oder identischen Epitopen verwendet [113, 120–122]. Da der Fänger-AK nur ein einzelnes, lineares Epitop des Zielproteins erkennt, ermöglicht die gleichzeitige Verwendung des gleichen AK als Fänger- und Detektions-AK eine spezifische Quantifizierung von Aggregaten in Gegenwart von Monomeren. Auch wenn nur einer der Detektions-AK mit dem Fänger-AK übereinstimmt oder beide Detektions-AK aus einem anderen AK wie dem Fänger-AK bestehen, werden weiterhin nur aggregierte Proteine detektiert. Monomere mit nur einem linearen Epitop werden zwar durch den Fänger-AK gebunden, können jedoch nicht markiert und somit nicht detektiert werden. Zwischen allen Inkubationsschritten werden freie, nicht-gebundene Partikel gewaschen. Die Oberfläche wird zuletzt während der Ein- oder Zweikanalmikroskopie durch einen Laser abgetastet, wobei alle Signale als Pixel erfasst werden.

Mittels des intern entwickelten Bildanalysesoftwaretools sFIDAta werden im Falle einer Einkanalanalyse sogenannte Pixel-Werte generiert, im Falle von einer Zweikanalanalyse mit kolokalisiertem Signal wird die Anzahl an Pixeln, die auf derselben Position beider Fluoreszenzkanäle auftreten, als sFIDA-Messwert zusammengefasst. Für die Auswertung mit dem sFIDAta Softwa-



**Abbildung 1.8 – Schematische Abbildung des sFIDA-Assay-Prinzips.**

Die Glasoberfläche einer Mikrotiterplatte wird mit einem Fänger-Antikörper (AK) z. B. gegen  $\alpha$ -Syn beschichtet. Ein anschließendes Blockieren der noch freien Oberfläche mit einem Blockierungsmolekül verhindert unspezifisches Binden der Probe oder der Detektionssonden. Nach anschließender Probekubation werden durch den Fänger-AK sowohl Monomere als auch Aggregate aus der Probe auf der Assay-Oberfläche immobilisiert. Der Detektions-AK ist ein Mix von AK, die mit unterschiedlichen Fluorophoren gekoppelt sind. Der Detektions-AK kann nur Aggregate markieren, da dieser gegen das gleiche oder ein überlappendes Epitop gerichtet ist wie der Fänger-AK oder aus den gleichen AK besteht, sodass mindestens zwei Epitope vorhanden sein müssen. Das Epitop auf dem Monomer, das bereits durch den Fänger-AK gebunden ist, ist somit blockiert und kann folglich nicht mehr durch den Detektions-AK markiert werden. Die Kavitäten der Mikrotiterplatte werden durch Mikroskopietechniken wie z. B. Zweikanal-TIRFM oder Konfokal-Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen, um einzelne Partikel zu detektieren. Nur Partikel, an die mindestens zwei verschiedene Detektions-AK gebunden sind (kolokalisiertes Signal) zählen zu dem sFIDA-Messwert. Diese Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

retool werden durch die Anwendung eines Grenzwertes der Intensität für beide Einzelkanäle nur Pixel, die gleich hell oder heller als die Grenzwertintensität sind, analysiert. Der Grenzwert wird anhand der BC bestimmt und entspricht dabei einer Intensität, die einen zuvor bestimmten Prozentwert der Gesamtpixelanzahl der BC überschreitet. Durch die Anwendung eines Grenzwertes werden Hintergrundsignale, die den Messwert beeinflussen können, reduziert [123]. Bei Verwendung von Zweikanalmikroskopie wird die Spezifität damit noch weiter erhöht, da hier nur die Pixel zählen, die in beiden Fluoreszenzkanälen höhere Intensitäten als der Grenzwert aufweisen.

Sowohl der Pixel-Wert als auch der sFIDA-Messwert korrelieren mit der Konzentration an Proteinaggregaten in der Probe. Durch die Verwendung von Kalibrationsstandards wird der Pixel-Wert oder sFIDA-Messwert in eine molare Konzentration umgewandelt [113]. In der vorliegenden Arbeit dienten Silikananopartikel (SiNaPs), die von Hülsemann et al. als Standard für A $\beta$ -Oligomerbasierte Diagnose von AD entwickelt wurden und weiterführend auch als Standard mit anderen Peptiden verwendet werden, als Kalibrationsstandard [124]. Ein SiNaP besitzt die Größe eines nativen Oligomers und wird dabei mit Peptiden funktionalisiert. Sie besitzen eine theoretisch bestimmte Anzahl an Epitopen auf der Oberfläche, wodurch eine quantitative Detektion von Oligomeren im sFIDA-Assay möglich wird [120].

Da der sFIDA-Assay bisher nicht zwischen Proteinspezies von kleinen Oligomeren bis hin zu großen Fibrillen unterscheidet, werden die mit sFIDA gemessenen Analyten als Aggregate bezeichnet. Vor kurzem wurde der sFIDA-Assay dazu genutzt,  $\alpha$ -Syn- und Tau-Aggregate in Liquor aus Patienten mit PD, DLB und anderen neurodegenerativen Erkrankungen zu quantifizieren. Dies beweist, dass sFIDA ein zuverlässiger, höchst sensitiver und robuster Assay für die Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen darstellt [120].

### 1.3.1 Interne Totalreflektionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF-Mikroskopie) und konfokale Fluoreszenzmikroskopie

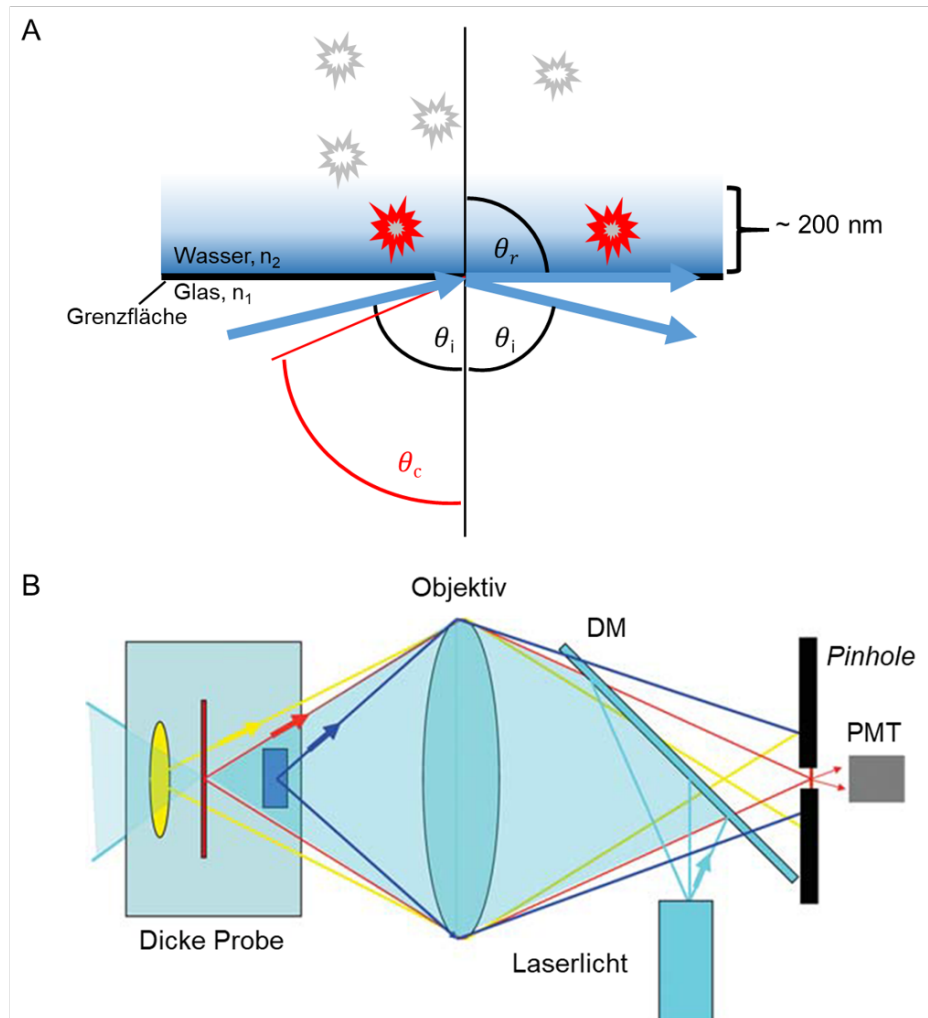
Die Oberfläche wird anschließend mittels Mikroskopie z. B. konfokaler- oder interner Totalreflexions (TIR)-Zweikanal-Fluoreszenzmikroskopie (TIRFM) gescannt, um einzelne markierte Aggregate detektieren zu können. Bei beiden Techniken wird der Laserstrahl an der Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes wie z. B. Glas und Wasser reflektiert. Allerdings kommt bei der konfokalen Mikroskopie keine TIR und kein evaneszentes Feld zustande [125, 126].

Bei der TIRFM muss der Winkel des einfallenden Laserstrahls  $\theta_i$  einen kritischen Winkel  $\theta_c$  überschreiten, sodass der gebrochene Strahl parallel zur Grenzoberfläche ist und das gesamte Licht reflektiert wird. Das Licht wird mit einem Winkel von  $\theta_i$  reflektiert. So wird eine TIR erreicht und oberhalb des kritischen Winkels  $\theta_c$  bildet das elektrische Feld des Laserstrahls eine evaneszente Welle aus, die sich in das zweite Medium ausbreitet und dabei exponentiell mit größer werdendem Abstand zur Grenzfläche abnimmt. Somit werden nur wenige Fluorophore bis ca. 200 nm Eindringtiefe vom Laserstrahl angeregt (Abbildung 1.9 A) [125]. Um eine bessere Auflösung zu erzielen, wird Immersionsöl verwendet.

Bei der Datenaufnahme mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop wird der Laserstrahl zur Selektion der Anregungs- und Emissionswellenlänge über einen dichromatischen Spiegel (DM, engl.: *dichromatic mirror*) und der Objektivlinse auf die dicke Probe gelenkt. Um die Selektion der richtigen Anregungs- und Emissionswellenlängen zu verbessern, werden zusätzlich Anregungs- und Emissionsfilter verwendet. Die Fluorophore in der Probe werden angeregt, das emittierte Licht wird dann durch den DM geleitet und schließlich auf der Bildebene fokussiert. Durch eine sehr kleine Öffnung (*Pinhole*) wird sichergestellt, dass nur Licht der fokussierten konfokalen Ebene den Photovervielfacher (PMT, engl.: *photomultiplier tube*) erreicht (Abbildung 1.9 B) [126].

Die verschiedenen, an die AK gekoppelten Fluorophore werden nacheinander angeregt und deren jeweilige Emission detektiert. Markieren mehrere Detektionssonden ein Aggregat, ist das aufgenommene Signal verstärkt. Wie zuvor beschrieben werden kolokalisierte Signale durch Signale beider Fluorophore an demselben Ort erzeugt.





**Abbildung 1.9 – Schematische Darstellungen der TIRFM (A) und Konfokal-Fluoreszenzmikroskopie (B) zum Nachweis einzelner Partikel.**

(A) Die Probe wird angeregt und das Licht vollständig im Winkel von  $\theta_i$  reflektiert, sodass eine totale interne Reflexion (TIR) erreicht wird. Der Laserstrahl wird hierbei an der Grenzfläche von einer Glasoberfläche mit einem Brechungsindex  $n_1$  und Wasser mit einem Brechungsindex  $n_2$  (mit  $n_1 > n_2$ ) reflektiert. Ist der Winkel des einfallenden Lichts  $\theta_i$  oberhalb eines kritischen Winkels  $\theta_c$ , wird dieses parallel zur Grenzfläche gebrochen und eine ca. 200 nm hohe, in das Medium (Wasser) reichende evaneszente Welle wird erzeugt. Abbildung modifiziert nach Reck-Peterson et al. (2010) [125].

(B) Der Laserstrahl wird durch die Reflexion des dichromatischen Spiegels (DM, engl.: *dichromatic mirror*) und dem Objektiv auf die dicke Probe gerichtet. So regt der Strahl die Fluorophore der ganzen Probe an, deren emittiertes Licht anschließend durch den DM geleitet und auf der Bildebene fokussiert wird. Durch eine sehr kleine Öffnung (*Pinhole*) wird das Licht gezielt zum Photovervielfacher (PMT, engl.: *photomultiplier tube*) gelenkt. Abbildung modifiziert nach Sanderson et al. (2014) [126].

### 1.3.2 Assayentwicklung

Zur Entwicklung qualitativer und quantitativer Assays für klinische und diagnostische Anwendungen gehören die Assayverifizierung, Prozessentwicklung und Assayvalidierung [117].

Während der Assayverifizierung werden die Hauptelemente wie das Antigen und Antikörper oder das Detektionssystem sowie geeignete Puffer ausgewählt. Zudem werden die Hauptelemente getestet und titriert, um die Leistung des Assays zu maximieren und die bestmöglichen Kompromisse zwischen analytischer Fähigkeit und der Zweckmäßigkeit, wie z. B. dem Zeitaufwand, zu erzielen [117].

Zur Prozessentwicklung zählen unter anderem die Inkubationszeit, -temperatur oder die Wiederfindungsrate. Durch das Austesten des Zusammenhangs zwischen Inkubationszeit bzw. -temperatur und Signalentwicklung kann ein möglichst hohes Signal-Rausch-Verhältnis (SRV) erreicht werden. Die Wiederfindungsrate wird bestimmt, um die Genauigkeit eines Assays zu determinieren [117, 127].

Die Analyseleistung eines Assays wird anhand von Validierungsparametern wie Selektivität, Robustheit oder der Nachweisgrenze (LOD, engl.: *limit of detection*) überprüft [117, 128]. Dabei bestimmt die Sensitivität eines Assays, bis zu welcher Konzentration dieser den Analyten nachweisen kann. Die nachweisbare Konzentration sollte, vor allem auch in Bezug auf Körperflüssigkeiten, sehr gering sein [108, 127]. Die Spezifität beschreibt, wie gut der Assay nah verwandte molekulare Strukturen voneinander unterscheiden kann [127]. Auch die Präzision eines Assays ist relevant, da diese beschreibt, wie reproduzierbar Messungen der Probe innerhalb einer Messung (*Intra-Assay-Präzision*) und zwischen verschiedenen Messungen derselben Probe (*Inter-Assay-Präzision*) sind. Zur Bestimmung der Präzision wird der Variationskoeffizient (CV%-Wert) genutzt, bei dem ein geringer Wert eine hohe Präzision darstellt [128]. Zudem sollte auch die Verdünnungslinearität des Analyten überprüft werden. Zeigt der Analyt keine lineare Verdünnung weist dies auf einen möglichen störenden Effekt von Matrixkomponenten hin und führt so zu einer Beeinträchtigung z. B. der Präzision des Assays [127, 128].

Zusätzlich zur analytischen Leistung eines Assays gibt es auch noch die klinische bzw. diagnostische Leistung. Diese beschreibt die Fähigkeit eines Assays, Ergebnisse zu liefern, die mit einem bestimmten klinischen Zustand oder einem physiologischen oder pathologischen Prozess oder Zustand korrelieren [129].

#### 1.3.2.1 Assayverifizierung

Der allgemeine Prozess eines Immunoassays lässt sich in drei Abschnitte unterteilen: Bedeckung der Oberfläche mit Fänger-AK sowie Blockieren der freien Oberfläche, Probeninkubation und Detektions-AK-Inkubation. Dazu muss zunächst eine geeignete Fänger- und Detektions-AK-Kombination gefunden werden, die den Analyten spezifisch bindet und detektiert. Im Zuge

der Assayverifizierung werden die Konzentrationen der AK durch Titrierung bestimmt, bei der verschiedene Konzentrationen des Fänger- oder Detektions-AK in einer Verdünnungsreihe aufgetragen werden und das gemessene Signal und das daraus kalkulierbare SRV der Proben verglichen wird. Dies dient dazu, die Arbeitskonzentration des AK zu bestimmen [130].

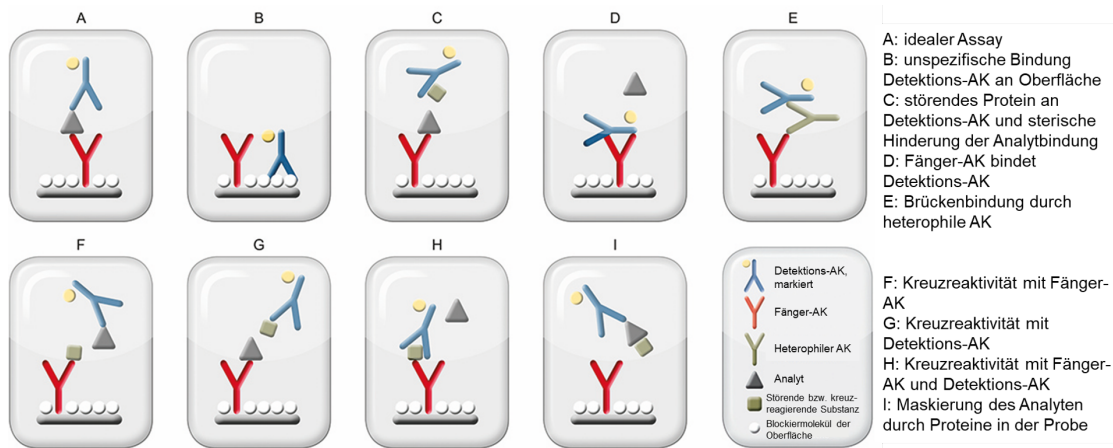
Eine Titrierung ist notwendig, da der Analyt mit dem spezifischen Epitop und Partikeln, die unspezifisch an den AK binden können, um die Antigenbindestelle (Paratop) des AK konkurriert. Die geeignete Konzentration zeigt sowohl einen linearen Anstieg der Aggregatkonzentrationen als auch eine konzentrationsabhängige Veränderung der positiven Proben im Gegensatz zu negativen Proben. Zeigt das Signal keinen linearen Anstieg, kann, wie oben angeführt, von einer Beeinträchtigung der Analytdetektion durch die Probenmatrix ausgegangen werden.

Wird zu viel AK eingesetzt, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Paratope aufgrund sterischer Effekte bedeckt werden, ist die Konzentration allerdings zu gering, können gegebenenfalls nicht alle in der Probe enthaltenen Analyten gebunden werden [130]. Es sollte zusätzlich darauf geachtet werden, dass es keinerlei Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen AK gibt, da sonst die Detektions-AK an den Fänger-AK binden können und so falsch-positive Signale entstehen [131]. Dabei muss beachtet werden, dass AK ebenfalls zur Aggregation neigen. Würden die Detektions-AK aggregieren, so könnten diese unspezifisch an die Oberfläche binden und ebenfalls zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Andererseits könnten durch die Aggregation der Detektions-AK deren Paratope sterisch blockiert werden, wodurch bereits immobilisierter Analyt nicht markiert wird und folglich falsch-negative Ergebnisse entstehen [117]. Üblicherweise eingesetzte Konzentrationen für monoklonale Fänger-AK sind 1 µg/mL – 10 µg/mL und für Detektions-AK ist eine Verdünnung von 1:100 bis 1:500.000 beginnend von einer Konzentration von 1 µg/mL üblich, allerdings muss die optimale Konzentration der AK experimentell bestimmt werden [117].

Zusätzlich ist der isoelektrische Punkt des Fänger- und Detektions-AK von Bedeutung, da die Präzipitation des AK durch einen geeigneten Puffer vermieden werden muss [117]. Durch eine Präzipitation des Fänger-AK wird zum einen eine gleichmäßige Bindung an die Oberfläche verhindert und zum anderen wird durch eine Präzipitation des Detektions-AK die Bindung an den Analyten verhindert.

Üblicherweise verwendete Puffer für den Fänger-AK sind Carbonatpuffer (pH-Wert = 9,6), Tris-Puffer (pH-Wert = 8,5) oder PBS-Puffer (pH-Wert = 7,2) und enthalten keine weiteren Proteinzusätze. Der Detektions-AK wird meistens im Blockierungspuffer gelöst, da so das Hintergrundsignal minimiert werden kann. Weitere Faktoren, die die AK beeinflussen können, sind im Puffer enthaltene Salze, Ionenstärke, Proteine, Detergenzien, Konservierungsstoffe und weitere Zusätze [117].

Des Weiteren ist das Blockieren zum Absättigen freier Oberfläche zur Verhinderung unspezifischer Bindungen des Analyten oder anderer in der Probe enthaltener Moleküle sowie der



**Abbildung 1.10 – Mögliche Fehlerquellen in einem Immunoassay.**

Es gibt verschiedene Fehlerquellen, die bei einem Immunoassay auftreten können. Der ideale Assayaufbau sieht nur eine Bindung des Analyten an den Fänger-AK vor, der dann durch den Detektions-AK markiert wird (A). Fehlerquellen haben verschiedene Ursachen. So können durch eine zu geringe Konzentration an blockierendem Reagenz (B), störende Komponenten in der Probe (C) oder Kreuzreaktionen falsch positive oder falsch negative Signale auftreten (F–H). Auch kann der Fänger-AK den Detektions-AK binden (D) oder ein heterophiler AK in der Probe zu einer Brückenbindung führen (E), was beides zu falsch-positiven Signalen führt. Störende Proteine in der Probe können den Analyten maskieren und zu falsch negativen Ergebnissen führen (I)

Zusätzlich besteht auch die Möglichkeit, eine zu hohe Konzentration an Fänger- oder Detektions-AK einzusetzen (nicht in der Abbildung aufgeführt). Dies kann zu sterischen Hinderungen oder auch einer Aggregation der AK führen, wodurch eine Bindung des Analyten an das Paratop verhindert werden kann. Eine Aggregation von Detektions-AK kann ebenfalls zu falsch-positiven Signalen führen, da die gebildeten Aggregate unspezifisch an die Glasoberfläche binden könnten. Abbildung modifiziert nach Glöggler et al. (2017) [132].

Detektions-AK obligatorisch, um Hintergrundsignale zu reduzieren. Zusätzlich soll das Blockieren die Sensitivität und Spezifität gewährleisten [117, 130]. Für das Blockieren der Oberfläche wird zum einen das blockierende Reagenz ausgewählt, das unspezifische Bindungen unterdrückt und eine Konzentration des blockierenden Reagenzes gewählt, bei der die gesamte freie Oberfläche abgesättigt wird, aber nicht die Bindung des Analyten an den Fänger-AK durch zu hohe Konzentrationen sterisch blockiert wird. Bei ungenügender Blockierung können falsch-positive Signale durch das Binden des Analyten oder der Detektions-AK die freie Oberfläche entstehen (Abbildung 1.10 B) [132]. Auch der Blockierungspuffer wird unter Berücksichtigung der Eigenschaften des Analyten und des Fänger-AK angepasst [117, 130]. Bovines Serumalbumin (BSA) ist ein häufig in Immunoassays verwendetes Molekül zum Blockieren. Je nach Analyten kann es allerdings zu ungewollten Interaktionen oder Kreuzreaktivitäten mit BSA kommen (Abbildung 1.10 F–H), weshalb als weitere Moleküle z. B. fettfreies, getrocknetes Milchpulver (MP) oder Casein verwendet werden. Welche Blockierungslösung geeignet ist, ist abhängig vom jeweiligen Analyten. Wichtig ist auch, dass die Lösung weder die Aktivität noch die Stabilität des AK reduziert oder maskiert [117].

Außerdem können auch in der Probe enthaltene Komponenten die Interaktion zwischen dem AK und dem Analyten stören, was als Matrixeffekte bezeichnet werden und durch eine Verdünnung der Probe in einem geeigneten Puffer reduziert werden können [117].

Zur Detektion von krankheitsassoziierten Aggregaten werden häufig Körperflüssigkeiten verwendet, da diese einfach gewonnen werden können. Neben dem Analyten enthalten Körperflüssigkeiten eine große Anzahl an verschiedenen Proteinen und weitere Komponenten, die die Detektion des Analyten erschweren oder verhindern können [133].

Stuhl ist eine hochkomplexe Körperflüssigkeit und setzt sich unter anderem aus Wasser, Proteinen, Fettsäuren, Polysacchariden, bakterieller Biomasse, unverdauten Essensresten, Gallenflüssigkeit sowie Proteasen zusammen [134]. Aufgrund der Komplexität von Stuhlproben könnten zahlreiche Komponenten enthalten sein, die zu einer Kreuzreaktion oder der Maskierung des Epitops oder des Paratops führen können [132]. Zusätzlich beeinflussen die Ernährung und das Darmmikrobiom wahrscheinlich zusätzlich die Detektion von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhl [135].

Zusätze von Detergenzien im Blockierungs-, Proben- oder Detektions-AK-Puffer können zu einer Reduzierung von unspezifischen Bindungen führen, da sie die Oberflächenspannung reduzieren und so zum einen unspezifische Wechselwirkungen an den Oberflächen minimieren und die Diffusion der AK verbessern können. Zum anderen werden intermolekulare Wechselwirkungen zu Matrixkomponenten reduziert [130]. Zusatz von Detergenzien in den Puffern bewirkt zusätzlich, dass unspezifische Protein-Protein-Interaktionen oder ein Anheften von AK oder Analyt an Oberflächen verringert und so stabilisiert werden [136].

In der Prozessentwicklung kann für alle Schritte die Inkubationszeit angepasst werden. Ziel ist es, den Assay möglichst kurz zu halten, da besonders bei der Detektion und Quantifizierung von Aggregaten eine kurze Prozesszeit von großer Bedeutung ist, da wie in Kapitel 1.3 beschrieben Oligomere nur über einen gewissen Zeitraum stabil sind. Allerdings kann eine kurze Inkubationszeit zu einem geringen Signal führen, da sich das Gleichgewicht zwischen AK und Analyt erst einstellen muss. Eine lange Inkubationszeit dagegen kann unspezifische Signalerzeugung durch vermehrte unspezifische Bindungen begünstigen [117]. Eine Veränderung der Inkubationstemperatur kann ebenfalls vorgenommen werden. Durch eine Erhöhung der Temperatur kann die Inkubationszeit verkürzt werden, da sich das Gleichgewicht zwischen AK und Analyt schneller einstellt [137]. Allerdings muss bei einer Erhöhung der Temperatur die Stabilität der einzelnen Komponenten berücksichtigt werden und auch unspezifische Bindungen müssen ausgeschlossen werden. Somit muss ein Kompromiss zwischen Inkubationszeit und -temperatur gefunden werden [117, 137].

Berechnung der prozentualen Wiederfindungsrate nach Davies (2013) [127]:

$$\text{Wiederfindungsrate [\%]} = \frac{\text{Signal in Probenmatrix}}{\text{Signal in Referenz}} \cdot 100 \quad (1.1)$$

### 1.3.2.2 Prozessentwicklung und Assayvalidierung

Für die Beurteilung der Leistung eines Assays während der analytischen Validierung wird zum einen das Signal-Rausch-Verhältnis (SRV) berechnet, in dem der Wert der Pufferkontrolle (BC, engl.: *buffer control*) mit den Messwerten dividiert wird, sodass das Hintergrundrauschen vom Signal getrennt wird. Während der Assayverifizierung ist es daher das Ziel, das SRV möglichst zu steigern, indem das spezifische Signal erhöht und gleichzeitig das Hintergrundsignal reduziert wird [127].

Zum anderen wird die Selektivität des Assays beurteilt, um auszuschließen, dass andere in der Probe erhaltene Komponenten das Messergebnis verfälschen. Des Weiteren wird die Präzision des Assays determiniert, indem beispielsweise überprüft wird, ob eine unabhängige Wiederholung des Assays übereinstimmende Messwerte erzeugt [128, 138].

Ein Schritt der Prozessentwicklung ist die Berechnung der Wiederfindungsrate. Die Wiederfindungsrate eines Analyten ist das Signal, das aus einer bekannten, inkrementellen Menge des Analyten, die der biologischen Matrix zugesetzt wurde (sogenanntes *Spiken*) im Vergleich zum gemessenen Signal des Analyten in Verdünnungspuffer als Referenz erhalten wird. Die tatsächlichen Konzentration des Analyten entspricht dabei dem gemessenen Signal im Verdünnungspuffer [127, 128, 130]. Dazu wird die prozentuale Wiederfindungsrate nach folgender Formel berechnet:

Dies dient dazu, zu untersuchen, ob die erhaltene Konzentration in der Kalibration ähnlich zu der Konzentration, die in die Probenmatrix gegeben wurde, ist. Ist dies nicht der Fall, lässt dies vermuten, dass es Unterschiede zwischen dem Verdünnungspuffer und der Probenmatrix gibt, die das gemessene Signal beeinflussen. Um dies zu vermeiden, besteht die Möglichkeit, die Proben zu verdünnen oder auch den Verdünnungspuffer so anzupassen, dass dieser der Probenmatrix entspricht [127, 128].

## 1.4 Zielsetzung

Selbst in der heutigen Zeit mit weit fortgeschrittenen medizinischen Methoden basiert die Diagnose für eine PD auf klinischen Parametern und bildgebenden Verfahren, deren Einsatz erst spät in der Krankheit nach dem Auftreten der motorischen Symptome erfolgen kann [23, 35]. Neuere Studien zeigen das Vorhandensein von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Gewebe des GIT was vermuten lässt, dass humane pathologische  $\alpha$ -Syn-Aggregate die z. B. von betroffenen enterischen Neuronen freigesetzt werden, die Schleimhaut des GIT durchdringen und mit dem Stuhl ausgeschieden werden können [95, 139]. Der sFIDA-Assay wurde bereits angewendet,  $\alpha$ -Syn- und Tau-Aggregate in Liquor aus Patienten mit PD, DLB und anderen neurodegenerativen Erkrankungen zu quantifizieren. Somit stellt der sFIDA-Assay eine zuverlässige und höchst sensitive Methode für die Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen dar [120].

Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob humane pathologische  $\alpha$ -Syn-Aggregate mittels sFIDA-Assay nachweisbar und quantifizierbar sind. Daher soll der sFIDA-Assay in einem ersten Teil für den Nachweis von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten aus menschlichen Stuhlproben adaptiert werden. Dann soll der Assay bezüglich seiner analytischen Leistung validiert werden, indem Parameter wie die Nachweisgrenze (LOD, engl.: *limit of detection*), der Variationskoeffizient (CV%, engl.: *coefficient of variation*), die Wiederfindungsrate, die *Inter-Assay*-Korrelation und die Kreuzreaktivität mit anderen Aggregaten bewertet werden.

In einem zweiten Teil soll die diagnostische Validität des entwickelten sFIDA-Assays anhand der Quantifizierung von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten aus humanen Stuhlproben bewertet werden. Hierzu sollen 223 Stuhlproben von 93 PD-Patienten, 72 iRBD-Patienten und 56 gesunden Kontrollen genutzt werden um zu überprüfen, ob der Assay fähig ist, alle drei Kohorten voneinander zu unterscheiden. Des Weiteren soll diskutiert werden, ob der entwickelte sFIDA-Assay als diagnostischer Test für die frühe Detektion von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten aus Stuhlproben genutzt werden kann.

## 2 Material und Methoden

Im Folgenden sind alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Materialien sowie die Methoden und deren Durchführung aufgeführt. Die Arbeiten wurden unter QMS-gesteuerten Bedingungen nach ISO 9001:2015 durchgeführt.

### 2.1 Material

Sämtliche für diese Arbeit verwendeten Chemikalien, Puffer und weitere Verbrauchsmaterialien waren von höchster Qualität. Die verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Gerätschaften und Software-Programme sind im Anhang in Kapitel 5.1.1 aufgeführt.

#### 2.1.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Alle Puffer wurden, sofern nicht anders angegeben, in ddH<sub>2</sub>O hergestellt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Alle Waschpuffer und hergestellte Kit-Puffer waren mit einer eigenen Lot und einem Haltbarkeitsdatum versehen und wurden stets vor dem Ablauf des Haltbarkeitsdatums verwendet. Zudem wurden alle verwendeten Puffer und Lösungen mit einem PVDF-Membranfilter (Porengröße 0,22 µm) vor der Verwendung sterilfiltriert.

**Tabelle 2.1 – Verwendete Puffer, Hersteller und Artikelnummer**

<b>Puffer</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
10x PBS	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	D1408
10x TBS	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	42596.01
EliA Sample Diluent (EliA-Diluent)	Phadia AB, Uppsala, Schweden	83-1023-01
EliA Calprotectin 2 Extraktions Puffer (EliA-Extraktionspuffer)	Phadia AB, Uppsala, Schweden	83-1147-41
SmartBlock	Candor Bioscience GmbH, Wangen, Deutschland	113 500
The Blocking Solution	Candor Bioscience GmbH, Wangen, Deutschland	110 500



**Tabelle 2.2 – Verwendete Lösungen, Waschpuffer und Kit-Puffer sowie deren Zusammensetzung**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
EliA-Extraktionspuffer mit PI	EliA-Extraktionspuffer 1x PI (1 Tablette auf 50 mL)
1 % BSA in EliA-Extraktionspuffer	EliA-Extraktionspuffer 1 % bovines Serumalbumin (BSA)
0,1 M NaHCO <sub>3</sub> -PC	0,1 M NaHCO <sub>3</sub> in ddH <sub>2</sub> O 0,03 % ProClin 1 g PTA in 7 mL ddH <sub>2</sub> O
10 % PTA, pH-Wert = 7,4	pH-Wert mit NaOH einstellen auf 10 mL mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen
1x PBS	10x PBS 1:10 verdünnt in ddH <sub>2</sub> O
PBS-T	1x PBS 0,05 % Tween20
PBS-PC	1x PBS 0,03 % ProClin
25x PI	1 Tablette cComplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail in 2 mL 1x PBS
10 % Sarkosyl	1 g Sarkosyl in 10 mL 1x PBS
1x TBS	10x TBS 1:10 verdünnt in ddH <sub>2</sub> O
TBS-T	1x TBS 0,05 % Tween20
0,1 % BSA in TBS-T	1x TBS 0,05 % Tween20 0,1 % BSA
TBS-PC	1x TBS 0,03 % ProClin
1 % BSA in TBS-PC	1x TBS 0,03 % ProClin 1 % BSA
0,5 % BSA in TBS-PC	1x TBS

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

	0,03 % ProClin
	0,5 % BSA
	1x TBS
1 % MP in TBS-PC	0,03 % ProClin
	1 % Milchpulver
	1x TBS
0,5 % MP in TBS-PC	0,03 % ProClin
	0,5 % Milchpulver

---

BSA: bovines Serumalbumin; MP: Milchpulver; PI: Proteaseinhibitor (cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail); PC: ProClin; T: Tween20

### 2.1.2 Verwendete Antikörper und Fluorophore

**Tabelle 2.3 – Für den sFIDA-Assay verwendete AK, deren Bindestellen, Hersteller und Artikelnummer**

Antikörper	Epitop	Hersteller	Artikelnummer
Aufgereinigter anti- $\alpha$ -Syn, 103-108-AK, Klon 4B12 Alexa Fluor 488	AS 103–108 ( $\alpha$ -Syn)	BioLegend, San Diego, USA	SIG-39730
anti- $\beta$ -Amyloid, 1-16-AK, Klon 6E10 (6E10-AF488) IC16-AK	BioLegend Inc., San Diego, USA AS 1–8 (A $\beta$ )	803013 Universitätsklinikum Düsseldorf, Prof.- Dr.- Carsten Korth, Düsseldorf, Deutschland	–
Recombinanter Anti- $\alpha$ -Syn phospho S129 (EP1536Y)-AK $\alpha$ -Syn (Syn211)-AK	Phosphoryliertes Serin 129 in $\alpha$ -Syn AS 121–125 ( $\alpha$ -Syn)	Abcam, Cambridge, GB Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA	ab51253 sc-12767
Anti-aggregiertes $\alpha$ -Syn-AK, Klon 5G4	Aggregiertes $\alpha$ -Syn	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	MABN389
Aufgereinigter anti- $\alpha$ -Syn-AK, Klon 4D6	AS 124–134 ( $\alpha$ -Syn)	BioLegend, San Diego, USA	SIG-39720
Aufgereinigter Maus anti- $\alpha$ -Syn-AK, Klon 42 (Syn1)	AS 91–99 ( $\alpha$ -Syn)	BD (Becton, Dickinson and Company), Franklin Lakes, USA	610787
Anti- $\beta$ -Amyloid-AK, Klon NAB228	AS 1–11 (A $\beta$ )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	A8354

**Tabelle 2.4 – Für die AK-Konjugation verwendete Fluorophore, Hersteller und Artikelnummer**

<b>Fluorophor</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
Atto488	ATTO-TEC GmbH, Siegen, Deutschland	565-35
N-Hydroxysuccinimid (NHS)		
CF405S Succinimidylester	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	SCJ4600013
CF488A Succinimidylester	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	SCJ4600018
CF633 Succinimidylester	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	SCJ4600039

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Synthese Protein-gekoppelter Silikananopartikel (SiNaPs)

In der vorliegenden Arbeit wurden Silikananopartikel (SiNaPs) sowohl für die Kalibrierung als auch für die Durchführung von Selektivitätsstudien verwendet, wobei sie wie von Blömeke et al. beschrieben hergestellt wurden [120]. Der Grundkörper der SiNaPs wurde mittels Stöber-Prozess synthetisiert [124]. Die Oberfläche wurde anschließend mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) aminiert, um potenzielle Bindestellen für die nachfolgende Funktionalisierung einzuführen. Die 6-Maleinimido-hexansäure (MIHA) wurde anschließend mit 200 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 50 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS) für 10 min bei Raumtemperatur (RT) aktiviert, damit diese an die Amine gekoppelt werden konnte. Die Carboxylgruppe der MIHA wurde kovalent an die Amine der SiNaPs durch Inkubation für 1 h bei RT gebunden. Dann wurden die  $\alpha$ -Syn- (AS 115–130) oder A $\beta$ -Proteinfragmente (AS 1–15), welche zur späteren Validierung der Selektivität des Assays verwendet wurden, über die MIHA mit der aminierten Oberfläche quervernetzt.

Anschließend folgten drei Waschschrte, bei denen die SiNaPs bei 7000 x g für 2 min zentrifugiert wurden und in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, engl.: *phosphate-buffered saline*) mit 10 % N, N-Dimethylformamid (DMF) und im letzten Waschschrte in 10 % DMF und 50 mM Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (Na<sub>2</sub>EDTA) in PBS redispergiert wurden. Für die Synthese der Protein-konjugierten SiNaPs wurde Protein zu 200 nM dispergierten SiNaPs zugefügt, sodass 10 % der möglichen Bindestellen funktionalisiert wurden. Die Dispersion wurde dazu bei 650 rpm bei RT geschüttelt und zur Vermeidung von Oxidation der Proteine nach 1 h 50  $\mu$ L Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) hinzugefügt. Zuletzt wurde die Reaktion durch Zugabe von 20  $\mu$ L 1 M 2-Mercaptoethanol-Lösung abgestoppt, zweimal durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 4 min und Redispersierung in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Zuletzt wurden die fertigen Si-

NaPs 1:1 in Dimethylsulfoxid (DMSO) verdünnt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Protein-gekoppelten SiNaPs wurden anschließend vor jeder Nutzung für 10 min im Ultraschallbad sonifiziert.

Für alle Experimente wurde der gleiche Ansatz an  $\alpha$ -Syn- oder A $\beta$ -SiNaPs verwendet. Um als Kalibrierstandard eingesetzt zu werden, wurden die  $\alpha$ -Syn-SiNaPs entweder im jeweiligen Verdünnungspuffer oder Extraktionspuffer in einer 1:10 oder halblogarithmischen Verdünnungsreihe verdünnt.

### 2.2.1.1 Charakterisierung der SiNaPs

Die Größe und die Partikelform der aminierten SiNaPs wurden wie zuvor beschrieben mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) analysiert [124]. Eine durchschnittliche Größe von 18,5 nm wurde für den aminierten Silika-Kern bestimmt. Für die Bestimmung der Siliziumkonzentration wurde die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) verwendet. Die molare Konzentration der SiNaPs wurde im Anschluss anhand der Siliziumkonzentration sowie der Größe, Dichte und Form durch Volker Nischwitz bestimmt [120].

### 2.2.2 Herstellung synthetischer Aggregate

Synthetische Aggregate wurden zusätzlich als weiteres Modellsystem für  $\alpha$ -Syn-Aggregate und in der Assayvalidierung verwendet. Für die Herstellung wurde Wildtyp (WT)  $\alpha$ -Syn aufgereinigt und auf eine Konzentration von 1 mg/mL in 100 mM Natriumchlorid (NaCl) und 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) verdünnt. Das Protein wurde bei  $37^{\circ}\text{C}$  bei 1000 rpm in einem Thermomixer für sieben Tage zur Aggregatbildung inkubiert. Vor der Verwendung wurden die Aggregate insgesamt 60 s in vier 15 s Intervallen sonifiziert, damit die Aggregate eine gleichmäßige Größe hatten. In den Intervallen wurde jeweils 1 s sonifiziert und 1 s pausiert und zwischen den Intervallen eine 2-minütige Pause eingelegt, sodass die Aggregate nicht zu sehr erhitzt wurden. Die Sonifizierung der Aggregate erfolgte mit einem Sonopuls Ultraschallhomogenisator. Die Aggregate wurden abschließend in 50  $\mu\text{L}$  Aliquots in low-binding 1,5 mL Reaktionsgefäße bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert.

### 2.2.3 Antikörperkonjugierung

Fluoreszierende Antikörper (Detektionssonden) wurden für die Markierung und anschließende mikroskopiebasierte Detektion von Aggregaten genutzt. Die AK (s. Tabelle 2.5) wurden mit den CF-Fluorophoren CF633 (rot), CF405S (blau) oder CF488A (grün) konjugiert, deren Eigenschaften in Tabelle 2.6 aufgeführt wurden [119, 120].

Das Markieren erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Alle Fluorophore waren mit einer Succinimidylgruppe verestert. Damit die Farbstoffe kovalent mit den Aminen der AK reagieren, wurden die Farbstoffe mit aktivierten Succinimidylestern mit den AK in basischem Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )-Puffer, pH = 8,4) gemischt und für 1 h unter Schütteln bei RT im

**Tabelle 2.5 – Für den sFIDA-Assay markierte AK und deren Bindestellen**

Antikörper	Epitop
4B12-AK	AS 103–108 ( $\alpha$ -Syn)
IC16-AK	AS 1–8 (A $\beta$ )
EP1536Y-AK	Phosphoryliertes Serin 129 in $\alpha$ -Syn
Syn211-AK	AS 121–125 ( $\alpha$ -Syn)

**Tabelle 2.6 – Physikalische Eigenschaften der verwendeten Fluorophore CF405S, CF488A und CF633**

Fluorophor	$\lambda_{\text{ex}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em}}$ [nm]	$\epsilon_{\text{AF}}$ [cm <sup>-1</sup> · M <sup>-1</sup> ]	KF
CF405S	404	431	33.000	0,70
CF488A	490	515	70.000	0,10
CF633	630	650	100.000	0,48

$\lambda_{\text{ex}}$ : maximale Absorptionswellenlänge;  $\lambda_{\text{em}}$ : maximale Emissionswellenlänge;  $\epsilon_{\text{AF}}$ : molarer Extinktionskoeffizient; KF: Korrekturfaktor bei 280 nm

Dunkeln inkubiert. Dadurch wurde der Fluorophor an den AK durch die Abspaltung der Succinimidylgruppe kovalent gebunden. Die Aufreinigung der Detektionssonden erfolgte mit einer Polyacrylamid-Suspension (Bio-Gel P 30 Gel) nach Herstellerangaben. Für das Säulenbett wurden 2 mL Zentrifugations-Röhrchen mit 1,5 mL Polyacrylamid-Suspension ohne Luftsinschlüsse befüllt und überschüssiger Puffer bei 1000 x g für 2 min abzentrifugiert. Zuletzt wurde das Antikörperkonjugationsgemisch auf das Säulenbett aufgetragen und erneut bei 1000 x g für 3 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde aufgefangen und in ein 1,5 mL *low binding* Reaktionsgefäß überführt.

Im Anschluss an die Aufreinigung wurden die Konzentration ( $c$ , Formel 2.1) und das Grad der Markierung (DOL, engl.: *degree of labeling*, Formel 2.1) der Detektionssonde bestimmt. Dazu wurde zum einen die Absorption des AK bei 280 nm ( $A_{280\text{nm}}$ ) und zum anderen die Anregungswellenlänge des jeweiligen Fluorophores ( $\lambda_{\text{ex}}$ , Tabelle 2.6) mit dem UV/Vis-Spektrophotometer gemessen und das Ergebnis unter Berücksichtigung des Korrekturfaktors (KF) und dem jeweiligen Extinktionskoeffizienten des AK ( $\epsilon_{\text{AK}}$ ) und Fluorophores ( $\epsilon_{\text{AF}}$ ) berechnet.

Berechnung der Konzentration ( $c$  [M]) der markierten AK:

$$c \text{ [M]} = \frac{A_{280\text{nm}} - (A_{\lambda_{\text{ex}}} \cdot \text{KF})}{\epsilon_{\text{AK}}} \quad (2.1)$$

$c$ : Konzentration [M];  $A_{280\text{nm}}$ : Absorption bei 280 nm;  $\lambda_{\text{ex}}$ : Anregungswellenlänge des Fluorophores [nm]; KF: Korrekturfaktor;  $\epsilon_{\text{AK}}$ : Extinktionskoeffizient des Antikörpers (203.000 cm<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>)

Da sich sowohl die Anregungs- als auch Emissionswellenlänge der Fluorophore CF405S (blau) bzw. CF488A (grün) von CF633 (rot) unterscheiden, konnten Detektionssonden in Kombination

Berechnung des DOL der markierten AK:

$$\text{DOL} = \frac{\text{mol Fluorophor}}{\text{mol AK}} = \frac{\lambda_{\text{ex}}}{\varepsilon_{\text{AF}} \cdot c_{(\text{AK})}} \quad (2.2)$$

DOL: Grad der Markierung (engl.: *degree of labeling*);  $\lambda_{\text{ex}}$ : Anregungswellenlänge des Fluorophors;  $\varepsilon_{\text{AF}}$ : Extinktionskoeffizient des Fluorophors bei  $\lambda_{\text{ex}}$ ;  $c_{(\text{AK})}$ : Proteinkonzentration

von CF633/CF405S und CF633/CF488A als sogenannte Detektions-AK eingesetzt werden. Die Detektionssonden konnten somit während der Fluoreszenzmikroskopie separat angeregt und detektiert werden. Die Detektionssonden wurden bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

## 2.3 Patienten

Die Rekrutierung und Beurteilung der PD- und iRBD-Patienten, gesunden Kontrollen (HC) sowie die Probensammlung erfolgte durch den Kooperationspartner, dem Institut der Neurologie, der medizinischen Fakultät am Uniklinikum Köln.

Die Stuhlproben wurden zwischen Juli 2020 und September 2021 mithilfe von 15 mL Stuhlröhrchen mit Schraubverschluss und im Deckel integriertem Entnahmelöffel gesammelt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde zusätzlich ein Papier-Stuhlfänger verwendet. Die Proben wurden an verschiedenen Orten gesammelt. Wenn die Probe zu Hause gesammelt wurde, wurde diese in den meisten Fällen innerhalb von zwei Stunden weiterverarbeitet. In der Zwischenzeit wurde die Stuhlprobe in einem Plastikbeutel im Kühlschrank aufbewahrt. Pseudonymisierte Proben wurden bei –80 °C gelagert. Alle Daten und Proben im Zusammenhang mit den Patienten wurden anonymisiert. Zum Zeitpunkt der sFIDA-Messungen waren die klinischen Daten bekannt.

Es wurden nur Proben von nicht-dementen erwachsenen Patienten für diese Studie verwendet, die schriftlich zur Teilnahme eingewilligt haben. Diese Studie wurde durch die lokale Ethikkommission genehmigt (Nr.: 19-1644). PD- und iRBD-Patienten sowie HC wurden am Institut der Neurologie der Uniklinik Köln aufgenommen.

Alle Personen mussten einen Basis-Charakteristik-Fragebogen ausfüllen, bei dem unter anderem Informationen zu Alter, Geschlecht, Händigkeit, Bildungsjahren und medizinischer Vergangenheit erfasst wurden. Weitere Informationen zu allen Patienten wurden mit Hilfe der folgenden Fragebögen erhoben: die validierte deutsche Version des Screening-Fragebogens für Parkinsonismus der im Original durch Tanner und Kollegen entwickelt wurde [140], den RBD-Screening-Fragebogen (RBDSQ, engl.: *REM sleep behavior disorder screening questionnaire*) [40], das Cleveland-Clinics-Obstipations Punktesystem (CCCSS, engl.: Cleveland Clinics Constipation Scoring System) [141], den Fragebogen zu trockenen Augen (OSDI, engl.: Ocular Surface Disease Index) [142], den überarbeiteten Beck-Depressions-Inventar (BDI-II, engl.: Beck Depression Invento-

ry) [143], den Memory-Assessment-Clinic-Fragebogen (MAC-F) [144] und den Fragebogen für funktionelle Aktivitäten (FAQ, engl.: Functional Activities Questionnaire) [145]. Zusätzlich wurde ein Geruchstest für jede Person nach einem standardisierten Protokoll durchgeführt. Für den RBDSQ wurde nach Nomura et al. (2011) ein Grenzwert von sechs für eine RBD-Diagnose angenommen. Schnitten Probanden gleich oder höher ab, wurde von einer vorhandenen RBD ausgegangen [146].

PD-Patienten wurden mittels Patientenkarten der Ambulanz oder der Krankenstation des Uniklinikums Köln rekrutiert. Patienten wurden anhand der von der MDS aufgestellten klinischen Kriterien mit PD diagnostiziert (n = 94) [147]. Klinische und demografische Informationen einschließlich der Krankheitsdauer wurden auf Grundlage der ärztlichen Berichte eines Prüfers und einer sorgfältigen Anamnese erhoben. Außerhalb dieser Studie bekamen manche PD-Patienten einen DaTSCAN und einen Levodopa-Herausforderungstest (LCT, engl.: *Levodopa challenge test*).

Alle iRBD-Patienten waren Teil einer laufenden Studie (n = 72), für die eine lokale prodromale PD-Kohorte in Köln über Zeitungsanzeigen aus der Gemeinde rekrutiert wurde. Nach einem strukturierten Telefoninterview wurden Personen, bei denen eine hohe Wahrscheinlichkeit für iRBD bestand, zu einer Polysomnografie (PSG) eingeladen. Dazu wurde ein mobiles SOMNOscreen TM plus Gerät für die über Nacht (ü. N.) verlaufende PSG wie zuvor beschrieben verwendet [39]. Visuelle PSG-Bewertungen wurden in 30 s andauernden Intervallen durchgeführt sowie eine Diagnose für iRBD anhand der Richtlinien der American Academy of Sleep Medicine (AASM) für die Bewertung von Schlaf und damit verbundenen Ereignissen gestellt (Version 2.6.17) [41].

Zusätzlich zu dem Basis-Charakteristik-Fragebogen wurde jeder der PD- und iRBD-Patienten nach der Hoehn-und-Yahr-Skala [42] sowie der Skala zur Verlaufsbeobachtung bei PD Teil I und IV (MDS-UPDRS I/IV, engl.: Movement Disorder Society's Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part I/IV) durch einen Prüfer bewertet [43]. Die Patienten wurden ebenfalls gebeten, den Fragebogen zur Skala der nicht-motorischen Symptome (NMSS, engl.: Non-Motor Symptoms Scale) für PD [44] und zur MDS-UPDRS II auszufüllen [43]. Motorische Funktionen wurden mit dem MDS-UPDRS III ermittelt [43]. Die kognitive Leistung wurde mittels DemTect erfasst [45].

Teilnehmer ohne eine bekannte neurologische Störung wurden als gesunde Kontrollen (HC, n = 57) durch Werbung rekrutiert und in vielen Fällen erklärten sich die Betreuer der PD-Patienten bereit, an der Studie teilzunehmen. Zusätzlich zum Basis-Charakteristik-Fragebogen (siehe oben) füllten die HC ebenfalls den NMSS-Fragebogen für PD und den RBDSQ aus. HC mit einem RBDSQ-Wert größer als fünf wurden von der Analyse ausgeschlossen (n = 6) [146].



## 2.4 Probenvorbereitung

### 2.4.1 Stuhlhomogenisierung

Eingangs wurden die Stuhlproben nach der Bristol-Skala bewertet [148], in 1,5 mL Mikroröhren Protein *low-binding* mit Schraubverschluss aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Verwendung im sFIDA-Assay wurden die Proben homogenisiert. Dazu wurden die Proben für 15 min bei RT aufgetaut und die Homogenisierung nach den Angaben der EliA Stuhlextraktionsanleitung (Phadia AB, Uppsala, Schweden) mit minimalen Änderungen durchgeführt. Mittels Simplix-Stuhlprobenröhrchen wurden ca. 17 mg Stuhl entnommen und in 1300  $\mu\text{L}$  kaltem Extraktionspuffer durch Vortexen homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend in ein 2 mL Eppendorf low binding Reaktionsgefäß vorsichtig dekantiert und bei  $3000 \times g$  für 5 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, um nicht-lösliche Komponenten zu pelletieren. Zuletzt wurde der Überstand in ein 1,5 mL Eppendorf *low binding* Reaktionsgefäß aliquotiert und entweder bis zur Verwendung am selben Tag bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.4.2 Natrium-phosphorwolframat (PTA)-Fällung von Stuhlproben

Im Zuge der Assayvalidierung des sFIDA-Assays wurde eine Natrium-phosphorwolframat-Fällung (PTA, engl.: *Sodium phosphotungstate hydrate*,  $2\text{Na}_2\text{O}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot 12\text{WO}_3\cdot 18\text{H}_2\text{O}$ ) mit Stuhlproben durchgeführt, um die vorhandenen  $\alpha$ -Syn-Aggregate in Stuhl aufzureinigen und eventuell störende Matrixkomponenten zu entfernen. Dazu wurde zunächst eine 10 %ige PTA-Lösung in ddH<sub>2</sub>O hergestellt und auf pH = 7,2 mit Natriumhydroxid (NaOH) eingestellt. Als Zweites wurde eine 10 %ige N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz (Sarkosyl)-Lösung in 1x PBS und zuletzt eine 25x-Lösung des Proteaseinhibitor-Cocktails (PI, cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail) in 1x PBS hergestellt. Alle Lösungen wurden wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben steril filtriert. Dann wurde der PTA-Mastermix angefertigt (s. Tabelle 2.7) und so entweder unverdünnte oder 1:2,8 verdünnte Stuhlproben gefällt. Für die unverdünnten Stuhlproben wurden jeweils 440  $\mu\text{L}$  Mastermix und 560  $\mu\text{L}$  Stuhlhomogenat bzw. für 1:2,8 verdünnte Stuhlproben jeweils 616  $\mu\text{L}$  Mastermix mit 784  $\mu\text{L}$  Stuhlhomogenat vermischt. So hatten beide Ansätze die gleiche Ausgangsmenge an Stuhlhomogenat, wobei durch die Verdünnung der Stuhlproben getestet werden sollte, ob eine Verdünnung der Matrixkomponenten zu einer verbesserten PTA-Fällung führte. Die Proben wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 1 h auf dem Schüttler bei 1200 rpm inkubiert und anschließend für 30 min bei  $14.000 \times g$  pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das jeweilige Pellet in 120  $\mu\text{L}$  Extraktionspuffer mit PI gelöst und schließlich für den sFIDA-Assay verwendet.

**Tabelle 2.7 – End-Konzentrationen und eingesetzte Mengen der Lösungen des PTA-Mastermix für 1 mL End-Volumen**

Lösung	Konzentration im Mastermix	Menge für 1 mL End-Volumen
10 % PTA, pH = 7,4	2 %	200 $\mu$ L
10 % Sarkosyl	2 %	200 $\mu$ L
25x PI	1x	40 $\mu$ L
		→ ergibt 440 $\mu$ L

## 2.5 sFIDA-Assayprotokoll

Um den sFIDA-Assay für die Detektion von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhlproben anzupassen und zu validieren, wurden Versuche zur Antikörperkombination sowie zur Konzentration von Fänger- und Detektions-AK, dem Extraktions- und Verdünnungspuffer und der Blockierungslösung durchgeführt (s. Tabelle 2.8 mit Übersicht aller Versuche). Abschließend wurde die  $\alpha$ -Syn-Konzentration in den vorhandenen Stuhlproben von PD- und iRBD-Patienten sowie HC gemessen. Im Folgenden werden die angepassten Assaybedingungen beschrieben, wobei die Bedingung die zu einer Steigerung der Leistung des sFIDA-Assays führte (vergleiche Kapitel 1.3.2), immer als Referenz für die folgenden Experimente galt. Die anschließende automatisierte Datenanalyse fand mittels dem sFIDa-Softwaretool statt (s. Kapitel 2.6.2). Dabei wurden Parameter wie die Pixel-Anzahl und der sFIDA-Messwert analysiert und anhand dessen das Proben-Kontroll-Verhältnis (PKV) und das SRV bzw. die Signalsteigerung berechnet.

### 2.5.1 Allgemeiner Ablauf des sFIDA-Assays

Für diese Arbeit wurden sowohl 384-Kavitäten-Glasboden-Mikrotiterplatten von Greiner (Sensoplate Plus) als auch gleichartige Mikrotiterplatten von Thermo-Fischer (Thermo-Platte) verwendet. Während der Inkubationsschritte wurden die Platten stets mit einem Deckel abgedeckt, um eine Verunreinigung mit Schmutz- oder Staubpartikeln zu vermeiden. Die Glasoberfläche wurde mit 40  $\mu$ L des Fänger-AK in 1x PBS beschichtet. Nachdem die Platte fünfmal mit 80  $\mu$ L TBS-T (TBS mit 0,05 % Tween20) und danach fünfmal mit 80  $\mu$ L TBS gewaschen wurde, wurden die Kavitäten mit 80  $\mu$ L Blockierungslösung blockiert, damit noch freie Oberfläche abgesättigt wurde und unspezifische Bindungen des Analyten oder Detektions-AK im Anschluss verhindert wurden. Anschließend wurde die Platte erneut fünfmal mit TBS-T und TBS gewaschen und für 1 h mit 20  $\mu$ L der Proben inkubiert. Nachdem fünfmal mit TBS gewaschen wurde, wurden die Kavitäten für 1 h mit einem Mix aus zwei Detektionssonden, dem Detektions-AK, inkubiert. Diese wurden zuvor für 1 h bei 4 °C mit 100.000 x g ultrazentrifugiert, um Artefakte durch aggregierte AK oder Fluorophore bei der Messung zu vermeiden. Die Kavitäten wurden erneut mit TBS gewaschen

und für die Messung der Puffer in den Kavitäten zu TBS-ProClin (TBS mit 0,03 % ProClin (PC)) gewechselt, damit ein Bakterienwachstum während der Messung verhindert werden konnte. Gegen ein Austrocknen der Kavitäten wurde eine klare Folie (SealPlate) aufgeklebt. Die Puffer und Proben wurden auf RT temperiert in die Kavitäten gegeben, wobei frisch extrahierte Stuhlproben ca. 5 min vor dem Auftragen aus dem Kühlschrank genommen wurden und gefrorene Proben ca. 5 min – 15 min (je nach Volumen) auf RT gestellt wurden. Die BC bestand immer aus Puffer ohne Analyten, die Fänger-AK Kontrolle (CC, engl.: *capture control*) und Detektions-Kontrolle (DC, engl.: *detection control*) jeweils aus Puffer ohne den entsprechenden AK und dienten als Negativkontrollen. Alle Standards und Proben wurden als vier Replikate pipettiert. Die Arbeiten wurden alle unter einer Sterilbank durchgeführt und das Pipettieren erfolgte für alle Schritte außer den Probenauftrag revers. Alle Waschschrte wurden mit einem automatisierten Mikroplattenwaschgerät durchgeführt.

### 2.5.2 Assayvalidierung und analytische Validierung

Neben dem Fänger-AK, der Blockierungslösung, der Probeninkubation und der Detektions-AK-Inkubation spielten zudem die Probenvorbereitung und -verdünnung eine wichtige Rolle, da verschiedene Komponenten in Stuhl wie z. B. Lipide, Essensreste oder weitere Proteine einen störenden Einfluss haben können (Abbildung 1.10). Aus diesem Grund wurden diese Parameter alle bei der Assayvalidierung angepasst. Eine erste Entwicklung des sFIDA-Assays für Stuhlproben wurde intern bereits durchgeführt, weswegen die folgenden Assaybedingungen als Startpunkt für die Validierung und Verifizierung der Detektion von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten gewählt wurden:

1. Stuhlhomogenisierung
  - 1300  $\mu$ L EliA-Extraktionspuffer mit 1 % BSA
  - Homogenisierung der Stuhlproben am gleichen Tag und Lagerung bei 4 °C bis zur Verwendung
2. Fänger-AK-Inkubation (nicht-kovalent)
  - Fänger-AK: Syn211-AK in 1x PBS (pH 7,4) mit einer Konzentration von 10  $\mu$ g/mL
  - pro Kavität 40  $\mu$ L Fänger-AK Lösung, Inkubation: ü. N. bei 4 °C
  - Waschroboter: 5x 80  $\mu$ L 1x TBS-T, 5x 80  $\mu$ L TBS
3. Blockierung
  - pro Kavität 80  $\mu$ L 1 % BSA in TBS-PC (pH 7,4), Inkubation: 1,5 h bei RT
  - Waschroboter: 5x 80  $\mu$ L 1x TBS-T, 5x 80  $\mu$ L TBS
4. Probeninkubation
  - 1:50 mit 1 % BSA in TBS-PC (pH 7,4) verdünnte Stuhlproben

- pro Kavität 20 µL Probe (4x Bestimmung), Inkubation: 1 h bei RT
- Waschroboter: 5x 80 µL TBS

### 5. Detektions-AK-Inkubation

- Detektions-AK in 1x TBS (pH 7,4) angesetzt: Syn211-CF633 und 4D6-ATTO488, jeweils  $c = 0,625 \mu\text{g/mL}$
- Ultrazentrifugation: 1 h bei 4 °C und 100.000 x g, Überstand abnehmen
- pro Kavität 20 µL Detektions-AK, Inkubation: 1 h bei RT
- Waschroboter: 5x 80 µL TBS
- Zu Messpuffer wechseln: pro Kavität 80 µL TBS-PC
- mit Folie abkleben

Als Entwicklungsproben wurden Stuhlproben mit ausreichender Probenmenge von zufällig ausgewählten Kontrollen und Patienten ausgewählt. Zusätzlich wurden synthetische  $\alpha$ -Syn-Aggregate und  $\alpha$ -Syn-SiNaPs als Positivkontrollen und Assaystandards verwendet. Eine Übersicht aller durchgeführten Versuche und deren Versuchsbedingungen zur Assayentwicklung sind in der folgenden Tabelle aufgeführt (s. Tabelle 2.8).

Tabelle 2.8 – Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Assayentwicklung und die jeweiligen Assaybedingungen

Experiment	Proben	Assaybedingungen	
<b>Exp. 1: Fänger-AK-Konzentration, Detektions-AK</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 % BSA in EliA Extraktionspuffer, 6 Stuhlproben</li> <li>– 1:50 verdünnt in 1 % BSA in TBS-PC, 1 h bei RT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fänger-AK: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Syn211-AK 0 µg/mL bis 10 µg/mL in PBS, 4 °C ü.N.</li> </ul> </li> <li>• Blockieren: <ul style="list-style-type: none"> <li>– 1 % BSA in TBS-PC, 1,5 h bei RT</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detektions-AK: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Syn211-CF633 + 4D6-ATTO488 oder</li> <li>– Syn211-CF633 + Syn211-CF488A jeweils 0,625 µg/mL in TBS, 1 h bei RT</li> </ul> </li> </ul>
<b>Exp. 2: EP1536Y-AK als Detektions-AK</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 % BSA in TBS-PC, 15 Stuhlproben</li> <li>– 1:50 verdünnt in EliA-Diluenten, 1 h bei RT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fänger-AK: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Syn211-AK 7,5 µg/mL in PBS, 4 °C ü.N.</li> </ul> </li> <li>• Blockieren: <ul style="list-style-type: none"> <li>– 0,5 % BSA in TBS-PC für 1,5 h bei RT</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detektions-AK: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Syn211-CF633 + Syn211-CF488A oder</li> <li>– EP1536Y-CF633 + EP1536Y-CF488A jeweils 0,625 µg/mL in TBS, 1 h bei RT</li> </ul> </li> </ul>
<b>Exp. 3: Reproduzierbarkeit sowie Inkubationszeit und -temperatur</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 % BSA in TBS-PC ± PI, 5 Extrakte einer Stuhlprobe</li> <li>– 1:50 verdünnt in EliA-Diluenten, entweder 1 h bei RT, ü.N. bei 4 °C oder 1 h bei 37 °C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fänger-AK: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Syn211-AK 7,5 µg/mL in PBS, 4 °C ü.N.</li> </ul> </li> <li>• Blockieren: <ul style="list-style-type: none"> <li>– 0,5 % BSA in TBS-PC für 1,5 h bei RT</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detektions-AK: <ul style="list-style-type: none"> <li>– EP1536Y-CF633 + EP1536Y-CF488A jeweils 0,625 µg/mL in TBS, entweder 1 h bei RT oder bei 37 °C</li> </ul> </li> </ul>

**Exp. 4: Vergleich  
Syn211-AK mit  
EP1536Y-AK als  
Fänger-AK**

- 1 % BSA in TBS-PC mit PI,  
15 Stuhlproben
  - 1:50 verdünnt in  
EliA-Diluenten, 1 h bei  
37 °C
- Fänger-AK:
  - Syn211-AK oder
  - EP1536Y-AK jeweils  
7,5 µg/mL in PBS, 4 °C  
ü.N.
- Detektions-AK:
  - EP1536Y-CF633 +  
EP1536Y-CF488A jeweils  
0,625 µg/mL in TBS, 1 h bei  
37 °C
- Blockieren:
  - 0,5 % BSA in TBS-PC  
für 1,5 h bei RT

---

Ab hier Assayentwicklung zur Verringerung der Autofluoreszenz

---

**Exp. 5:  
Verdünnungspuffer  
EliA-Diluent vs. 1 %  
BSA in TBS-PC**

- 1 % BSA in TBS-PC mit PI,  
6 Stuhlproben
  - 1:50 verdünnt in  
EliA-Diluenten oder  
1 % BSA in TBS-PC,  
1 h bei RT
- Fänger-AK:
  - Syn211-AK 7,5 µg/mL  
in PBS, 4 °C ü.N.
- Detektions-AK:
  - EP1536Y-CF633 +  
EP1536YCF405S jeweils  
0,625 µg/mL in TBS, 1 h bei  
RT
- Blockieren:
  - 0,5 % BSA in TBS-PC  
für 1,5 h bei RT

**Exp. 6: Verdünnung  
der Stuhlproben,  
blockierendes  
Reagenz**

- 1 % BSA in TBS-PC mit PI,  
6 Stuhlproben
  - 1:400, 1:600 oder  
1:800 verdünnt in  
0,1 % BSA in TBS-PC  
+ 0,05 % Tween, 1 h  
bei RT

**Exp. 7: Inkubationszeit  
Blockieren und  
Blockierungspuffer**

- 1 % BSA in TBS-PC mit PI,  
6 Stuhlproben
  - 1:600 verdünnt in  
0,1 % BSA in TBS-PC  
+ 0,05 % Tween, 1 h  
bei RT

- Fänger-AK:
  - Syn211-AK 7,5 µg/mL  
in PBS, 4 °C ü.N.
- Blockieren:
  - 0,5 % BSA in TBS-PC,
  - 1 % MP in TBS-PC ,
  - The Blocking Solution,
  - SmartBlock jeweils für  
1,5 h bei RT

- Fänger-AK:
  - Syn211-AK 7,5 µg/mL  
in PBS, 4 °C ü.N. oder  
6 h bei RT
- Blockieren:
  - 0,5 % MP in TBS-PC ,
  - 0,5 % MP in PBS-PC,
  - 0,5 % MP in  
NaHCO<sub>3</sub>-PC jeweils  
für 3 h bei RT oder  
ü.N. bei 4 °C

- Detektions-AK:
  - Syn211-CF633 +  
Syn211-CF405S jeweils  
0,625 µg/mL in 0,1 % BSA in  
TBS-T, 1 h bei RT
- Detektions-AK:
  - Syn211-CF633 +  
Syn211-CF405S jeweils  
0,625 µg/mL in 0,1 % BSA in  
TBS-T, 1 h bei RT

**Exp. 8: Test  
verschiedener  
Fänger-AK**

- 1 % BSA in TBS-PC mit PI,  
4 Stuhlproben
  - 1:600 verdünnt in  
0,1 % BSA in TBS-PC  
+ 0,05 % Tween, 1 h  
bei RT
- Fänger-AK:
  - Syn211-AK,
  - EP1536Y-AK,
  - 4B12-AK,
  - 5G4-AK oder
  - 4D6-AK jeweils  
7,5 µg/mL in PBS, 4 °C  
ü.N.

- Detektions-AK:
  - Syn211-CF633 +  
Syn211-CF405S jeweils  
0,625 µg/mL in 0,1 % BSA in  
TBS-T, 1 h bei RT

**Exp. 9:  
Extraktionspuffer**

- 1 % BSA in TBS-PC mit PI
- oder EliA-Extraktionspuffer  
mit PI, 6 Stuhlproben
  - 1:600 verdünnt in  
0,1 % BSA in TBS-PC  
+ 0,05 % Tween, 1 h  
bei RT
- Blockieren:
  - 0,5 % MP in TBS-PC,  
3 h bei RT
- Fänger-AK:
  - Syn211-AK 7,5 µg/mL  
in PBS, 4 °C ü.N.
- Blockieren:
  - 0,5 % MP in TBS-PC,  
3 h bei RT

- Detektions-AK:
  - Syn211-CF633 +  
Syn211-CF405S jeweils  
0,625 µg/mL in 0,1 % BSA in  
TBS-T, 1 h bei RT



**Exp. 10: Vergleich  
frische und gefrorene  
Stuhlproben,  
Reproduzierbarkeit**

- EliA Extraktionspuffer mit PI, jeweils 3 Aliquots aus 3 Extrakten von 3 Stuhlproben
  - Frische oder gefrorene Extrakte 1:5 verdünnt in 0,1 % BSA in TBS-PC + 0,05 % Tween, 1 h bei RT

- Fänger-AK:
  - Syn211-AK 7,5 µg/mL in PBS, 4 °C ü.N.
- Blockieren:
  - 0,5 % MP in TBS-PC, 3 h bei RT

- Detektions-AK:
  - Syn211-CF633 + Syn211-CF405S jeweils 0,625 µg/mL in 0,1 % BSA in TBS-T, 1 h bei RT

---

Ab hier Wechsel zum IN Cell Analyzer 6500HS Mikroskop

---

**Exp. 11:  
Verdünnungen der  
Stuhlproben**

- EliA Extraktionspuffer mit PI, 9 Stuhlproben
  - 1:5, 1:2,5 verdünnt in 0,1 % BSA in TBS-PC + 0,05 % Tween20 oder unverdünnt, 1 h bei RT

- Fänger-AK:
  - Syn211-AK 7,5 µg/mL in PBS, 4 °C ü.N.
- Blockieren:
  - 0,5 % MP in TBS-PC, 3 h bei RT

- Detektions-AK:
  - Syn211-CF633 + Syn211-CF405S jeweils 0,625 µg/mL in 0,1 % BSA in TBS-T, 1 h bei RT

**Exp. 12: Titration der  
Detektions-AK**

- synthetische  $\alpha$ -Syn-Aggregate
  - 0 pM bis 8000 pM in 0,1 % BSA in TBS-PC + 0,05 % Tween, 1 h bei RT

**Exp. 13:  
Wiederfindungsrate  
von Aggregaten in  
Stuhlproben**

- EliA Extraktionspuffer mit PI, 1 Stuhlprobe
  - 1:50, 1:25, 1:12,5, 1:6,25 verdünnt in EliA Extraktionspuffer mit PI oder unverdünnt
- synthetische  $\alpha$ -Syn-Aggregate
  - 0 pM bis 8000 pM in Stuhlverdünnungen verdünnt, 1 h bei RT

- Fänger-AK:
  - Syn211-AK 7,5  $\mu$ g/mL in PBS, 4 °C ü.N.
- Blockieren:
  - 0,5 % MP in TBS-PC, 3 h bei RT

- Fänger-AK:
  - Syn211-AK 7,5  $\mu$ g/mL in PBS, 4 °C ü.N.
- Blockieren:
  - 0,5 % MP in TBS-PC, 3 h bei RT

- Detektions-AK:
  - Syn211-CF633 + Syn211-CF405S oder
  - Syn211-CF633 + Syn211-CF488A jeweils versch. Konzentrationen in 0,1 % BSA in TBS-T, 1 h bei RT
- Detektions-AK:
  - Syn211-CF633 + Syn211-CF488A jeweils 0,625  $\mu$ g/mL in 0,1 % BSA in TBS-T, 1 h bei RT

**Exp. 14: PTA-Fällung  
von Stuhlproben**

- EliA Extraktionspuffer mit PI, 9 Stuhlproben
  - 1:2,8 verdünnt in 0,1 % BSA in TBS-PC + 0,05 % Tween20 oder
  - unverdünnt ± PTA-Fällung, 1 h bei RT

**Exp. 15: Fänger- und  
Detektions-AK-  
Varianten**

- EliA Extraktionspuffer mit PI, 6 Stuhlproben
  - unverdünnt, 1 h bei RT

- Fänger-AK:
  - Syn211-AK 7,5 µg/mL in PBS, 4 °C ü.N.

- Blockieren:
  - 0,5 % MP in TBS-PC, 3 h bei RT

- Fänger-AK:
  - Syn211-AK,
  - 4B12-AK oder
  - Syn1-AK jeweils 7,5 µg/mL in PBS, 4 °C ü.N.

- Blockieren:
  - 0,5 % MP in TBS-PC, 3 h bei RT

- Detektions-AK:
  - Syn211-CF633 + Syn211-CF488A jeweils 0,625 µg/mL in 0,1 % BSA in TBS-T, 1 h bei RT

- Detektions-AK:
  - Syn211-CF633 + Syn211-CF488A,
  - 4B12-CF633 + 4B12-CF488A,
  - Syn211-CF633 + 4B12-CF488A oder
  - 4B12-CF633 + Syn211-CF488A jeweils 0,625 µg/mL in 0,1 % BSA in TBS-T, 1 h bei RT

**Exp. 16: Vergleich des  
4B12- und Syn211-AK  
als Detektions-AK**

- synthetische  $\alpha$ -Syn-Aggregate
    - 0 pM bis 8000 pM in  
0,1 % BSA in TBS-PC  
+ 0,05 % Tween, 1 h  
bei RT
  - Fänger-AK:
    - Syn211-AK 7,5  $\mu$ g/mL  
in PBS, 4 °C ü.N.
  - Blockieren:
    - 0,5 % MP in TBS-PC,  
3 h bei RT
  - Detektions-AK:
    - Syn211-CF633 +  
Syn211-CF488A oder
    - 4B12-CF633 +  
4B12-CF488A jeweils  
0,625  $\mu$ g/mL in TBS-T +  
0,1 % BSA, 1 h bei RT
-

### 2.5.2.1 Exp. 1: Titration des Fänger-AK und Test einer neuen Detektions-AK-Kombination

Zuerst wurde die Fänger-AK-Konzentration titriert und gleichzeitig eine neue Detektions-AK-Kombination eruiert. Der Syn211-AK wurde zuvor als Fänger-AK für die Messung von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in z. B. Liquor im sFIDA-Assay mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  eingesetzt. Es wurden die Konzentrationen von 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  verdünnt in 1x PBS getestet. Die Konzentration 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  wurde zusätzlich als CC mitgeführt, um eine unspezifische Bindung der Probe an die Oberfläche oder das blockierende Reagenz auszuschließen. Zur Blockierung wurde 1 % BSA in TBS-PC verwendet, wobei die Inkubation bei RT für 1,5 h durchgeführt wurde. Gleichzeitig wurde für die aktuelle Fänger-Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  die Detektions-AK-Kombination aus Syn211-CF633 und Syn211-CF488 mit der Detektions-AK-Kombination aus Syn211-CF633 und 4D6-ATTO488 als Referenz, jeweils mit einer Konzentration von 0,625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 1x TBS verglichen. Dazu wurden Stuhlproben von jeweils drei Kontrollen und PD-Patienten mit EliA Calprotectin 2 Extraction Buffer (nachfolgend als EliA-Extraktionspuffer bezeichnet; einem Tris-Puffer mit BSA, 0,05 % Natriumazid, Kalziumchlorid und Farbstoff (pH = 8,8–9,2)) versetzt mit 1 % BSA homogenisiert. Diese wurden danach 1:50 in 1 % BSA in TBS-PC verdünnt. Der restliche Assayablauf erfolgte analog wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben.

### 2.5.2.2 Exp. 2: Test einer neuen Detektions-AK-Kombination mit dem EP1536Y-AK gegen phosphoryliertes Serin 129

Anschließend wurde getestet, ob die Detektion von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten durch den EP1536Y-AK gegen phosphoryliertes Serin 129 in  $\alpha$ -Syn als Detektions-AK zu einer weiteren Erhöhung des PKV führt. Als Fänger-AK-Konzentration wurde 7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , verdünnt in 1x PBS verwendet und blockiert wurde mit 0,5 % BSA in TBS-PC für 1,5 h bei RT. Die Detektions-AK Syn211-CF633 mit Syn211-CF488A oder EP1536Y-CF633 mit EP1536Y-CF488A wurden jeweils mit einer Konzentration von 0,625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 1x TBS verdünnt eingesetzt. Es wurden Stuhlproben von fünf Kontrollen und zehn PD-Patienten getestet, jeweils extrahiert mit 1 % BSA in TBS-PC und 1:50 verdünnt im EliA Sample Diluent (nachfolgend als EliA-Diluent bezeichnet; einem PBS-Puffer mit BSA, Tween, 0,095 % Natriumazid und Farbstoff (pH-Wert = 7,0–7,2)). Da in einem Vorversuch eine Signalsteigerung durch den Einsatz von 1 % BSA in TBS-PC als Extraktionspuffer im Vergleich zum zuvor verwendeten EliA-Extraktionspuffer mit 1 % BSA erreicht werden konnte, wurde dieser im Folgenden verwendet (Daten nicht gezeigt).

### 2.5.2.3 Exp. 3: Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Extraktion sowie Vergleich der Inkubationstemperatur und -zeit der Proben

Für eine erste Validierung des Assays wurden fünf Homogenate (R1 bis R5) einer PD-Patientenstuhlprobe hergestellt, um die Reproduzierbarkeit der Extraktion zu testen. Hierbei wurde zudem

der Effekt von Proteaseinhibitoren im Extraktionspuffer analysiert. Die BC diente dazu auszuschließen, dass erhöhte Pixel-Werte auf unspezifische Reaktionen durch die Inkubationsbedingungen zurückzuführen waren.

Als zweiter Teil wurde der Einfluss der Inkubationszeit und Temperatur auf die Stuhlprobenbindung an den AK und somit auf die Höhe des gemessenen Signals getestet, da bei einer verlängerten Inkubationszeit mehr Analyten an die AK binden können und eine erhöhte Temperatur zu einer beschleunigten Bindung führt. Allerdings bestand sowohl bei einer Verlängerung der Inkubationszeit als auch einer höheren Inkubationstemperatur die Möglichkeit, dass mehr unspezifische Bindungen auftreten, weshalb auch die Varianz verglichen wurde. Es wurde eine Inkubation der Proben bei 4 °C ü. N. oder bei 37 °C für eine Stunde mit der bisherigen Inkubation bei RT für 1 h durchgeführt und die gemessenen Signale verglichen. Zusätzlich zu der Probekubation bei 37 °C wurde auch der Detektions-AK bei 37 °C inkubiert, um ebenfalls zu testen, ob dies zu einer verbesserten Bindung und so zu einer Signalsteigerung führte. Für die anderen beiden Varianten bei 4 °C und bei RT wurde die Inkubation jeweils eine Stunde bei RT durchgeführt. Um dies zu testen, wurden die oben genannten Replikate einer Stuhlprobe verwendet und als Detektions-AK wurde der neu getestete EP1536Y-AK verwendet.

### **2.5.2.4 Exp. 4: Test des EP1536Y-AK als Fänger-AK**

Da der EP1536Y-AK bereits zu einem erhöhten PKV und somit einer gesteigerten Detektion von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten als Detektions-AK führte (s. Kapitel 3.1.2), wurde der EP1536Y-AK auch als Fänger-AK im Vergleich zum Syn211-Fänger-AK jeweils mit einer Konzentration von 7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  getestet. Hierfür wurden erneut Stuhlproben von fünf Kontrollen und zehn PD-Patienten verwendet, die nach den neuen Bedingungen mit 1 % BSA in TBS-PC mit PI (Kapitel 3.1.3) homogenisiert und wie zuvor 1:50 verdünnt wurden. Die Inkubation der Proben und des Detektions-AK erfolgte bei 37 °C für 1 h. Als BC wurde der Verdünnungspuffer verwendet.

### **2.5.3 Assayentwicklung zur Verringerung der Autofluoreszenz**

Im Zuge der Assayvalidierung wurden bei einem Versuch Proben ohne Detektions-AK gemessen, wobei kein Signal erwartet wurde. Allerdings zeigten alle gemessenen Stuhlproben im Gegensatz zur BC oder den Standards ein Signal in beiden Kanälen, was im Folgenden als Autofluoreszenz (AF) bezeichnet wird. Die AF (ohne Detektions-AK) war fast genauso hoch wie das Signal (mit Detektions-AK) oder teilweise sogar höher (Daten nicht gezeigt). Dies war problematisch, da so nicht sichergestellt werden konnte, ob das gemessene Signal tatsächlich auf  $\alpha$ -Syn-Aggregate oder auf autofluoreszierende Moleküle zurückzuführen war, die unspezifisch an den Fänger-AK, das blockierende Reagenz oder an die Oberfläche gebunden waren. Aus diesem Grund wurde die weitere Assayvalidierung unter Berücksichtigung der AF durchgeführt mit dem Ziel, die AF so

weit wie möglich zu reduzieren.

### **2.5.3.1 Exp. 5: Anpassung des Stuhlproben-Verdünnungspuffers**

Im nächsten Versuch wurde, um die AF zu verringern, getestet, ob die AF durch den Verdünnungspuffer der Stuhlproben entstand oder verstärkt wurde. Da die AF in Kanal 2 (CF488A) stärker war als in Kanal 1 (CF633), wurde zusätzlich das Fluorophor des zweiten Detektions-AK von CF488A auf CF405S gewechselt (die eingesetzten Konzentrationen der Detektions-AK wurden beibehalten), um festzustellen, ob in diesem Kanal auch AF auftritt. Die Stuhlproben wurden wie zuvor beschrieben homogenisiert und 1:50 mit dem EliA-Diluenten und als Vergleich mit 1 % BSA in TBS-PC verdünnt. Dazu wurden jeweils drei Kontrollen und PD-Patienten mit und ohne Detektions-AK gemessen. Da die Temperatur ebenfalls einen Einfluss auf die AF haben kann (s. Kapitel 1.3.2.1), da eine erhöhte Temperatur zum einen die unspezifische Bindung der autofluoreszierenden Substanzen fördern konnte oder zum anderen zur Entstehung von AF durch eventuelles Bakterienwachstum beitrug, wurden die Proben außerdem bei RT statt wie zuvor bei 37 °C inkubiert.

### **2.5.3.2 Exp. 6: Auswahl des blockierenden Reagenzes und Vergleich von Stuhlprobenverdünnungen**

Da autofluoreszierende Komponenten unspezifisch an die blockierte Assay-Oberfläche oder das blockierende Reagenz selber binden könnten, wurde im ersten Teil des Experiments verschiedene blockierende Reagenzien zur weiteren Vermeidung der AF getestet. Dazu wurden 0,5 % und 1 % MP in TBS-PC verwendet. Die kommerziellen Blockierungspuffer The Blocking Solution (BS) und SmartBlock (SB) wurden zusätzlich getestet. Als Referenz diente 1 % BSA in TBS-PC, wobei die Inkubationszeit jeweils 1,5 h bei RT betrug.

BS besteht aus reinsten Casein-Fragmenten, die unterschiedliche Größen besitzen, wodurch freie Flächen gleichmäßiger abgedeckt werden können. SB basiert auf chemisch modifizierten Peptidfragmenten und besitzt wie BS als kommerziell erhältlicher Puffer zudem den Vorteil einer hohen gleichbleibenden Qualität von verschiedenen Chargen. Allerdings sind diese Puffer erheblich teurer als BSA oder MP.

In vorhergehenden Versuchen war zum einen die Detektion der Standards (SiNaPs, Aggregate) mit dem EP1536Y-AK als Detektions-AK nicht möglich, diese aber zur weiteren Assayvalidierung und als Kalibrierstandards benötigt wurden und zum anderen der Zusatz von BSA und Tween20 im Detektions-AK-Puffer sich als vorteilhaft erwiesen hatte. Durch den Zusatz des Detergens konnte eine Signalsteigerung erzielt werden und zusätzlich ein höheres SRV (Daten nicht gezeigt), weshalb in den folgenden Experimenten dieser Detektions-AK-Puffer verwendet wurde. In einem weiteren vorhergehenden Versuch wurde auch der Stuhlproben-Verdünnungspuffer von

**Tabelle 2.9 – Getestete Blockierungspuffer mit der jeweiligen Pufferkonzentration und pH-Wert**

Puffer	Konzentration	pH-Wert
PBS-PC	1x	7,4
TBS-PC	1x	7,4
NaHCO <sub>3</sub> -PC	0,1 M	8,4

1 % BSA in TBS-PC zu einem geändert, der weniger BSA und zusätzlich Tween20 enthielt (0,1 % BSA in TBS-PC und 0,05 % Tween), was zusätzlich die AF verringerte und das Signal steigerte (Daten nicht gezeigt).

Somit wurde für dieses Experiment die Detektion wieder mit Syn211-CF633 und Syn211-CF405S mit einer Konzentration von 0,625 µg/mL verdünnt in 0,1 % BSA in TBS-T durchgeführt. Für die Stuhlproben wurden im zweiten Teil des Experiments deutlich höhere Verdünnungen von 1:400, 1:600 und 1:800 in TBS-PC mit 0,1 % BSA und 0,05 % Tween20 für jeweils drei Kontrollen und PD-Patienten getestet, da so die endogenen Bestandteile der Stuhlprobe, die die AF verursachen, gegebenenfalls so sehr verdünnt wurden, dass sie keinen Einfluss auf das Signal mehr hatten.

### **2.5.3.3 Exp. 7: Anpassung der Inkubationszeit des Blockierens und des Blockierungspuffers**

Nachdem MP aufgrund der Verringerung der AF als blockierendes Reagenz ausgewählt wurde (Kapitel 3.2.2), wurde getestet, ob durch eine Verlängerung der Inkubationszeit und eine Anpassung des Puffers, in dem das MP gelöst wurde, das Blockieren weiter verbessert und auch das Hintergrundsignal verringert werden konnte. MP wurde entweder in TBS-PC, PBS-PC oder NaHCO<sub>3</sub>-PC (s. Tabelle 2.9) mit einer Konzentration von 0,5 % gelöst und bei 4 °C ü. N. oder bei RT für 3 h inkubiert. Aufgrund der Inkubationszeit ü. N. bei der ersten Versuchsbedingung wurde der Fänger-AK für 6 h bei RT inkubiert. Für das Blockieren bei RT für 3 h wurde wie zuvor der Fänger-AK bei 4 °C ü. N. inkubiert. Auch hier wurde der Einfluss der AF für drei Stuhlproben mit getestet. Dazu wurden jeweils Stuhlproben dreier Kontrollen und dreier PD-Patienten 1:600 verdünnt verwendet und zur Überprüfung des Hintergrundsignals eine BC mitgeführt.

### **2.5.3.4 Exp. 8: Vergleich verschiedener Fänger-AK**

Zur weiteren Reduzierung der AF und Steigerung des Signals für die Patientenstuhlproben wurden erneut verschiedene Fänger-AK mit jeweils zwei Kontroll- und PD-Patientenstuhlproben getestet. Die AK besitzen verschiedene Bindestellen, sodass auch mögliche trunkierte Varianten detektiert werden konnten. Dazu wurden je 7,5 µg/mL des Syn211-, EP1536Y-, 4B12-, 5G4- und 4D6-AK (s. Tabelle 2.10) als Fänger-AK getestet. Als Detektions-AK wurde weiterhin die Kombi-



**Tabelle 2.10 – Getestete Fänger-AK gegen  $\alpha$ -Syn mit dem jeweilige Epitop**

Antikörper	Epitop
Syn211-AK	AS 121–125 ( $\alpha$ -Syn)
EP1536Y-AK (phospho S129)	Phosphoryliertes Serin 129 in $\alpha$ -Syn
4B12-AK	AS 103–108
5G4-AK	Aggregiertes $\alpha$ -Syn
4D6-AK	AS 124–134 ( $\alpha$ -Syn)

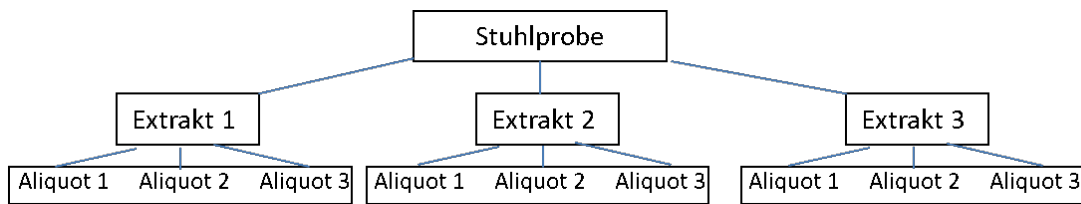
nation von Syn211-CF633 und Syn211-CF405S verwendet. Dazu wurden 1:600 verdünnte Stuhlproben von jeweils zwei Kontrollen und PD-Patienten sowie eine BC verwendet.

### 2.5.3.5 Exp. 9: Vergleich des Stuhl-Extraktionspuffers

Die Homogenisierung der Stuhlproben erfolgte bisher in 1 % BSA in TBS-PC (pH 7,4). Der zu Anfang verwendete EliA-Extraktionspuffer wurde mit jeweils drei Stuhlproben von Kontrollen und PD-Patienten erneut getestet, diesmal unter Berücksichtigung der AF. Um eine Beeinflussung der  $\alpha$ -Syn-Aggregatbindung an den Fänger-AK aufgrund von pH-Wert-Unterschieden auszuschließen, wurde der pH-Wert für den EliA-Extraktionspuffer und 1 % BSA in TBS-PC mittels pH-Teststreifen bestimmt. Durch die bereits vorgenommenen Änderungen der Assaybedingungen war die AF auch für niedrigere Verdünnungen deutlich geringer als mit Detektions-AK, was zu Beginn nicht der Fall war. Die Signale waren aber im Gegensatz zu den hohen Verdünnungen deutlich höher und Unterschiede zwischen den Versuchsbedingungen dadurch erkennbar. Aus diesem Grund wurde im Folgenden mit einer 1:5 Verdünnung weitergearbeitet.

### 2.5.3.6 Exp. 10: Vergleich von frischen und gefrorenen Replikaten und Reproduzierbarkeit der Stuhlextraktion

Im Zuge der Assayvalidierung wurden entweder frische oder vorher bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorene Stuhlextrakte verwendet. Zusätzlich wurde mit EliA-Extraktionspuffer und den aktualisierten Assaybedingungen durchgeführt und zur Validierung die Reproduzierbarkeit des Assays erneut getestet. Dazu wurden von jeweils einer hohen, mittleren und niedrigen Kontrollstuhlprobe, jeweils drei Extrakte hergestellt und diese anschließend in mehrere Aliquots aufgeteilt. Jeweils drei frische Aliquots jedes Extraktes wurden für den ersten Versuch verwendet (Abbildung 2.1) und die restlichen Aliquots für den zweiten Versuch eine Woche bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Kurz vor der Verwendung wurden die frischen Stuhlproben 1:5 verdünnt. Die gefrorenen Stuhlproben wurden zunächst für ca. 5 min bei RT aufgetaut und ebenfalls 1:5 verdünnt. Zusätzlich wurde auch hier die AF mit erfasst.



**Abbildung 2.1 – Schema der Probenvorbereitung für die Messung der Reproduzierbarkeit der Stuhlextraktion mit frischen oder gefrorenen Proben.**

### 2.5.4 Assayvalidierung am IN Cell Analyzer 6500HS-Mikroskop

Die bisherigen Versuche wurden entweder am Celldiscoverer 7 (CD7), hauptsächlich aber am TIRFM gemessen. Dadurch, dass ein neues Mikroskop erworben wurde, wurden alle weiteren Assaybedingungen für den IN Cell Analyzer 6500HS angepasst und die weitere Assayvalidierung an diesem Gerät durchgeführt.

#### 2.5.4.1 Exp. 11: Vergleich von Stuhl-Verdünnungen

Die Probenverdünnung wurde zur Erhöhung des PKV getestet, indem 1:5, 1:2,5 verdünnte und unverdünnte Stuhlextrakte von vier Kontrollen und fünf PD-Patienten gemessen wurden und für alle Verdünnungen zusätzlich die AF gemessen wurde. Die Proben wurden in TBS-PC mit 0,1 % BSA und 0,05 % Tween20 verdünnt.

#### 2.5.4.2 Exp. 12: Titration der Detektions-AK-Konzentration und Vergleich von Fluorophor-Kombinationen

Als Nächstes wurde eine Titration der Detektions-AK durchgeführt, um deren Arbeitskonzentration mit dem höchsten SRV zu ermitteln. Aufgrund des auffälligen Hintergrundsignals für manche Stuhlproben in Kanal 1 (CF405S) (s. Kapitel 3.3.1) wurde der Syn211-Detektions-AK entweder mit dem CF405S- oder mit dem CF488A-Fluorophor in Kombination mit dem CF633-Fluorophor getestet (s. Tabelle 2.11). Dazu wurden synthetische  $\alpha$ -Syn-Aggregate mit Konzentrationen von 0 pM, 8 pM, 80 pM, 800 pM und 8000 pM verwendet und im Verdünnungspuffer der Stuhlproben mit 0,1 % BSA in TBS-PC und 0,05 % Tween20 verdünnt.

#### 2.5.4.3 Exp. 13: Analytische Validierung: Wiederfindungsrate von $\alpha$ -Syn-Aggregaten in verschiedenen Stuhlverdünnungen

Um die Wiederfindungsrate der Aggregate in Stuhl und somit den Einfluss der Stuhlmatrix auf die Detektion der  $\alpha$ -Syn-Aggregate zu untersuchen, wurden verschiedene  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen von 0 pM, 8 pM, 80 pM, 800 pM und 8000 pM in 1:50, 1:25, 1:12,5, 1:6,25 verdünnter oder unverdünnter Kontrollstuhlprobe angesetzt (*Spiken*). Die Stuhlprobe wurde in EliA-

**Tabelle 2.11 – Übersicht über die getesteten Konzentrationen des Syn211-Detektions-AK für die Fluorophor-Kombinationen CF633/CF405S oder CF633/CF488A**

Detektions-AK	Syn211-CF633	Syn211-CF405S	Syn211-CF488A
Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0,625	0,625	-
	0,625	0,313	-
	0,625	1,25	-
	0,625	-	0,625
	0,625	-	0,313
	0,625	-	1,25

Extraktionspuffer mit PI extrahiert und verdünnt, da der in Exp. 11 (s. Kapitel 3.3.1) beobachtete auffällige Hintergrund auf den alten Verdünnungspuffer zurückzuführen war (Daten nicht gezeigt).

#### 2.5.4.4 Exp. 14: PTA-Fällung von Stuhlproben

Um die Wiederfindungsrate möglicherweise zu verbessern bzw. die Aggregate aufzureinigen und so störende Matrixeffekte zu beseitigen, wurde im folgenden Versuch getestet,  $\alpha$ -Syn-Aggregate mittels PTA-Fällung aufzureinigen. Für die PTA-Fällung wurden fünf Kontrollstuhlproben und sechs iRBD-Patientenstuhlproben zusammen mit dem Mastermix mit 2% PTA (pH = 7,2) und Sarkosyl sowie 1x PI inkubiert. Anschließend wurden die Proben pelletiert und der Überstand verworfen und das jeweilige Pellet in EliA-Extraktionspuffer mit PI gelöst (s. Kapitel 2.4.2). Es wurden unverdünnte und 1:2,8 verdünnte Stuhlproben von fünf Kontrollen und sechs iRBD-Patienten für die PTA-Fällung verwendet. Da die unverdünnten und die 1:2,8 verdünnten Stuhlproben jeweils in einem Volumen gefällt wurden, sodass die finale Konzentration an Stuhlprobe identisch war, wurde getestet, ob die Verdünnung zu einer gesteigerten Effizienz der PTA-Fällung führte. Zusätzlich wurde die AF der Proben gemessen, da diese durch die PTA-Fällung ebenfalls abnehmen könnte, indem die  $\alpha$ -Syn-Aggregate selektiv gefällt und von autofluoreszierenden Komponenten getrennt wurden. Als BC wurde der Verdünnungspuffer mitgeführt. Für die Versuchsbedingung mit PTA-gefällten Stuhlproben wurde die BC wie die Stuhlproben behandelt, um ausschließen zu können, dass die Bestandteile der PTA-Fällung selbst autofluoreszieren oder zu unspezifischen Signalen führten.

#### 2.5.4.5 Exp. 15: Vergleich verschiedener Fänger- und Detektions-AK

Um den Assay und die Unterscheidung zwischen Kontroll- und Patientenstuhlproben weiter zu verbessern, wurden erneut verschiedene Fänger- und Detektions-AK getestet. Als Fänger-AK wurden der Syn211-, 4B12- und Syn1-AK mit einer Konzentration von 7,5  $\mu\text{g/ml}$  getestet. Es wurden verschiedene Kombinationen der Syn211- und 4B12-AK als Detektions-AK entweder mit dem Syn211-AK oder 4B12-AK als Fänger-AK mit einer Konzentration von jeweils 0,625  $\mu\text{g/ml}$  getestet (s. Tabelle 2.12). Es wurden unverdünnte Stuhlproben jeweils dreier Kontrollen und

iRBD-Patienten verwendet.

**Tabelle 2.12 – Kombination der Fänger- und Detektions-AK-Varianten**

Fänger-AK	Syn211-AK	4B12-AK	Syn1-AK
Detektions-AK-Varianten	Syn211-CF633 +	Syn211-CF633 +	Syn211-CF633 +
	Syn211-CF488A	Syn211-CF488A	Syn211-CF488A
	4B12-CF633 +	4B12-CF633 +	—
	4B12-CF488A	4B12-CF488A	—
	Syn211-CF633 +	Syn211-CF633 +	—
	4B12-CF488A	4B12-CF488A	—
	4B12-CF633 +	4B12-CF633 +	—
	Syn211-CF488A	Syn211-CF488A	—

#### 2.5.4.6 Exp. 16: Vergleich des 4B21- und Syn211-AK als Detektions-AK

Im letzten Experiment zur Assayentwicklung wurde der Syn211-AK als Fänger-AK und der 4B12-AK mit dem Syn211-AK als Detektions-AK verglichen (abschließende Validierung s. Kapitel 2.5.5). Dazu wurden synthetische  $\alpha$ -Syn-Aggregate mit einer 1:5 Verdünnungsreihe von 1,6 pM bis 5000 pM und  $\alpha$ -Syn-Monomere von 8 pM bis 5000 pM verwendet. Bei diesem Versuch fiel auf, dass mit dem 4B12-AK zum einen  $\alpha$ -Syn-Aggregate nicht so sensitiv detektiert wurden und zum anderen  $\alpha$ -Syn-Monomere eher detektiert wurden als mit dem Syn211-AK als Detektions-AK (s. Kapitel 3.3.6).

Aus diesem Grund wurden folgende Assaybedingungen als finale Bedingungen gewählt:

1. Stuhlhomogenisierung
  - 1300  $\mu$ L EliA-Extraktionspuffer mit 1x PI
  - Homogenisierung am Vortag und Einfrieren der Stuhlproben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung
2. Fänger-AK-Inkubation (nicht-kovalent)
  - Fänger-AK: Syn211-AK in 1x PBS (pH 7,4) mit einer Konzentration von 7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$
  - pro Kavität 40  $\mu$ L Fänger-AK Lösung, Inkubation: ü. N. bei  $4^{\circ}\text{C}$
  - Waschroboter: 5x 80  $\mu$ L 1x TBS-T, 5x 80  $\mu$ L TBS
3. Blockierung
  - pro Kavität 80  $\mu$ L 0,5% MP in TBS-PC (pH 7,4), Inkubation: 3 h bei RT
  - Waschroboter: 5x 80  $\mu$ L 1x TBS-T, 5x 80  $\mu$ L TBS

## 4. Probeninkubation

- Unverdünnte Stuhlproben, Auftauen: 5 min bei RT
- Verdünnungsreihe  $\alpha$ -Syn-SiNaPs/-Aggregate in Extraktionspuffer
- pro Kavität 20  $\mu$ L Probe (4x Bestimmung), Inkubation: 1 h bei RT
- Waschroboter: 5x 80  $\mu$ L TBS

## 5. Detektions-AK-Inkubation

- Detektions-AK in 0,1 % BSA in TBS-T (pH 7,4) angesetzt: Syn211-CF633 und Syn211-CF488A, jeweils  $c = 0,625 \mu\text{g/mL}$
- Ultrazentrifugation: 1 h bei 4 °C und 100.000 x g, Überstand abnehmen
- pro Kavität 20  $\mu$ L Detektions-AK, Inkubation: 1 h bei RT
- Waschroboter: 5x 80  $\mu$ L TBS
- Zu Messpuffer wechseln: pro Kavität 80  $\mu$ L TBS-PC
- mit Folie abkleben

## 2.5.5 Abschließende Assayvalidierung

Nachdem die finalen Assaybedingungen ermittelt wurden, wurde der Assay technisch validiert. Um die Selektivität und Präzision des Assays zu bestimmen, wurden sowohl  $\alpha$ -Syn- als auch  $A\beta$ -SiNaPs, synthetische  $\alpha$ -Syn- und  $A\beta$ -Aggregate sowie  $\alpha$ -Syn-Monomere verwendet. Zusätzlich wurden AK gegen  $A\beta$  eingesetzt, um die Spezifität des sFIDA-Assays für  $\alpha$ -Syn-Aggregate nachzuweisen. Für alle Varianten wurden sowohl BC, CC als auch DC mitgeführt. Folgende Versuchsbedingungen wurden getestet (s. Tabelle 2.13):

Tabelle 2.13 – Kombination der Fänger- und Detektions-AK Varianten

Versuchsbedingung	Fänger-AK	Detektions-AK	Proben
<u>Positivkontrolle:</u> $\alpha$ -Syn-Assaybedingungen	Syn211-AK	Syn211-CF633 + Syn211-CF488A	$\alpha$ -Syn-SiNaPs und -Aggregate
<u>Negativkontrolle:</u> Selektivität für Aggregate	Syn211-AK	Syn211-CF633 + Syn211-CF488A	$\alpha$ -Syn-Monomere
<u>Negativkontrolle:</u> Unspezifische Bindungen	NAB228-AK	Syn211-CF633 + Syn211-CF488A	$\alpha$ -Syn-SiNaPs und -Aggregate
<u>Negativkontrolle:</u> Selektivität der AK	Syn211-AK	Syn211-CF633 + Syn211-CF488A	$A\beta$ -SiNaPs und -Aggregate
<u>Positivkontrolle:</u> $A\beta$ -Assaybedingungen	NAB228-AK	IC16-CF633 + 6E10-AF488	$A\beta$ -SiNaPs und -Aggregate

Für den Syn211-AK als Fänger-AK und Detektions-AK wurden die finalen Konzentrationen (s. oben) eingesetzt und das gemessene Signal von 1000 pM  $\alpha$ -Syn-Aggregate als Positivkontrolle

mit 1000 pM  $\alpha$ -Syn-Monomeren als Negativkontrolle verglichen. Zur Überprüfung der unspezifischen Bindung wurde zudem der NAB228-AK gegen A $\beta$  und der Syn211-AK als Fänger-AK eingesetzt und das gemessene Signal von 1000 pM  $\alpha$ -Syn-Aggregaten und 12,5 pM  $\alpha$ -Syn-SiNaPs verglichen. Zusätzlich wurden 5000 pM  $\alpha$ -Syn-Aggregate und 3,2 pM  $\alpha$ -Syn-SiNaPs für die CC und DC verwendet. Um die Selektivität des Syn211-AK zu testen, wurden als Negativkontrolle 500 pM A $\beta$ -Aggregate und 20 pM A $\beta$ -SiNaPs verwendet. Als Positivkontrolle wurden dieselben Konzentrationen an A $\beta$ -Aggregaten und A $\beta$ -SiNaPs mit dem NAB228-AK als Fänger-AK mit einer Konzentration von 2,5  $\mu$ g/mL in 1x PBS und als Detektions-AK IC16-CF633 und 6E10-AF488 jeweils mit einer Konzentration von 0,625  $\mu$ g/mL, was den in A $\beta$ -Assays verwendeten Konzentrationen entsprach, eingesetzt.

### 2.5.5.1 *Inter-Assay Messungen*

Zusätzlich wurde die *Inter-Assay*-Präzision zwischen unabhängigen sFIDA-Messungen bestimmt. Dazu wurden 50 zufällig ausgewählte Stuhlproben wiederholt an zwei verschiedenen Tagen unter den gleichen Bedingungen gemessen. Bei der zweiten Messung waren die Stuhlproben lediglich einem zusätzlichen Einfrier- und Auftauzyklus ausgesetzt. Auch wurde der  $\alpha$ -Syn-SiNaP-Standard, der für die Kalibrierung aller Stuhlproben verwendet wurde, in neun unabhängigen Assays ebenfalls unter den gleichen Bedingungen an verschiedenen Tagen gemessen.

### 2.5.5.2 *Immundepletion*

Um auch zu bestätigen, dass tatsächlich  $\alpha$ -Syn-Aggregate in den Stuhlproben vorhanden waren, sprich, das gemessene Signal auf  $\alpha$ -Syn-Aggregate zurück zu führen war, wurde eine spezifische Depletion von  $\alpha$ -Syn mittels Syn211-AK-konjugierter magnetischer Kügelchen (Dynabeads) durchgeführt.

Hierzu wurde der Syn211-AK über die Fc-Region an mit Protein G beschichtete Dynabeads nach dem Herstellerprotokoll konjugiert. Vor der Konjugation der Dynabeads mit AK wurden diese zweimal mit PBS-T (1x PBS und 0,05 % Tween20) gewaschen und zwischen den Waschschritten für 5 min in einem Magnetrack pelletiert, um den Überstand zu entfernen. Anschließend wurden die Dynabeads mit 0,1 mg/mL Syn211-AK in PBS-T unter Schütteln bei 650 rpm für 100 min bei RT inkubiert, um eine Zielbeladung von 8  $\mu$ g/mL Dynabeads zu erreichen. Nach zwei weiteren Waschschritten (siehe oben) wurden die beschichteten Dynabeads auf eine Konzentration von 20  $\mu$ g/mL in PBS-T verdünnt. Um sicherzustellen, dass ein Signalverlust nicht von unspezifischer Bindung von Probenkomponenten an die Dynabeads resultiert, wurden auch Dynabeads ohne AK-Beschichtung mitgeführt. Für die Immundepletion wurden jeweils 0,5 mg AK-gekoppelter und für die Kontroll-Immundepletion nicht-gekoppelter Dynabeads für 5 min in dem Magnetrack pelletiert und der Überstand entfernt. Als Nächstes wurden jeweils 100  $\mu$ L Stuhlprobe mit Dynabeads unter Rotation für 1 h bei RT inkubiert, bevor die immundepletierten Proben im Magnetrack

pelletiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurde. Der Überstand aller Immundepletionen wurde wie in Kapitel 2.5.4.6 beschrieben im sFIDA-Assay analysiert.

## 2.6 Datenaufnahme und -analyse

### 2.6.1 Datenaufnahme

Während der Erstellung der vorliegenden Arbeit wurden die Mikroskopiebilder für die Analyse an drei verschiedenen Mikroskopen jeweils als Zweikanalaufnahmen mit den folgenden Spezifizierungen aufgenommen:

Bei Messungen am TIRFM wurde eine Hamamatsu-Kamera mit 16 Bit und einem inversen Öl-Immersionsobjektiv mit einer 100-fachen Vergrößerung verwendet. Es wurden 25 Bilder pro Kavität mit einer Größe von 1000 x 1000 Pixel (116 x 116  $\mu\text{m}$ ) pro Bild mit einem Abstand von 200  $\mu\text{m}$  aufgenommen. Der TIRF-Winkel betrug 90° mit einer Eindringtiefe von 200 nm in die Probe. Der Fokus musste manuell für jede Kavität bestimmt werden und wurde mithilfe der adaptiven Fokuskontrolle des TIRFM gehalten. Das Signal in Kanal 2 war hier immer deutlich geringer als für Kanal 1.

Bei Messungen am Celldiscoverer 7 (CD7) wurde zunächst mit der AxioCam 506-Kamera mit 14 Bit und später mit der PvCam Evolve 512 Delta Kamera mit 16 Bit und jeweils einem inversen Wasser-Immersionsobjektiv mit einer 50-fachen Vergrößerung verwendet. Mit der AxioCam-Kamera wurden 9 Bilder pro Kavität mit einer Größe von 2752 x 2208 Pixel (251 x 201,5  $\mu\text{m}$ ) pro Bild aufgenommen. Für die Aufnahmen mit der Evolve-Kamera wurden 16 Bilder pro Kavität mit einer Größe von 512 x 512 Pixel (164,4 x 164,4  $\mu\text{m}$ ) aufgenommen. Nachdem festgestellt wurde, dass aufgrund eines fehlerhaften UV-Filters die Signale aus dem Kanal 1 und Kanal 2 nicht richtig aufgetrennt werden konnten, wurden keine Messungen mehr am CD7 durchgeführt. Nach der Anschaffung des IN Cell Analyzer 6500HS-Mikroskops für konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie, wurde dieses für die Messung der Proben im sFIDA getestet. Die restlichen Versuche der vorliegenden Arbeit wurden daher stets an diesem Gerät durchgeführt. Für Messungen am IN Cell Analyzer 6500HS wurde eine sCMOS Kamera mit 16 Bit und einem inversen Wasser-Immersionsobjektiv mit einer 40-fachen Vergrößerung verwendet. Es wurden 16 Bilder pro Kavität mit einer Größe von 2040 x 2040 Pixel (330 x 330  $\mu\text{m}$ ) pro Bild mit einem Abstand von 175  $\mu\text{m}$  aufgenommen.

Die Fokusbestimmung erfolgte sowohl am CD7 als auch am IN Cell Analyzer 6500HS automatisch während eines progressiven Scans, was eine deutlich schnellere Messzeit im Vergleich zum TIRFM zur Folge hatte. Allerdings zählen der CD7 und der IN Cell Analyzer 6500HS zu den Konfokal-Fluoreszenzmikroskopen, bei denen eine höhere Eindringtiefe in die Probe als beim TIRFM erfolgte. Dadurch wurden mehr Partikel, die weiter von der Oberfläche entfernt waren,

Tabelle 2.14 – Anregungs- und Emissionswellenlänge der einzelnen Mikroskope

Mikroskop	Fluorophor	Anregungswellenlänge [nm]	Emissionswellenlänge [nm]
CD7	CF633	653	668
	CF488A	493	517
	CF633	635	772
TIRF2	CF488A	488	536
	CF405S	405	450
	CF633	642	683
IN Cell Analyzer 6500HS	CF488A	488	548
	CF405S	405	455

Tabelle 2.15 – Belichtungszeiten für die zwei Kanäle und eingestellter Gain für den CD7, das TIRFM und den IN Cell Analyzer 6500HS für die Experimente

Experiment	Mikroskop	Belichtungszeit [ms] Kanal 1/2	Helligkeit (Gain) Kanal 1/2
Exp. 1 + Exp. 5–Exp. 10	TIRF1/2	1000/1000	1300/1300
Exp. 2–Exp. 3	CD7 (AxioCam)	4000/3000	2/2
Exp. 4	CD7 (Evolve)	200/200	20/20
Exp. 11–ff.	IN Cell Analyzer 6500HS	3000/4000	N/A

N/A: nicht anwendbar

angeregt, was eine Erhöhung des Signals aber auch des Hintergrundrauschens bewirken kann. Jede Kavität der Mikrotiterplatte von Greiner besaß eine Fläche von  $10,9 \text{ mm}^2$ . Am CD7 wurde somit mit der AxioCam- sowie Evolve-Kamera eine Fläche von 4 %, am TIRFM eine Fläche von 3 % und am IN Cell Analyzer 6500HS eine Fläche von 16 % der Kavität abgedeckt. Die Kavitäten der Thermo-Fischer waren dagegen mit einer Fläche von  $13,7 \text{ mm}^2$  etwas größer.

Die Anregung der Fluorophore erfolgte, wie in Tabelle 2.14 aufgeführt. Die Laserintensität lag bei allen Mikroskopen bei 100 %. Die jeweiligen Belichtungszeiten sind in Tabelle 2.15 aufgelistet.

## 2.6.2 Datenanalyse

Die aufgenommenen Bilder wurden mit dem sFIDa-Softwaretool (Version 0.16.4) analysiert, um eine objektive und automatisierte Bilddatenanalyse zu gewährleisten [120]. Diese beinhaltete die automatische Detektion und den Ausschluss von Bildern, die Artefakte enthielten, eine Bestimmung des Grenzwertes basierend auf der BC, um den Einfluss des Hintergrundsignals zu minimieren und um Fluktuationen der absoluten Fluoreszenzintensitäten zu kompensieren sowie das Zählen von markierten Aggregaten anhand von Pixeln. Der Grenzwert entspricht dem Graustufenwert, der von einer festgelegten Prozentzahl, z. B. 0,001 %, aller Pixel überschritten wird. Durch die Wahl eines Grenzwertes werden nur die Pixel, welche Intensitäten größer



oder gleich diesem Graustufenwert aufweisen, für die Analyse berücksichtigt. Dabei bezieht sich der Pixel-Wert auf die Anzahl an Pixeln oberhalb des Grenzwertes für die Einzelkanäle. Der sFIDA-Messwert bezieht sich auf die Anzahl an kolokalisierten Pixel beider Einzelkanäle, die beide den Grenzwert überschreiten. Die Pixel-Werte und sFIDA-Messwerte werden aus dem Mittelwert aller 16 Bilder pro vier Kavitäten gebildet [120, 149]. Zusätzlich konnte optional ein Min-Max-Filter angewendet werden, was dazu führte, dass ein prozentualer Anteil z. B. 10 % der Bilder mit dem höchsten und niedrigsten Pixel-Wert und sFIDA-Messwert pro Kavität entfernt wurden. Zusätzlich wurde für die Messungen der  $\alpha$ -Syn-Aggregate in den Stuhlproben aller PD- und iRBD-Patienten sowie der HC eine Kalibrierung mit  $\alpha$ -Syn-SiNaPs verschiedener Konzentrationen durchgeführt, anhand derer für die sFIDA-Messwerte eine Konzentration berechnet wurde. Während der Assayvalidierung wurden verschiedene Grenzwerte verwendet, die eine bestmögliche Unterscheidung zwischen den verschiedenen Versuchsbedingungen erlaubten (Anhang, Tabelle 5.6). Die manuelle Grenzwertbestimmung erfolgte durch die Auswahl eines Graustufenwertes, bei dem die Unterschiede zwischen den Versuchsbedingungen am größten schienen und die Pixel-Werte zugleich noch möglichst hoch waren.

### 2.6.3 Statistik

#### 2.6.3.1 Generelle Statistik

Statistische Analysen wurden mit SigmaPlot 11.0, IBM SPSS Statistics 28.0.1.1 (15) oder Origin-Pro 2020 SR1 durchgeführt. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden basierend auf den Pixel-Werten bzw. den sFIDA-Messwerten von vier Replikaten berechnet. Die Variation der Messwerte für Messungen von mehreren gleichen Proben auf einer Platte (*Intra-Assay-Variation*) wurde durch den Variationskoeffizienten (CV%) beschrieben. Um die Variation der Messwerte von mehreren gleichen Proben auf verschiedenen Platten (*Inter-Assay Variation*) zu bestimmen, wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient berechnet. Paarweise Vergleiche von Messwerten wurden mittels *Two-Way*-ANOVA mit dem Holm-Sidak-Test verglichen.

Die Daten der Messungen der  $\alpha$ -Syn-Aggregate in den Stuhlproben aller PD- und iRBD-Patienten sowie der HC wurden zusätzlich auf ihre Normalverteilung mittels Shapiro Wilk, Lilliefors, Kolmogorov-Smirnov und Anderson Darling getestet. Um Unterschiede zwischen den drei Kohorten zu bestimmen, wurde ein Kruskal-Wallis-H-Test verwendet. Wenn signifikante Unterschiede festgestellt wurden, wurde ein paarweiser Vergleich durchgeführt, indem ein zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test durchgeführt wurde.

#### 2.6.3.2 Kalibrierung innerhalb der diagnostischen Validierung

Zur Berechnung der Kalibrationsgeraden wurden nur Konzentrationen der SiNaP-Standard-Verdünnungsreihe einbezogen, die sich signifikant von der BC unterschieden und über dem LOD lagen. Dazu wurde ein einseitiger Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Für die lineare Regression

Formel zur Berechnung des LOD:

$$\text{LOD [pixel]} = \text{sFIDA-Messwerte (Pufferkontrolle)} + 3\sigma \quad (2.3)$$

LOD: Nachweisgrenze (engl.: *limit of detection*);  $\sigma$ : Standardabweichung

wurde der sFIDA-Messwert mit  $1/\text{Readout}$  gewichtet. Nach der Berechnung des Kalibrierbereichs für jedes Experiment wurde ein universeller Kalibrierbereich für alle Experimente festgelegt. Die BC wurde als Negativkontrolle für die Kalibrierung und für die Berechnung des LOD verwendet. Der LOD wurde anhand der folgenden Gleichung definiert und anschließend unter Verwendung der Kalibrationsgeraden in eine femtomolare Konzentration umgewandelt (Formel 2.3):

### 2.6.3.3 ROC-Analyse

Für den erfassten Datensatz der finalen Stuhlprobenmessung wurde eine Grenzwertoptimierungskurven (ROC, engl.: *receiver-operator characteristic*)-Analyse durchgeführt. Die optimale Kombination von Sensitivität und Spezifität für eine ROC-Kurve wurde mit einem maximierten Youden-Index berechnet.

## 3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Assayentwicklung wurden als Diagramme dargestellt und zeigen stets von links nach rechts den mittleren Pixel-Wert von Kanal 1 (CF633), den mittleren Pixel-Wert von Kanal 2 (CF488A oder CF405S) und den mittleren sFIDA-Messwert, dem kolokalisierten Signal aus beiden Kanälen entsprechend, sofern nicht anders angegeben. Als Signal wurden sowohl Pixel-Werte der Einzelkanäle als auch sFIDA-Messwerte bezeichnet, die mit Detektions-AK detektiert wurden. Als Autofluoreszenz (AF) wurde Signal bezeichnet das ohne Detektions-AK detektiert wurde.

Für die abschließende Assayvalidierung und die finale Probenmessung wurde nur der sFIDA-Messwert gezeigt. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung ( $\pm$  SD), berechnet anhand der vier Replikate einer Probe.

### 3.1 Assayvalidierung und analytische Validierung

Der bereits etablierte sFIDA-Assay wurde für die Messung der Stuhlproben adaptiert. Die sFIDA-Assaybedingungen wurden spezifisch für die Detektion von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhlproben angepasst. Ziel war es, die Leistung des Assays zu steigern und ihn so selektiv wie möglich zu machen. Dazu wurde während der Assayvalidierung ein möglichst hohes SRV und PKV angestrebt. Dafür wurden unter anderem der Extraktionspuffer, die Fänger- und Detektions-AK, das blockierende Reagenz und der Blockierungspuffer sowie die Probenverdünnung angepasst. Eine analytische Validierung wurde anhand der Wiederfindungsrate von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhlverdünnungen durchgeführt. Bei der Auswertung der Versuche wurden die Einzelkanäle berücksichtigt, wobei der Fokus allerdings auf dem sFIDA-Messwert lag. Da bei der Messung der Stuhlproben AF festgestellt wurde, wurde der Assay zusätzlich so angepasst, dass die AF so gering wie möglich war.

#### 3.1.1 Titration des Fänger-AK und Test einer neuen Detektions-AK-Kombination

Um für die Detektion von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhlproben eine geeignete Konzentration zu finden, bei der die Unterscheidung zwischen Patienten- und Kontrollproben am größten ist und keine unspezifischen Bindungen von Matrixkomponenten an die Oberfläche auftreten, wurde im ersten Schritt (Exp. 1) die Fänger-AK-Konzentration des verwendeten Syn211-AK titriert. Zusätzlich wurde eine neue Detektions-AK-Kombination getestet, um festzustellen, durch welche AK-Kombination mehr Aggregate in den Stuhlproben detektiert werden. Die Referenz war hierbei eine Fänger-AK-Konzentration von 10  $\mu\text{g/mL}$  und der Detektions-AK aus Syn211-CF633 und 4D6-ATTO488. Für die Titration wurden Konzentrationen für den Fänger-AK von 0  $\mu\text{g/mL}$ , 2,5  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$ , 7,5  $\mu\text{g/mL}$  und 10  $\mu\text{g/mL}$  verwendet und als neue Detektions-AK-Kombination Syn211-

### 3 ERGEBNISSE

---

CF633 und Syn211-CF488A mit einer Fänger-AK-Konzentration von 10 µg/mL getestet. Dazu wurden jeweils drei 1:50 mit 1 % BSA in TBS-PC verdünnte Kontroll- und PD-Patientenstuhlproben verwendet. Die Konzentration von 0 µg/mL Fänger-AK diente dabei als CC, um eine unspezifische Bindung der Probe oder des Detektions-AK auszuschließen. Für beide Versuchsbedingungen wurde ein manueller (man.) Grenzwert von 3000 für Kanal 1 und 1800 für Kanal 2 gewählt.

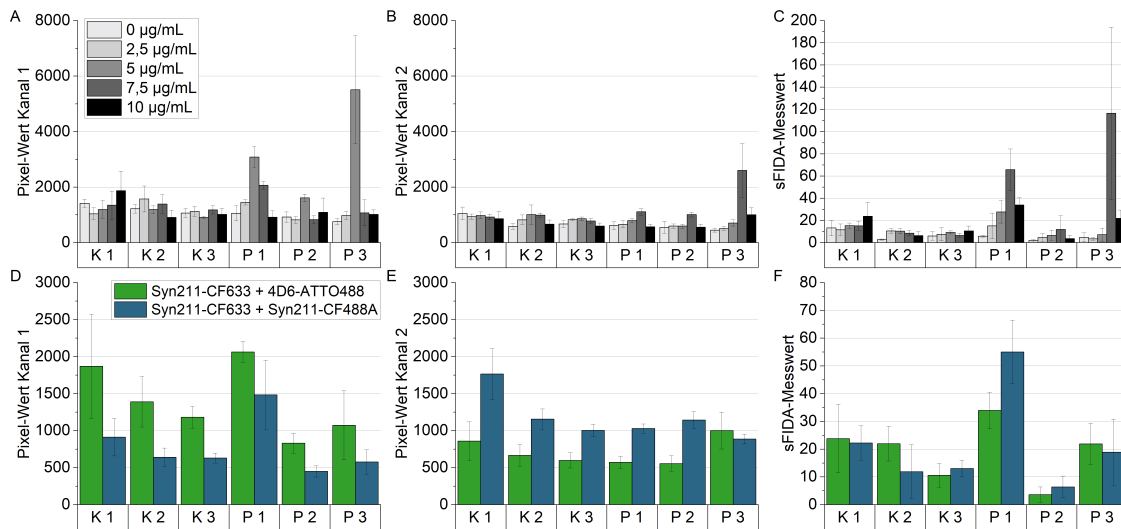
Der Pixel-Wert sowohl in Kanal 1 und Kanal 2 als auch der sFIDA-Messwert der Kontrollstuhlproben wurde nicht von der Fänger-AK-Konzentration beeinflusst, was darauf schließen lässt, dass keine oder nur sehr wenig  $\alpha$ -Syn-Aggregate in den Proben vorhanden waren (s. Abbildung 3.1 A–C).

Für die Patientenstuhlproben dagegen war in Kanal 1 ein Anstieg des Pixel-Wertes mit höher werdender Konzentration bis 5 µg/mL zu erkennen (s. Abbildung 3.1 A). In Kanal 2 und beim sFIDA-Messwert zeigte sich für die Messung der Patientenstuhlproben eine Zunahme des Pixel-Wertes und des sFIDA-Messwertes mit steigender Fänger-AK-Konzentration bis 7,5 µg/mL (s. Abbildung 3.1 B, C). Bei höherer Fänger-AK-Konzentration nahm das Signal wieder ab, da es durch eine zu hohe Konzentration an Fänger-AK zu sterischen Hinderungen in der Bindung der  $\alpha$ -Syn-Aggregate oder zu einer Aggregation des AK kommen kann.

Für die CC waren die Pixel-Werte in Kanal 1 und Kanal 2 sowie die sFIDA-Messwerte für alle Stuhlproben sehr niedrig, was zeigte, dass unspezifische Bindungen von Bestandteilen in den Stuhlproben oder der Detektions-AK an die Oberfläche kaum vorhanden waren. Bei der Messung fiel auf, dass das Signal in Kanal 2 deutlich geringer war als in Kanal 1. Dadurch waren die sFIDA-Messwerte ebenfalls sehr niedrig.

Der Vergleich der Detektions-AK zeigte die neue Kombination mit Syn211-CF633 und Syn211-CF488A in Kanal 1 für die Messung der Kontrollstuhlproben einen 2-fach und für die Patientenstuhlproben einen 1,6-fach geringeren Pixel-Wert im Vergleich zur Referenz (s. Abbildung 3.1 D). In Kanal 2 dagegen wies die neue Kombination im Mittel einen 1,4-fach höheren Pixel-Wert der Patientenstuhlproben auf, allerdings war der mittlere Pixel-Wert der Kontrollstuhlproben ebenfalls 1,8-fach höher (s. Abbildung 3.1 E). Der sFIDA-Messwert war für die neue Kombination für die Messung der Stuhlproben der Kontrollen gleich und für die Stuhlproben der Patienten insgesamt um das 1,4-fache erhöht (s. Abbildung 3.1 F). Dies führte bei Betrachtung des Proben-Kontroll-Verhältnisses (PKV) zu einer größeren Differenzierung von Kontroll- und Patientenstuhlproben für die neue Kombination mit Syn211-CF633 und Syn211-CF488A für den Pixel-Wert in Kanal 1 und den sFIDA-Messwert (s. Tabelle 3.1).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die weiteren Versuche eine Fänger-AK-Konzentration von 7,5 µg/mL und die Detektions-AK-Kombination mit Syn211-CF633 und Syn211-CF488A verwendet. Auffällig war, dass in Kanal 2 kaum Signal im Vergleich zu Kanal 1 gemessen wurde. Daher wurden die nachfolgenden Messungen am CD7-Mikroskop durchgeführt.



**Abbildung 3.1 – Titration des Fänger-AK und Test einer neuen Detektions-AK-Kombination.**

(A–C) Es wurden Stuhlproben von jeweils drei Kontrollen und PD-Patienten für fünf verschiedene Fänger-AK-Konzentrationen von 0 µg/mL bis 10 µg/mL gemessen, wobei die Konzentration des Fänger-AK nur einen Einfluss auf die Patientenstuhlproben hatte, nicht aber auf die Kontrollstuhlproben. Das lässt vermuten, dass in den Stuhlproben der Kontrollen keine oder nur sehr wenig  $\alpha$ -Syn-Aggregate vorhanden waren. (D–F) Zur Ermittlung der Detektions-AK-Kombination wurden jeweils dieselben drei Kontroll- und Patientenstuhlproben verwendet. Hier zeigte die neue Kombination mit dem Syn211-AK als Detektions-AK ein höheres PKV und somit einer gesteigerten Unterscheidung von Kontrollen und Patienten. Es war auffällig, dass in Kanal 2 weniger Signal gemessen wurde als in Kanal 1 und somit auch die sFIDA-Messwerte sehr gering waren. Gemessen wurden die Proben am TIRFM in 100x Vergrößerung. Manueller Grenzwert: 3000 (Kanal 1), 1800 (Kanal 2).

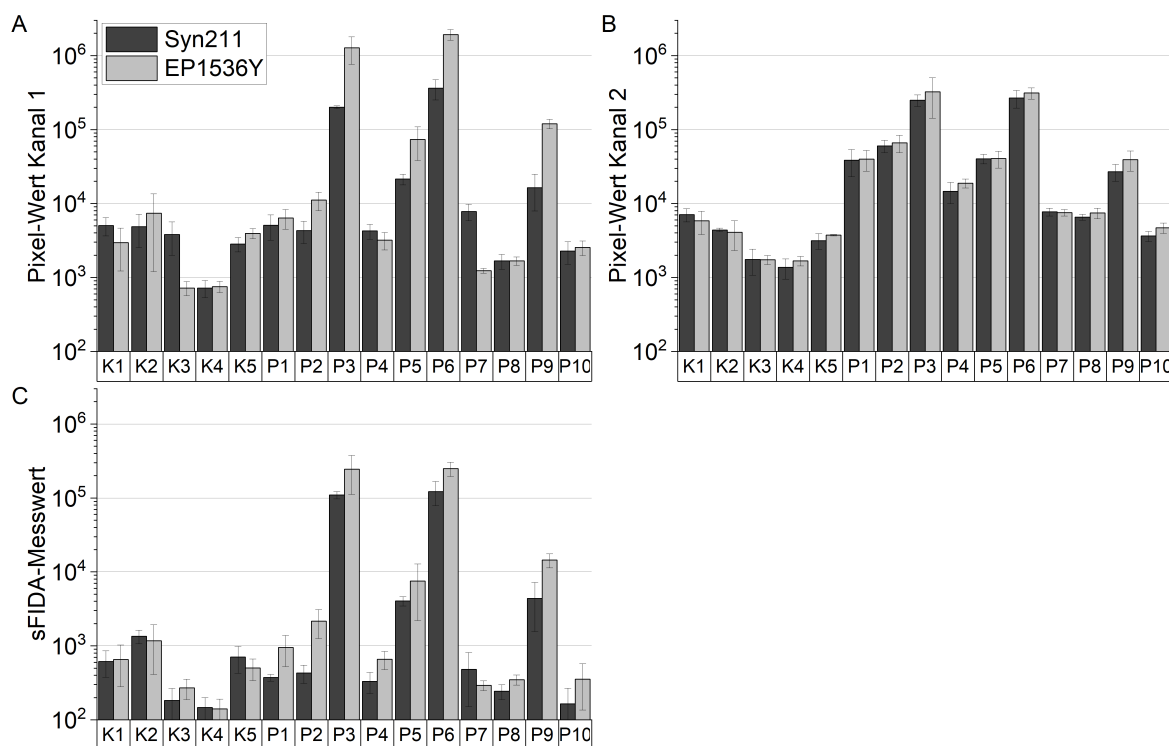
**Tabelle 3.1 – PKV im Vergleich für die alte und die neue Detektions-AK-Kombination bei einer Fänger-Konzentration von 10 µg/mL**

Detektions-AK	Syn211-CF633 + 4D6-ATTO488			Syn211-CF633 + Syn211-CF488A		
	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert
Mittelwert Patienten	1321,9	708,7	19,8	836,5	1019,3	26,7
Mittelwert Kontrollen	1480,2	707,8	13,5	727,5	1308,0	15,0
PKV	0,9	<b>1,0</b>	1,5	<b>1,2</b>	0,8	<b>1,8</b>

PKV: Proben-Kontroll-Verhältnis

### 3.1.2 Test einer neuen Detektions-AK-Kombination mit dem EP1536Y-AK gegen phosphoryliertes Serin 129

Im nächsten Schritt (Exp. 2) wurde getestet, ob die Detektion von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten durch den EP1536Y-AK gegen phosphoryliertes Serin 129 in  $\alpha$ -Syn als Detektions-AK eine weitere Erhöhung des PKV erzielen konnte, da in LB eine Hyperphosphorylierung des  $\alpha$ -Syn am Serin 129 auftritt [47]. Getestet wurden Stuhlproben von fünf Kontrollen und zehn PD-Patienten mit dem Syn211-AK als Referenz-Detektions-AK. Da in einem Vorversuch 1 % BSA in TBS-PC als Extraktionspuffer ein höheres SNR erzielt werden konnte, wurde der EliA-Extraktionspuffer mit 1 % BSA hiermit ersetzt (Daten nicht gezeigt). Für die Auswertung wurde ein manueller Grenzwert von 850 für Kanal 1 und 1450 für Kanal 2 gewählt.



**Abbildung 3.2 – Vergleich des Syn211-AK und EP1536Y-AK als Detektions-AK für die Detektion von  $\alpha$ -Syn in Stuhlproben.**

(A–C) Für den EP1536Y-AK im Vergleich zum Syn211-AK als Detektions-AK war für die Stuhlproben der Patienten eine deutliche Signalsteigerung zu sehen, während das Signal für die Stuhlproben der Kontrollen nahezu identisch blieb oder abnahm. Die Unterschiede waren in Kanal 1 deutlich größer als in Kanal 2 was sich in einem ähnlichen Mittelwert für die Pixel-Werte der Patienten- und Kontrollstuhlproben für die Detektions-AK-Kombinationen in Kanal 2 widerspiegelte. Gemessen wurden die Proben am CD7-Mikroskop in 50x Vergrößerung. Manueller Grenzwert: 850 (Kanal 1), 1450 (Kanal 2).

Der EP1536Y-AK als Detektions-AK wies höhere Signale für die Patientenstuhlproben im Vergleich zu den Kontrollstuhlproben auf (s. Abbildung 3.2 A–C), was zu einem 83 % höheren PKV in Kanal 1 und 58 % höheren PKV für den sFIDA-Messwert führte (s. Tabelle 3.2). Vor allem für den sFIDA-Messwert, bedingt durch die Signalsteigerung in Kanal 1, wies der EP1536Y-AK

**Tabelle 3.2 – PKV für den Syn211-AK und EP1536Y-AK als Detektions-AK**

Detektions-AK	Syn211			EP1536Y		
	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert
Mittelwert Patienten	62682	71520	24247	342659	85907	52082
Mittelwert Kontrollen	3458	3543	599	3148	3412	548
PKV	19	20	40	<b>109</b>	<b>19</b>	<b>95</b>

PKV: Proben-Kontroll-Verhältnis

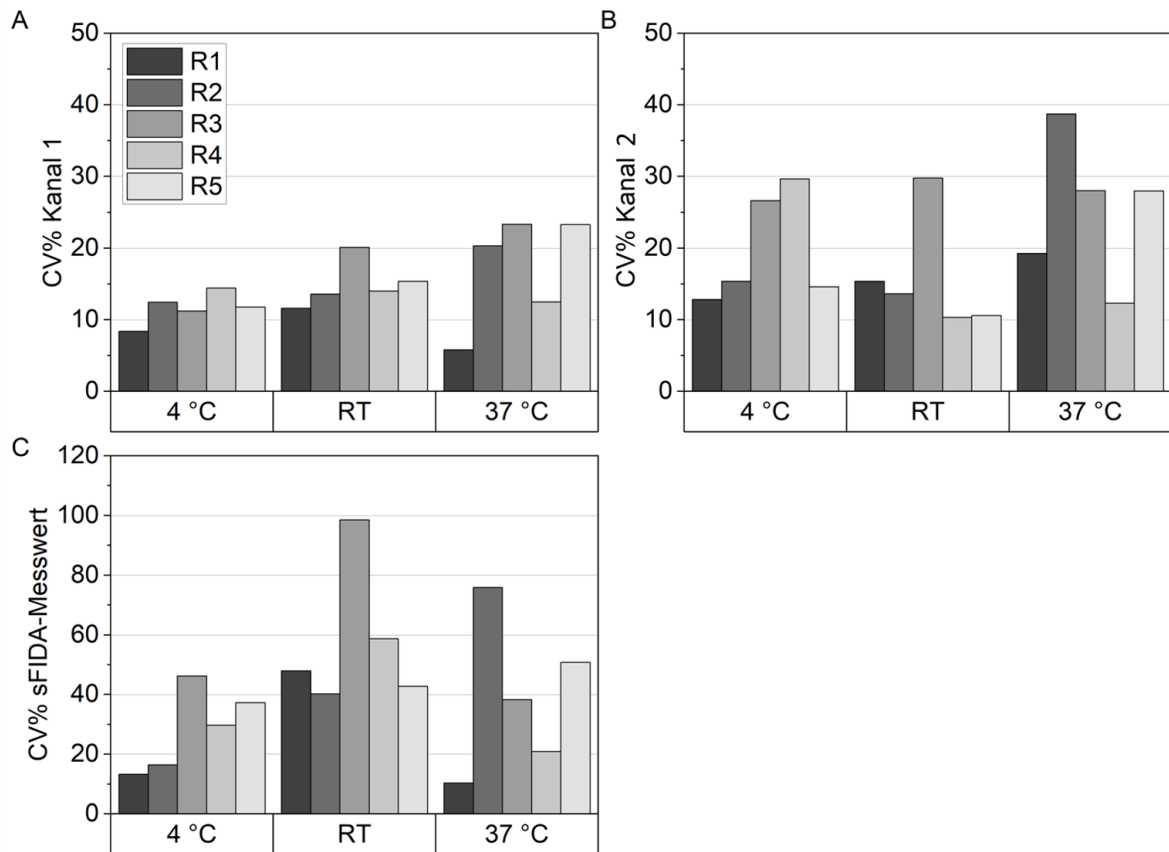
im Vergleich zum Syn211-AK für den Großteil der Patientenstuhlproben einen höheren sFIDA-Messwert auf, während der sFIDA-Messwert für die Kontrollstuhlproben gleich oder niedriger war. In Kanal 2 konnten keine Unterschiede zwischen den Bedingungen festgestellt werden (s. Abbildung 3.2 B), sodass das PKV sich nicht unterschied (s. Tabelle 3.2).

Anhand dieser Ergebnisse wurde für die weitere Assayvalidierung der EP1536Y-AK als Detektions-AK mit einer Konzentration von jeweils 0,625 µg/mL verwendet. Von einer erneuten Titrierung des Detektions-AK wurde abgesehen, da eine Unterscheidung der Patientenstuhlproben von Kontrollstuhlproben möglich war, was sich in einem hohen PKV widerspiegelte. Die geringen Unterschiede in Kanal 2 könnten auf den fehlerhaften UV-Filter des CD7 zurückzuführen sein, durch den die Signale aus Kanal 1 und 2 nicht korrekt aufgetrennt wurden. Auch für die folgenden Experimente am CD-7 konnten daher nur geringe Unterschiede in Kanal 2 festgestellt werden.

### 3.1.3 Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Extraktion sowie Vergleich der Inkubationstemperatur und -zeit der Proben

Im ersten Teil dieses Experimentes (Exp. 3) wurde die Reproduzierbarkeit der Extraktion mit fünf Homogenaten (R1 bis R5) einer PD-Patientenstuhlprobe getestet und die Extraktion mit und ohne Proteaseinhibitoren (PI) im Extraktionspuffer getestet. Weiterführend wurde getestet, ob eine Inkubation der Stuhlproben bei 4 °C ü. N. oder bei 37 °C für 1 h ein höheres SRV lieferte als die bisherige Inkubation bei RT, da entweder durch die längere Inkubationszeit oder die Erhöhung der Temperatur die Bindung der Aggregate an den Fänger-AK optimiert werden konnte. Zusätzlich wurde eine BC mitgeführt, um unspezifische Bindungen durch die Inkubationsbedingungen auszuschließen. Im Folgenden wurden nur die Ergebnisse für die Stuhlhomogenate graphisch dargestellt, die mit PI extrahiert wurden. Der 0,1 % Grenzwert wurde anhand der BC für jede Versuchsbedingung bestimmt und für die Auswertungen verwendet.

Die fünf Replikate wiesen eine geringer Varianz für die Pixel-Werte und sFIDA-Messwerte auf, wobei eine Inkubation bei 4 °C mit einem CV%-Wert von 14 % (Kanal 1), 24 % (Kanal 2) bzw. 37 % (sFIDA-Messwert) im Vergleich zur Inkubation bei 37 °C mit einem CV%-Wert von 16 %



**Abbildung 3.3 – Darstellung der CV%-Werte im Vergleich für die Inkubation der fünf Replikate bei 4 °C ü. N., bei RT für 1 h oder bei 37 °C für 1 h.**

Die CV%-Werte waren in Kanal 1 (A) insgesamt am niedrigsten, gefolgt von Kanal 2 (B) und für den sFIDA-Messwert (C) waren die Werte am höchsten. Die Varianz war bei einer Inkubation bei 37 °C nicht nur durchschnittlich am höchsten, sondern wies auch die größten Unterschiede zwischen den Stuhlhomogenaten auf. Gemessen wurde am CD7-Mikroskop in 50x Vergrößerung. Grenzwert: 0,1 %.



**Tabelle 3.3 – Vergleich der Mittelwerte der Pixel-Werte und der sFIDA-Messwerte für alle Probeninkubationsbedingungen und der Extraktion mit und ohne PI**

Bedingungen	4 °C, ü. N.		RT, 1h		37 °C, 1h	
	Ohne PI	Mit PI	Ohne PI	Mit PI	Ohne PI	Mit PI
Extraktionspuffer						
Mittelwert Kanal 1	26739	22078	29189	29220	317357	<b>351492</b>
Mittelwert Kanal 2	35928	41945	8161	10243	55122	<b>73257</b>
Mittelwert sFIDA-Messwert	3911	1379	993	1761	20911	<b>31597</b>

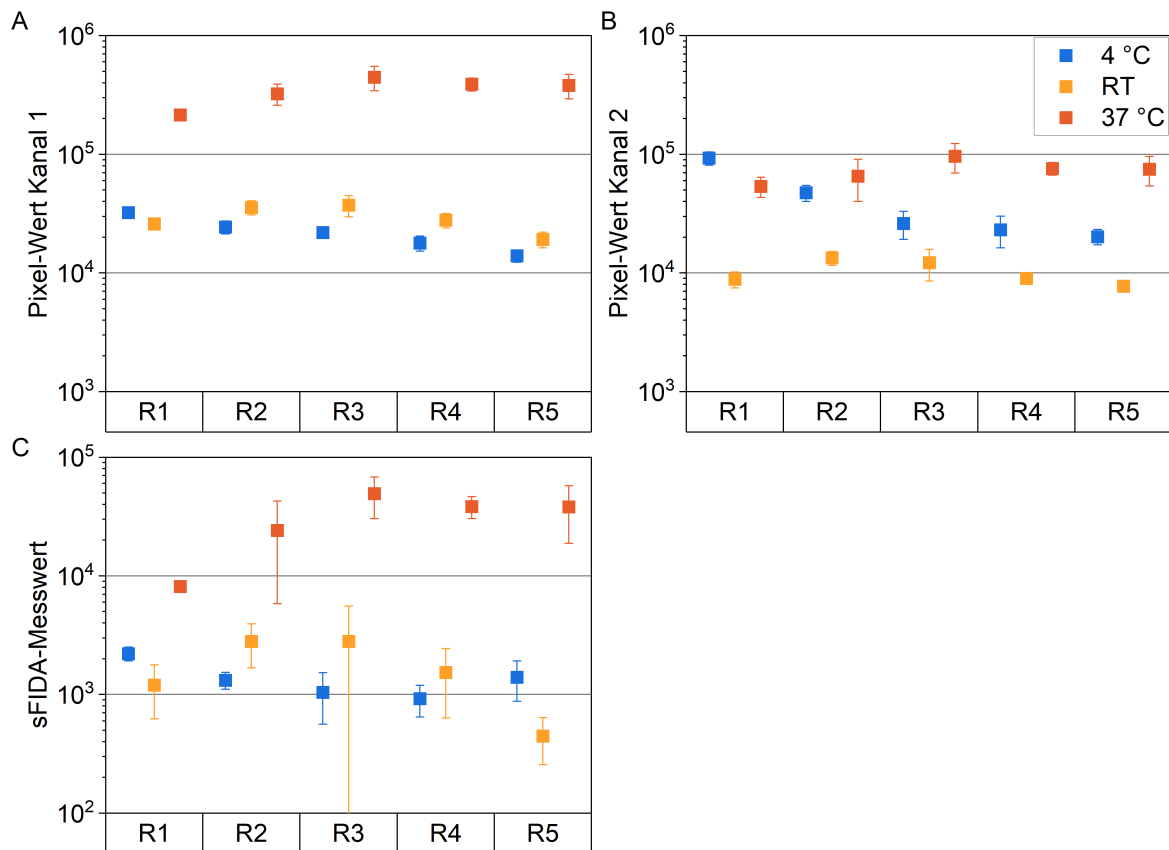
PI: Proteaseinhibitoren; RT: Raumtemperatur ü. N.: über Nacht

(Kanal 1), 26 % (Kanal 2) bzw. 45 % (sFIDA-Messwert), die reproduzierbarsten Ergebnisse lieferte (Abbildung 3.3). Eine Inkubation bei RT zeigte in Kanal 2 mit einem CV%-Wert von 16 % die niedrigste Varianz und mit einem CV%-Wert von 18 % einen 1,3-fach höheren Wert in Kanal 1 aufgrund des Extraktes R3.

In Tabelle 3.3 sind die Mittelwerte der Kanäle 1 und 2 sowie des sFIDA-Messwertes zum Vergleich der Extraktion mit und ohne PI bei den verschiedenen Inkubationsbedingungen dargestellt. Für die Inkubation bei 37 °C führte eine Extraktion mit PI in Kanal 1 zu einem 10 %, in Kanal 2 zu einem 25 % höheren Mittelwert und für den sFIDA-Messwert zu einem 34 % höheren Mittelwert als ohne PI. Bei einer Inkubation bei RT konnte durch Extraktion mit PI im Extraktionspuffer ebenfalls eine Signalsteigerung um 44 % für den Mittelwert des sFIDA-Messwertes erreicht werden, in den Einzelkanälen fiel diese für den mittleren Pixel-Wert mit 0,1 % in Kanal 1 und 20,3 % in Kanal 2 deutlich geringer aus. Bei einer Inkubation bei 4 °C führte die Zugabe von PI zu einer Abnahme des mittleren sFIDA-Messwertes um 64 % und des mittleren Pixel-Wertes in Kanal 1 um 17 %. In Kanal 2 war eine Signalsteigerung mit PI im Extraktionspuffer mit einem 14 % höheren mittleren Pixel-Wert zu beobachten.

Im zweiten Teil führte eine Inkubation bei 37 °C in beiden Einzelkanälen zu einem deutlich höheren Pixel-Wert der Stuhlhomogenate (s. Abbildung 3.4 A, B). Auch wies eine Inkubation bei 37 °C einen durchschnittlich 94 % höheren sFIDA-Messwert im Vergleich zur Inkubation bei RT und einen 95 % höheren sFIDA-Messwert im Vergleich zur Inkubation bei 4 °C auf (s. Abbildung 3.4 C). Die Grenzwerte unterschieden sich nicht signifikant für die verschiedenen Inkubationsbedingungen, was zeigt, dass die Inkubationstemperatur und -zeit keine unspezifischen Bindungen fördert.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurden für weitere Versuche die Temperatur der Proben- und Detektions-AK-Inkubation auf 37 °C erhöht, auch wenn die Varianz leicht gesteigert war. Zudem wurde der Extraktionspuffer mit PI versetzt, da eine Signalsteigerung für diese Inkubationsbedingung zu beobachten war.



**Abbildung 3.4 – Inkubation von fünf Replikaten einer Stuhlprobe bei 4 °C ü. N., bei RT für 1 h oder bei 37 °C für 1 h**

Die Inkubation bei 37 °C für 1 h führte im Vergleich zur Inkubation 4 °C oder bei RT zu höheren Pixel-Werten bzw. sFIDA-Messwerten. Die fünf Replikate der Messungen wiesen zudem eine hohe Übereinstimmung in den gemessenen Werten auf, vor allem gab es kaum Unterschiede bei einer Inkubation bei RT, aber auch bei den anderen Inkubationsbedingungen war das Signal sehr ähnlich. Die Ergebnisse zeigen nur die mit PI extrahierte Stuhlprobe. Gemessen wurde am CD7-Mikroskop in 50x Vergrößerung. Grenzwert: 0,1 %.

**Tabelle 3.4 – PKV für den Syn211-AK und den EP1536Y-AK als Fänger-AK**

Fänger-AK	Syn211-AK			EP1536Y-AK		
	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert
Mittelwert Patienten	58043	44226	43287	61116	55332	54625
Mittelwert Kontrollen	24	99	14	62	142	41
PKV	<b>2443</b>	<b>446</b>	<b>3020</b>	987	388	1309

PKV: Proben-Kontroll-Verhältnis

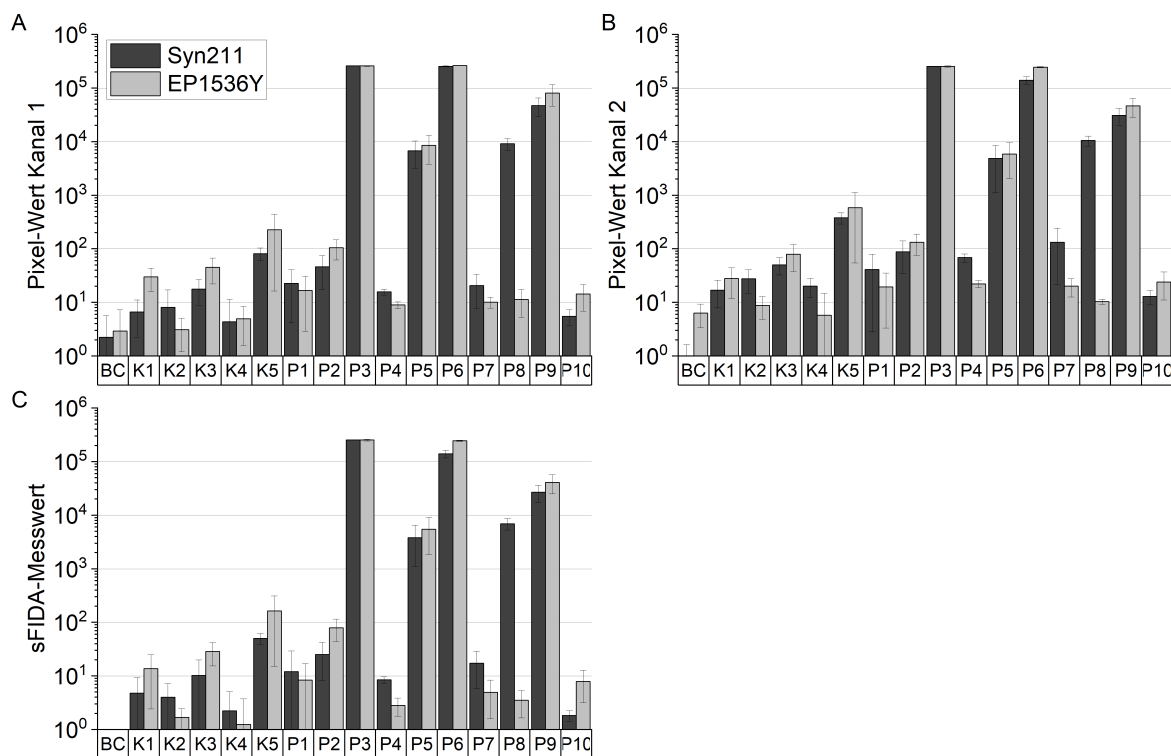
### 3.1.4 Test des EP1536Y-AK als Fänger-AK

In Exp. 4 wurde der EP1536Y-AK auch als Fänger-AK im Vergleich zur Referenz mit dem Syn211-AK getestet, um zu überprüfen, ob der EP1536Y-AK, nachdem er zu einer deutlichen Erhöhung des PKV als Detektions-AK geführt hatte, ebenfalls zu einer weiteren Erhöhung des PKV als Fänger-AK führt, wenn nur an S129 phosphorylierte  $\alpha$ -Syn-Aggregate gebunden und detektiert werden. Hierfür wurden erneut Stuhlproben von fünf Kontrollen und zehn PD-Patienten verwendet, die mit 1 % BSA in TBS-PC mit PI homogenisiert und in EliA-Diluent 1:50 verdünnt im sFIDA-Assay verwendet wurden. Als Negativkontrolle (BC) wurde der Verdünnungspuffer verwendet. Für die Auswertung wurde ein manueller Grenzwert von 2000 für Kanal 1 und 3000 Kanal 2 gewählt.

Das Binden der  $\alpha$ -Syn-Aggregate mit dem EP1536Y-AK zeigte in Kanal 1 einen 2,6-fach höheren mittleren Pixel-Wert für die Kontrollstuhlproben und einen 1,1-fach höheren mittleren Pixel-Wert für die Patientenstuhlproben im Vergleich zur Referenz (s. Abbildung 3.5 A). In Kanal 2 und für die sFIDA-Messwerte zeigte sich mit einer 1,4- bzw. 3-fachen Erhöhung der Mittelwerte für die Stuhlproben von Kontrollen und mit jeweils einer 1,3-fachen Erhöhung der Mittelwerte für die Stuhlproben von Patienten ein ähnlicher Trend wie in Kanal 1 (s. Abbildung 3.5 B, C). Die Messwerte der BC für den EP1536Y-AK waren im Vergleich zum Syn211-AK um durchschnittlich 6,1-fach erhöht. Die Erhöhung der Messwerte der BC und der Kontrollstuhlproben lässt darauf schließen, dass der EP1536Y-AK als Fänger-AK zu mehr unspezifischen Bindungen führte als die Referenz.

Zur Bestimmung der besten Fänger-AK-Variante wurde das PKV berechnet (s. Tabelle 3.4). Obwohl der EP1536Y-AK als Fänger-AK häufig ein höheres Signal aufwies, war das PKV für den Syn211-AK um den Faktor 2,5 in Kanal 1, um 1,5 in Kanal 2 und um 2,3 für den sFIDA-Messwert erhöht, da für den EP1536Y-AK die Steigerung des Signals für die Kontrollstuhlproben höher war als für die Patientenstuhlproben und somit die Differenzierung zwischen Patienten- und Kontrollstuhlproben verringert war.

Somit konnte durch den Einsatz des EP1536Y-AK keine Verbesserung des PKV erzielt werden,



**Abbildung 3.5 – Test des EP1536Y-AK gegen phosphoryliertes S129 in  $\alpha$ -Syn als Fänger-AK im Vergleich zum Syn211-AK.**

Der EP1536Y-AK als Fänger-AK führte für drei der fünf Kontrollstuhlproben zu einem erhöhten Signal, was zu einer durchschnittlich 2,3-fachen Erhöhung der Messwerte im Vergleich zum Syn211-AK als Fänger-AK führte. Für die Patientenstuhlproben waren die Messwerte für fünf Stuhlproben gleich oder höher. Dies führte im Durchschnitt zu einer 1,2-fachen und somit geringeren Erhöhung des Signals für den EP1536Y-AK im Vergleich zum Syn211-AK als Fänger-AK. Gemessen wurden die Proben am CD7-Mikroskop in 50x Vergrößerung. Manueller Grenzwert: 2000 (Kanal 1), 3000 (Kanal 2).

da die Bindung von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in den Stuhlproben mit dem EP1536Y-AK unspezifischer zu sein schien, da auch die Signale der Kontrollen anstiegen. Der Syn211-AK wurde deshalb weiterhin als Fänger-AK verwendet.

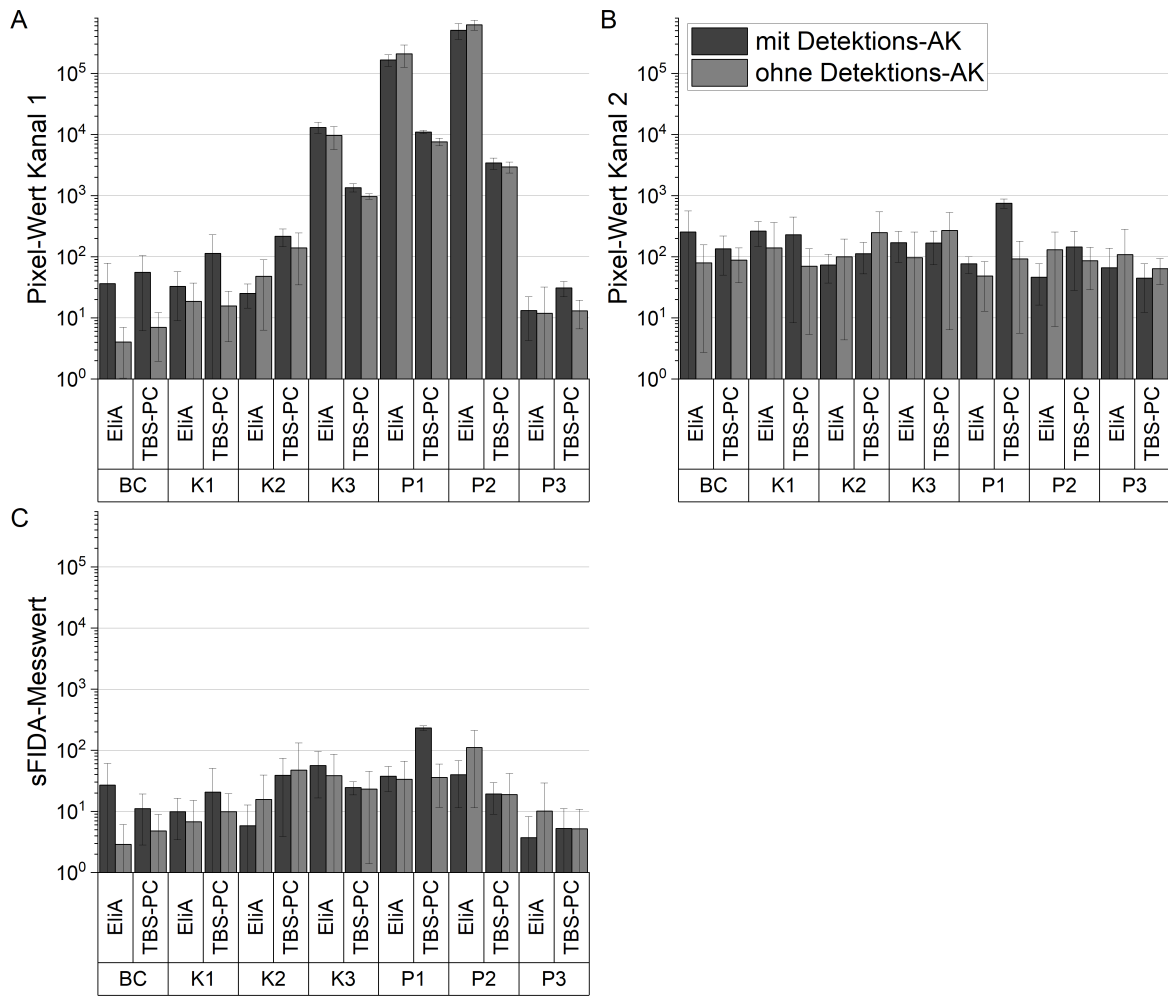
## **3.2 Assayentwicklung zur Verringerung der Autofluoreszenz**

Im Zuge der Assayvalidierung wurden bei einem Versuch die Proben ohne Detektions-AK gemessen, um die Stuhlproben auf AF zu testen. Dazu wurde eine PD-Patientenstuhlprobe 1:50, 1:25 und 1:5 verdünnt sowie unverdünnt jeweils mit und ohne Detektions-AK gemessen. Hierbei zeigten alle Verdünnungen der Stuhlprobe sowie die unverdünnte Stuhlprobe AF. Die AF war für die unverdünnte Stuhlprobe geringer als für die 1:5 verdünnte Stuhlprobe und nahm mit zunehmender Verdünnung ab (Daten nicht gezeigt). Die weitere Assayvalidierung wurde daher unter Berücksichtigung der AF durchgeführt, mit dem Ziel diese so weit wie möglich zu verringern.

### **3.2.1 Anpassung des Stuhlproben-Verdünnungspuffers**

Die AF könnte durch den Verdünnungspuffer entstanden oder verstärkt worden sein, da in dem vorhergehenden Versuch eine 1:5 verdünnte Stuhlprobe eine höhere AF aufwies als die unverdünnte Stuhlprobe. Deswegen wurde 1 % BSA in TBS-PC als Verdünnungspuffer getestet (Exp. 5). Als Referenz diente der zuvor verwendete EliA-Diluent. Dafür wurden jeweils drei 1:50 verdünnte Stuhlproben von Kontrollen und PD-Patienten mit und ohne Detektions-AK mit den zwei verschiedenen Verdünnungspuffern gemessen. Zudem kann die Inkubationstemperatur einen Einfluss auf die AF haben, da eine erhöhte Temperatur zur Bildung von autofluoreszierenden Komplexen oder Bakterienwachstum führen könnte. Aus diesen Gründen wurden die Proben außerdem bei RT statt wie zuvor bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurde der Fluorophor des zweiten Detektions-AK von CF488A (grün) auf CF405S (blau) gewechselt, um zu testen, ob die AF ebenfalls bei Anregung in dieser Wellenlänge auftrat. Der manuelle Grenzwert von 3000 in beiden Einzelkanälen wurde für die Auswertung angewendet.

Die AF war in Kanal 1 für Stuhlproben, die mit dem EliA-Diluenten verdünnt wurden, mit Ausnahme einer Kontrollstuhlprobe stets höher als mit 1 % BSA in TBS-PC verdünnte Stuhlproben (s. Abbildung 3.6 A). Zudem war die AF für Stuhlproben die mit 1 % BSA in TBS-PC verdünnt wurden, stets geringer oder gleich groß im Vergleich zum Signal. Allerdings waren die Signale der Stuhlproben, die mit EliA-Diluenten verdünnt wurden für drei der Patientenstuhlproben höher als mit 1 % BSA in TBS-PC verdünnte Patientenstuhlproben. Dadurch war das Signal für zwei der drei Patientenstuhlproben die mit EliA-Diluenten verdünnt wurden durchschnittlich um fast das 40-fache höher und für zwei der drei Kontrollstuhlproben um durchschnittlich um das 8-fache höher.



**Abbildung 3.6 – Vergleich des EiiA-Diluenten und 1 % BSA in TBS-PC als Verdünnungspuffer für Stuhlproben.**

Für den EiiA-Diluenten als Verdünnungspuffer war das Signal meist höher als für 1 % BSA in TBS-PC (vor allem in Kanal 1 (A)). Allerdings war auch der Unterschied zwischen Signal und AF geringer bzw. die AF höher als das Signal als mit 1 % BSA in TBS-PC als Verdünnungspuffer. Gemessen wurden die Proben am TIRFM in 100x Vergrößerung. Manueller Grenzwert: 3000 für Kanal 1 und 2.

**Tabelle 3.5 – Differenz zwischen Signal (mit Detektions-AK) und AF (ohne Detektions-AK) für den EliA-Diluenten oder 1 % BSA in TBS-PC als Verdünnungspuffer**

Verdünnungspuffer	EliA-Diluent			1 % BSA in TBS-PC		
	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert
K1	553,3	-41,9	23,4	13,2	991,0	35,3
K2	-854,5	-448,9	-236,3	691,6	532,0	-3,1
K3	-39589,7	-36,7	-142,9	4109,9	783,5	216,3
P1	-13657,8	216,5	203,7	27146,5	3760,8	1506,4
P2	-32702,4	-292,6	-291,9	8586,4	551,6	230,0
P3	350,2	-434,2	-16,5	1231,5	630,0	22,4

In Kanal 2 waren die Signale und die AF aller Stuhlproben auf Höhe der BC, weshalb die gemessenen Werte dem Hintergrundsignal entsprachen (s. Abbildung 3.6 B).

Für die AF des sFIDA-Messwertes in Abbildung 3.6 C zeigte sich ebenfalls im Durchschnitt eine 2,6-fach niedrigere AF für 1 % BSA in TBS-PC als Verdünnungspuffer. Das Signal war dessen ungeachtet teilweise für die Kontrollstuhlproben höher und für die Patientenstuhlproben niedriger. Daraus resultierte insgesamt ein höheres PKV in den Einzelkanälen für den EliA-Diluenten, aber auch eine geringere Differenz zwischen Signal und AF, sodass für den EliA-Diluenten 13 von 18 Messwerte eine höhere AF als Signal aufwiesen (s. Tabelle 3.5). Sowohl das Signal als auch die AF der BC waren für beide Verdünnungspuffer sehr ähnlich, was zeigte, dass der Verdünnungspuffer alleine weder zu erhöhtem Hintergrundsignal noch zu AF führte.

Bei Verwendung des Detektions-AK mit dem Fluorophor CF405S statt des Fluorophors CF488A wurde ebenfalls AF detektiert. Allerdings wies die Probeninkubation bei RT im Vergleich zu der Inkubation bei 37 °C eine geringere AF auf (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund des Vergleichs zwischen EliA-Diluenten und 1 % BSA in TBS-PC als Verdünnungspuffer unter besonderer Berücksichtigung der AF wurde für die weiteren Versuche 1 % BSA in TBS-PC als Verdünnungspuffer für die Stuhlproben verwendet. Durch Verdünnung mit 1 % BSA in TBS-PC wurde deutlich mehr Signal als AF gemessen. Die Probeninkubation wurde zudem wieder bei RT durchgeführt, da dies ebenfalls zu einer geringen AF führte. In den nachfolgenden Versuchen wurde weiterhin der Detektions-AK mit dem CF405S-Fluorophor verwendet, da sowohl mit diesem als auch mit dem CF488A-Fluorophor AF auftrat.

### **3.2.2 Auswahl des blockierenden Reagenzes und Vergleich von Stuhlprobenverdünnungen**

Da bei der Überprüfung auf AF festgestellt wurde, dass diese mit zunehmender Verdünnung abnahm (Kapitel 3.2) wurden als nächstes hohe Verdünnungen von 1:400, 1:600 und 1:800 mit dem

Ziel getestet, die AF weiter zu verringern (Exp. 6). Zusätzlich wurden verschiedene blockierende Reagenzien getestet, um das Hintergrundsignal zu verringern und unspezifische Bindungen an das blockierende Reagenz auszuschließen. Dazu wurde 1 % MP in TBS-PC und die kommerziellen Blockierungslösungen BS und SB getestet. Als Referenz diente 0,5 % BSA in TBS-PC.

Für die Detektion wurden Syn211-CF633 und Syn211-CF405S mit einer Konzentration von jeweils 0,625 µg/mL als Detektions-AK verwendet, da in vorhergehenden Versuchen die Detektion der Standards ( $\alpha$ -Syn-SiNaPs,  $\alpha$ -Syn-Aggregate) mit dem EP1536Y-AK als Detektions-AK nicht möglich war (Daten nicht gezeigt). Für den Versuch wurden jeweils drei Stuhlproben von Kontrollen und PD-Patienten verdünnt in 1 % BSA in TBS-PC verwendet und jedes blockierende Reagenz mit jeder Verdünnung verglichen. Für die verschiedenen Versuchsbedingungen wurde ebenfalls die AF für eine PD-Patientenstuhlprobe mitgemessen (s. Anhang, Abbildung 5.3).

In den folgenden Ergebnissen wurden lediglich die Ergebnisse für die 1:400 (s. Anhang, Abbildung 5.1) und 1:600 (s. Anhang, Abbildung 5.2) Verdünnung evaluiert, da eine 1:800 Verdünnung zu geringe Signale aufwies, da durch die hohe Verdünnung der Analyt zu weit verdünnt wurde und so unter der Nachweisgrenze lag. Für die Auswertung wurde ein Grenzwert von 0,1 %, der anhand der BC bestimmt wurde, verwendet.

Für die 1:400 verdünnten Stuhlproben resultierte Blockieren mit MP für alle Stuhlproben in Kanal 1 in den höchsten Pixel-Werten und für vier der sechs Stuhlproben in den höchsten sFIDA-Messwerten, was zu einem 1,3-fach (Kanal 1) bzw. 1,4-fach höheren Mittelwert für die Kontrollstuhlproben und einem 1,2-fach (Kanal 1) bzw. 1,1-fach höheren Mittelwert für die Patientenstuhlproben im Vergleich zur Referenz führte (s. Anhang, Abbildung 5.1 A, C). Danach zeigte Blockieren mit BSA den zweithöchsten Mittelwert der Pixel-Werte in Kanal 1 sowie der sFIDA-Messwerte und die geringsten Signale wies Blockieren mit SB und BS auf. In Kanal 2 variierten die Ergebnisse stark für die einzelnen Proben, aber Blockieren mit BSA führte für vier der Stuhlproben zu den höchsten Pixel-Werten und somit für die Stuhlproben der Kontrollen zu einem 1,2-fach höheren und für die Stuhlproben der Patienten zu einem 1,4-fach höheren Mittelwert der Pixel-Werte im Vergleich zu den Pixel-Werten nach Blockieren mit MP (s. Anhang, Abbildung 5.1 B). Blockieren mit SB und BS zeigten erneut die niedrigsten Pixel-Werte.

Die Ergebnisse für die 1:600 verdünnten Stuhlproben glichen denen der 1:400 Verdünnung. Blockieren mit MP zeigte für alle Stuhlproben die höchsten Pixel-Werte in Kanal 1 und die höchsten sFIDA-Messwerte. Blockieren mit BSA wies einen 1,2-fach (Kanal 1) bzw. 2,4-fach niedrigeren Pixel-Wert für die Kontrollstuhlproben und einen 1,4-fach (Kanal 1) bzw. 1,5-fach niedrigeren Pixel-Wert für die Patientenstuhlproben auf (s. Anhang, Abbildung 5.2 A, C). Blockieren mit SB und BS führte jeweils zu den geringsten Signalen. In Kanal 2 dagegen zeigte Blockieren mit SB nach BSA den zweithöchsten Mittelwert für die Patientenstuhlproben und den höchsten Mittelwert für die Kontrollstuhlproben. Danach wies Blockieren mit MP den zweithöchsten Mittelwert



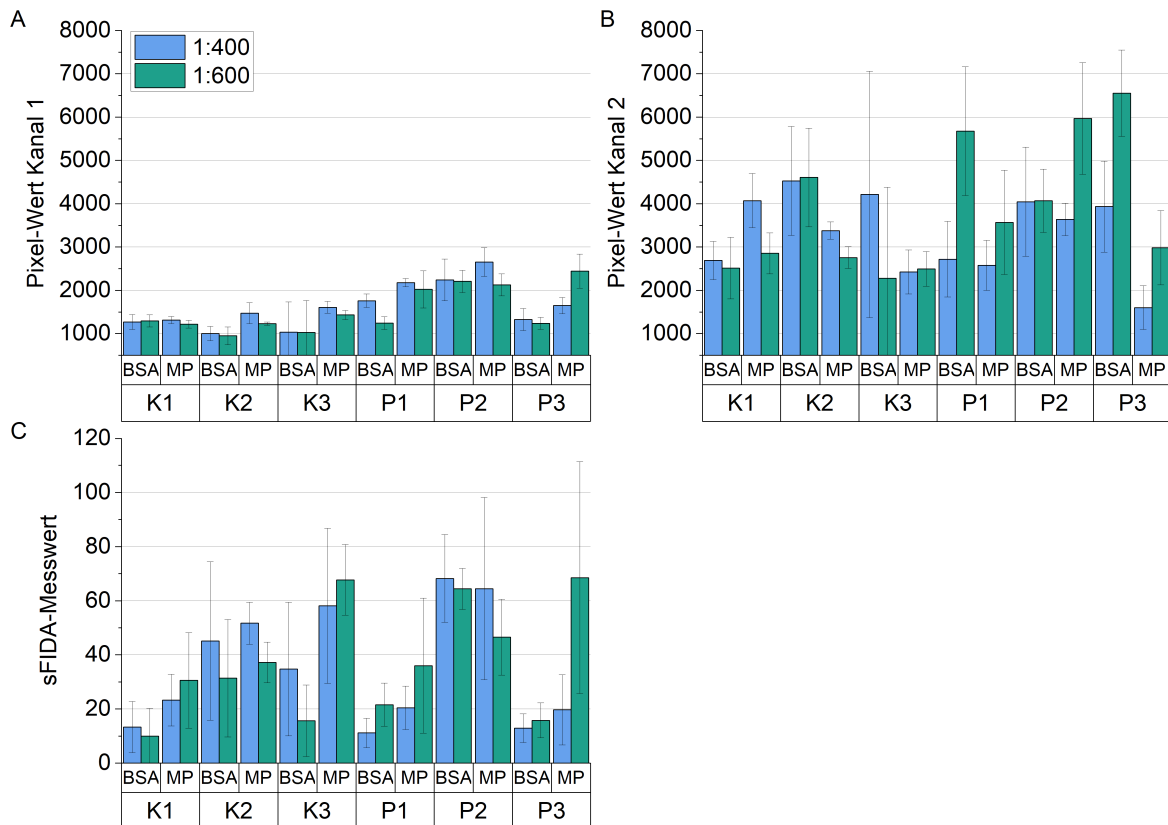
auf und BS war erneut das blockierende Reagenz mit dem niedrigsten Mittelwert (s. Anhang, Abbildung 5.2 B). Nach Blockieren mit BSA, MP und BS wiesen die BC in Kanal 1 alle ähnliche Graustufenwerte auf, was bedeutet, dass alle sehr ähnliche Pixel-Werte aufwiesen und kein blockierendes Reagenz zu einem erhöhten Hintergrund führte. Nur nach Blockieren mit SB wies die BC einen 1,3-fach höheren Graustufenwert als die Referenz auf. Für Kanal 2 wiesen sowohl SB als auch BS 1,3- bzw. 1,4-fach höhere Graustufenwerte im Vergleich zur Referenz auf, was auf ein erhöhtes Hintergrundsignal schließen lässt.

Diese Ergebnisse zeigten, dass sowohl für die 1:400 als auch die 1:600 Verdünnung Blockieren mit BSA oder MP zu den höchsten mittleren Pixel-Werten und sFIDA-Messwerten führte. Zur Bestimmung des blockierenden Reagenz und Probenverdünnung mit einem hohen PKV und zusätzlich geringer AF wurde in Abbildung 3.7 nur BSA mit MP für die 1:400 und 1:600 Verdünnung verglichen.

In Kanal 1 wiesen die Kontrollstuhlproben im Durchschnitt 1,1-fach geringere Pixel-Werte für die 1:600 Verdünnung im Vergleich zur 1:400 Verdünnung auf und die 1:600 verdünnten Patientenstuhlproben wiesen 1,1-fach geringere oder gleich hohe Pixel-Werte im Vergleich zu 1:400 verdünnten Stuhlproben auf (s. Abbildung 3.7 A). In Kanal 2 war der mittlere Pixel-Wert für die Kontrollstuhlproben die 1:600 verdünnt wurden niedriger als für 1:400 verdünnte und für die Patientenstuhlproben dagegen höher (s. Abbildung 3.7 B). Für den sFIDA-Messwert ergab sich für 1:600 verdünnte Stuhlproben der Kontrollen ein geringerer oder gleich hoher mittlerer sFIDA-Messwert. Für 1:600 verdünnte Stuhlproben der Patienten ergab sich im Gegensatz dazu ein durchschnittlich 1,3-fach höherer mittlerer sFIDA-Messwert (s. Abbildung 3.7 C).

Sowohl für die Kontrollstuhlproben als auch für die Patientenstuhlproben waren der mittlere Pixel-Wert in Kanal 1 mit MP als blockierendes Reagenz höher als mit BSA (s. Abbildung 3.7 A). Gegenätzlich hierzu zeigte Blockieren mit MP bei den Kontrollstuhlproben einen geringeren mittleren Pixel-Wert in Kanal 2 für beide Stuhlverdünnungen als nach Blockieren mit BSA (s. Abbildung 3.7 B). Allerdings war das PKV nach Blockieren mit MP geringer im Vergleich zu Blockieren mit BSA (s. Tabelle 3.6). Es zeigte sich für MP als blockierendes Reagenz für alle Stuhlproben und für BSA als blockierendes Reagenz nur für die Patientenstuhlproben ein höherer mittlerer sFIDA-Messwert (s. Abbildung 3.7 C). Eine 1:600 Verdünnung der Stuhlproben nach Blockieren mit BSA führte daher zu einem 1,6-fach höheren PKV für den sFIDA-Messwert im Vergleich zu Blockieren mit MP (s. Tabelle 3.6).

Sowohl in den Einzelkanälen als auch für den sFIDA-Messwert wies Blockieren mit den neu getesteten Reagenzien im Vergleich zum Blockieren mit BSA als Referenz eine Reduzierung der AF um bis zu 78 % auf (s. Anhang, Abbildung 5.3 A–C). Hierbei wies die Stuhlprobe in Kanal 1 und 2 nach Blockieren mit MP die geringste AF bei gleichzeitig höchstem Signal auf (s. Anhang, Abbildung 5.3 A, B). Für den sFIDA-Messwert zeigte allerdings die Stuhlprobe nach Blockieren mit BS die geringste AF mit einem gleichzeitig hohen Signal (s. Anhang, Abbildung 5.3 C).



**Abbildung 3.7 – Vergleich von MP und BSA als blockierende Reagenzien jeweils für eine 1:400 und 1:600 Verdünnung der Stuhlproben.**

Eine 1:600 Verdünnung der Stuhlproben wies, vor allem in Kanal 2 (B) und für den sFIDA-Messwert (C), höhere Pixel-Werte bzw. sFIDA-Messwerte für die Patientenstuhlproben auf als eine 1:400 Verdünnung, was auch zu einem höheren PKV führte. Nur in Kanal 1 waren die Pixel-Werte und somit das PKV 1,1-fach niedriger für die 1:600 verdünnten Stuhlproben im Vergleich zu den 1:400 verdünnten Stuhlproben. Wurden die blockierenden Reagenzien MP und BSA verglichen, so wies Blockieren mit MP meist ein höheres Signal für die Stuhlproben auf als Blockieren mit BSA. Da dies auch für die Kontrollen galt, war das PKV allerdings nur im Kanal 1 der 1:600 verdünnten Stuhlproben höher. Die Messung erfolgte am TIRFM in 100x Vergrößerung. Grenzwert: 0,1 %.

**Tabelle 3.6 – Vergleich des PKV für eine 1:400 und 1:600 Verdünnung der Stuhlproben mit BSA oder MP als blockierendes Reagenz**

Blockieren	0,5 % BSA			1 % MP		
	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert
Differenz Signal zu AF						
Mittelwert Patienten 1:400	1775,2	3566,2	30,8	2159,0	2605,0	34,9
Mittelwert Kontrollen 1:400	1103,0	3810,3	31,0	1463,5	3292,1	44,4
PKV 1:400	1,6	0,9	1,0	1,5	0,8	0,8
Mittelwert Patienten 1:600	1561,5	5431,4	33,9	2196,3	4172,9	50,4
Mittelwert Kontrollen 1:600	1088,3	3134,3	19,0	1292,5	2701,7	45,1
PKV 1:600	1,4	<b>1,7</b>	<b>1,8</b>	<b>1,7</b>	1,5	1,1

AF: Autofluoreszenz; BSA: bovines Serumalbumin; MP: Milchpulver; PKV: Proben-Kontroll-Verhältnis

In Tabelle 5.7 im Anhang ist die Differenz zwischen Signal und AF aufgeführt, wobei Blockieren mit MP für beide Einzelkanäle im Vergleich zur Referenz eine größere Differenz der Pixel-Werte zur AF aufwies. Für den sFIDA-Messwert wies Blockieren mit BS die größte Differenz im Vergleich zur Referenz auf, allerdings war für BS auch das Signal im Vergleich zu den anderen blockierenden Reagenzien sehr gering.

Aufgrund der Ergebnisse und unter Berücksichtigung der AF wurde für die folgenden Versuche MP als blockierendes Reagenz verwendet und die Stuhlproben 1:600 verdünnt. Durch die hohen Verdünnungen war nur noch eine sehr geringe AF messbar, die Signale der Stuhlproben waren allerdings ebenfalls sehr gering, vor allem für den sFIDA-Messwert.

### 3.2.3 Anpassung der Inkubationszeit des Blockierens und des Blockierungspuffers

Nach der Auswahl von MP als blockierendes Reagenz, das zu einem hohen Signal der Stuhlproben bei geringem Hintergrundsignal und gleichzeitig geringer AF führte, wurde in einem Vorversuch die optimale Konzentration von MP getestet (Daten nicht gezeigt). Dies ergab, dass Blockieren mit 0,5% MP im Vergleich zu den zuvor verwendeten 1% zu gleichen Ergebnissen führte, weshalb die geringere Konzentration gewählt wurde. Anschließend wurden eine Verlängerung der Inkubationszeit des blockierenden Reagenz und der Blockierungspuffer, in dem das MP gelöst wurde, getestet (Exp. 7). Das Blockieren wurde entweder bei 4 °C ü. N. oder bei RT für 3 h durchgeführt statt wie bisher bei RT für 1,5 h. Wenn bei 4 °C ü. N. blockiert wurde, wurde der Fänger-AK bei RT für 6 h inkubiert. Als Blockierungspuffer wurden PBS-PC, NaHCO<sub>3</sub>-PC und als Referenz TBS-PC getestet. Dazu wurden 1:600 verdünnte Stuhlproben von jeweils drei Kontrollen und PD-Patienten verwendet und eine BC mitgeführt, damit die Bedingung mit einem

hohen SRV bestimmt werden konnte. Das SRV wurde berechnet, in dem das Signal der Stuhlproben durch das Signal der BC dividiert wurde. Der Einfluss der AF wurde für drei Stuhlproben ebenfalls mit getestet und das SRV äquivalent zu der Bedingung mit Detektions-AK berechnet. Für die Auswertung wurde ein manueller Graustufenwert von 5000 für beide Kanäle angewendet.

Um die Bedingung mit dem höchsten Signal in Abhängigkeit eines geringen Hintergrundsignals zu bestimmen wurde das SRV berechnet und graphisch dargestellt. Für die Inkubation des blockierenden Reagenzes bei 4 °C ü. N. wies der Blockierungspuffer TBS-PC in Kanal 1 für alle Stuhlproben mit einem durchschnittlichen SRV von 1,95 ein um 40 % höheres SRV auf als die anderen Blockierungspuffer (s. Abbildung 3.8 A). In Kanal 2 führte die Verwendung von PBS-PC als Blockierungspuffer zu einer durchschnittlichen Erhöhung des SRV um 68 % im Vergleich zu den anderen Blockierungspuffern (s. Abbildung 3.8 B). Für den sFIDA-Messwert zeigte erneut TBS-PC ein deutlich höheres SRV mit einer durchschnittlich 69-fachen Erhöhung (s. Abbildung 3.8 C).

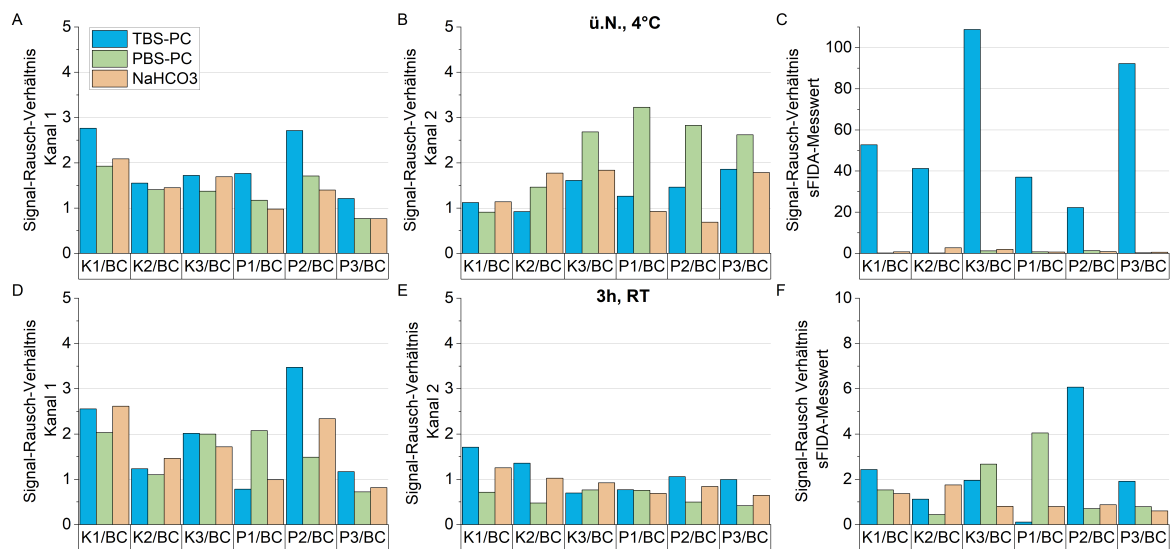
Das SRV nach Blockieren bei RT für 3 h unterschied sich abhängig von der Stuhlprobe welcher Blockierungspuffer das höchste SRV aufwies (s. Abbildung 3.8 D–F). In Kanal 1 ergab Blockieren mit TBS-PC Blockierungspuffer für drei Stuhlproben das höchste SRV, für die anderen Stuhlproben entweder NaHCO<sub>3</sub>-PC oder PBS-PC. Im Durchschnitt wies aber Blockieren mit TBS-PC als Blockierungspuffer ein 17 % höheres SRV auf. In Kanal 2 zeigte Blockieren mit TBS-PC als Blockierungspuffer ein durchschnittlich 53 % höheres SRV (s. Abbildung 3.8 E). Für den FIDA-Messwert zeigte ebenfalls TBS-PC durchschnittlich ein höheres SRV.

Neben dem SRV für das Signal wurde zusätzlich das SRV für die AF bestimmt (s. Tabelle 3.7). Hier sollte das SRV möglichst niedrig sein, da die AF sich nicht von der BC unterscheiden sollte. Insgesamt wies Blockieren bei RT für 3 h ein geringeres SRV für die Stuhlproben auf als Blockieren ü. N. bei 4 °C. Dabei zeigte Blockieren mit MP in TBS-PC bei der Inkubation bei RT für 3 h mit einem durchschnittlichen SRV von 1,83 für Kanal 1, von 1,0 für Kanal 2 und von 0,44 für den sFIDA-Messwert insgesamt das geringste SRV.

Im Gesamten betrachtet waren die Unterschiede zwischen den verschiedenen Blockierungspuffern und auch den Inkubationszeiten sehr gering. Für die folgenden Versuche wurde mit 0,5 % MP in TBS-PC bei RT für 3 h geblockt, da TBS-PC als Puffer durchschnittlich zu den höchsten SRV für beide Inkubationsbedingungen führte und eine Inkubation für 3 h bei RT zu den geringsten SRV der AF.

#### **3.2.4 Vergleich verschiedener Fänger-AK**

Zur weiteren Reduzierung der AF und Steigerung des Signals für die Patientenstuhlproben und somit des PKV wurden in Exp. 8 der EP1536Y-, 4B12-, 5G4- und 4D6-AK als Fänger-AK getestet, wobei der bisher verwendete Syn211-AK als Referenz diente. Als Detektions-AK wurden weiter-



**Abbildung 3.8 – Vergleich des SRV nach Blockieren bei 4 °C ü. N. (A–C) und nach Blockieren bei RT für 3 h (D–F) mit jeweils 0,5 % MP, welches in den Puffern TBS-PC, PBS-PC oder NaHCO<sub>3</sub>-PC gelöst wurde.**

(A–C) Eine Inkubation mit 0,5% MP in TBS-PC bei 4 °C ü. N. wies vor allem für den sFIDA-Messwert das höchste SRV im Vergleich zu PBS-PC oder NaHCO<sub>3</sub>-PC als Blockierungspuffer auf (C). (D–F) Eine Inkubation bei RT für 3 h zeigte ebenfalls ein höheres SRV für TBS-PC als Blockierungspuffer. Die Messung erfolgte am TIRFM bei 100x Vergrößerung. Manueller Grenzwert: 5000 (Kanal 1 und 2).

hin Syn211-CF633 und Syn211-CF405S verwendet. Dazu wurden 1:600 verdünnte Stuhlproben zweier Kontrollen und PD-Patienten sowie eine BC mitgeführt. Der Grenzwert von 0,01 % der BC wurde für die Auswertung angewendet.

In Kanal 1 wiesen nur die Pixel-Werte der hohen Stuhlproben Unterschiede zwischen den Fänger-AK auf (s. Abbildung 3.9 A). Das Signal der durch die verschiedenen Fänger-AK gebundenen Stuhlproben unterschied sich nur für die Stuhlprobe K2 deutlich. Hier zeigten der Syn211-AK und der 4B12-AK den höchsten Pixel-Wert, wobei der 4B12-AK als Fänger-AK zu einem doppelt so hohen Pixel-Wert führte wie der Syn211-AK. Für die Patientenstuhlproben war der Pixel-Wert für den 5G4- und 4D6-AK als Fänger-AK leicht erhöht. Die AF war für alle Stuhlproben sehr niedrig und unterschied sich nicht für die verschiedenen Fänger-AK (s. Abbildung 3.9 A).

Die Pixel-Werte in Kanal 2 waren deutlich geringer als in Kanal 1. Hier wies der 4B12-AK einen 58% höheren Pixel-Wert im Vergleich zur Referenz für die zwei Patientenstuhlproben auf. Für die Kontrollstuhlproben zeigte ebenfalls der 4B12-AK die höchsten Pixel-Werte. Die AF war in Kanal 2 ebenso niedrig wie in Kanal 1 (s. Abbildung 3.9 B).

Für die Patientenstuhlproben zeigte der Syn211-AK als Fänger-AK die höchsten sFIDA-Messwerte. Die sFIDA-Messwerte unterschieden sich für die Stuhlproben der Kontrollen kaum voneinander. Für alle Fänger-AK, bis auf den Syn211-AK, war die AF meist höher als der sFIDA-Messwerte (s. Abbildung 3.9 C). Da die Standardabweichungen allerdings sehr groß waren, war es wahrschein-

### 3 ERGEBNISSE

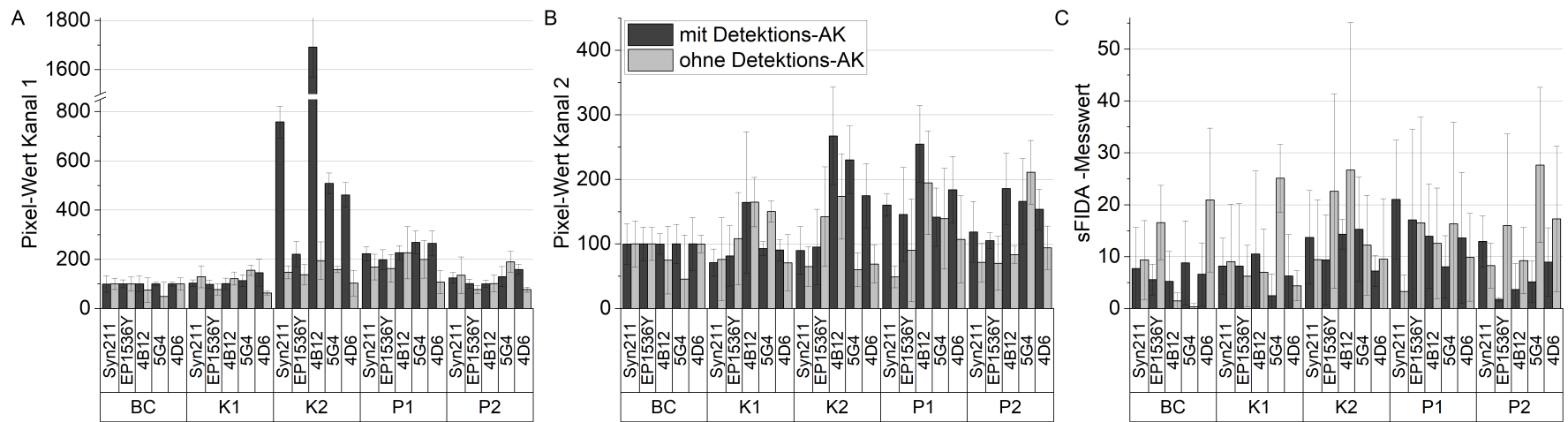
**Tabelle 3.7 – SRV der AF von drei Stuhlproben für die verschiedenen Blockierungspuffer und Inkubationszeiten für das Blockieren mit 0,5 % MP**

Zeit		ü. N., 4 °C			3 h, RT		
Puffer	Probe	TBS-PC	PBS-PC	NaHCO <sub>3</sub> -PC	TBS-PC	PBS-PC	NaHCO <sub>3</sub> -PC
Kanal 1	K1/BC	1,75	2,40	<b>1,47</b>	1,91	1,70	1,49
	K2/BC	1,29	1,21	0,70	<b>0,49</b>	0,76	1,09
	P1/BC	3,05	5,44	4,96	3,09	<b>2,99</b>	7,31
Kanal 2	K1/BC	1,20	<b>0,47</b>	0,98	1,35	1,50	0,99
	K2/BC	1,42	0,93	<b>0,58</b>	0,79	1,54	1,06
	P1/BC	1,40	2,02	2,03	0,86	<b>0,64</b>	1,29
sFIDA-Messwert	K1/BC	1,75	2,13	1,43	0,64	0,72	<b>0,35</b>
	K2/BC	4,94	2,21	0,17	<b>0,09</b>	0,82	0,42
	P1/BC	1,92	3,37	3,19	0,59	<b>0,33</b>	1,82

lich, dass nicht detektierte Artefakte zu den höheren sFIDA-Messwerten führte. Die Signale der BC unterschieden sich nicht, ebenso die AF. Die Pixel-Werte in den Einzelkanälen und vor allem der sFIDA-Messwert waren allerdings sehr niedrig.

Insgesamt wies der Syn211-AK mit einem PKV von 1,3 das höchste PKV in Kanal 2 und mit einem PKV von 0,16 das höchste für den sFIDA-Messwert auf. Auffällig war, dass der Pixel-Wert bzw. der sFIDA-Messwert der Kontrollstuhlproben in Kanal 1 und für den sFIDA-Messwert aller Fänger-AK höher war als der, der Patientenstuhlproben (s. Tabelle 3.8). Dies lag sowohl an den ausgewählten Patienten- und Kontrollstuhlproben, bei denen eine Kontrollstuhlprobe hohes Signal aber die Patientenstuhlproben nur geringes Signal lieferten, als auch an der geringen Anzahl an Proben.

Da die AF für den Syn211-AK ebenfalls immer geringere Signale im Vergleich zu den Pixel-Werten bzw. sFIDA-Messwerten lieferte, wurde weiterhin der Syn211-AK als Fänger-AK verwendet.



**Abbildung 3.9 – Die Antikörper Syn211, EP1536Y, 4B12, 5G4, 4D6 und Syn211 wurden als Fänger-AK mit und ohne Detektions-AK getestet.**

Die Messung der Stuhlproben mit verschiedenen Fänger-AK zeigten kaum Unterschiede, nur für die Kontrollstuhlprobe K2, welche einen höheren Pixel-Wert in Kanal 1 aufwies, waren deutliche Unterschiede erkennbar. Für die Patientenstuhlproben war der Pixel-Wert für den Syn211-AK oder auch den 5G4-AK am höchsten. In Kanal 2 (B) und für den sFIDA-Messwert (C) war das Signal sehr gering. Die AF war in Kanal 1 und 2 sowie dem sFIDA-Messwert auch sehr gering. Aufgrund des ebenfalls geringen Pixel-Wert bzw. sFIDA-Messwert war die Differenz allerdings kleiner als in Kanal 1. Alle Fänger-AK wurden mit einer Konzentration von 7,5 µg/mL eingesetzt. Die Messung erfolgte am TIRFM bei 100x Vergrößerung. Grenzwert: 0,01 %.

**Tabelle 3.8 – PKV für die eingesetzten Fänger-AK**

Fänger-AK	Syn211-AK			EP1536Y-AK			4B12-AK			5G4-AK			4D6-AK		
	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert
MW P	152,9	130,9	16,1	137,9	120,7	8,0	142,7	211,1	7,3	171,5	168,4	8,4	191,3	161,5	10,3
MW K	366,9	100,9	16,5	148,2	115,8	8,3	660,0	214,7	16,1	261,9	167,3	7,3	282,0	140,7	7,9
PKV	0,4	<b>1,3</b>	1,0	<b>0,9</b>	1,0	1,0	0,2	1,0	0,5	0,7	1,0	1,2	0,7	1,1	<b>1,3</b>

MW P: Mittelwert Patienten; MW K: Mittelwert Kontrollen; PKV: Proben-Kontroll-Verhältnis

### 3.2.5 Vergleich des Stuhl-Extraktionspuffers

Der zu Beginn verwendete Extraktionspuffer EliA-Extraktionspuffer wurde mit 1 % BSA in TBS-PC als Extraktionspuffer verglichen, um den Einfluss des Extraktionspuffers auf die AF zu testen und gleichzeitig eine Signalsteigerung für die Patientenstuhlproben zu erreichen (Exp. 9). Hierfür wurden jeweils drei Kontroll- und PD-Patientenstuhlproben verwendet sowie eine BC der Extraktionspuffer mitgeführt. Für die Auswertung wurde ein manueller Grenzwert von 5000 für Kanal 1 und 7000 für Kanal 2 angewendet.

Der Pixel-Wert in Kanal 1 war für alle Patientenstuhlproben außer P3 etwas geringer für Stuhlproben, die mit EliA-Extraktionspuffer im Vergleich zu solchen, die mit 1 % BSA in TBS-PC extrahiert wurden, allerdings war der Pixel-Wert auch für alle Kontrollstuhlproben niedriger, die mit EliA-Extraktionspuffer extrahiert wurden (s. Abbildung 3.10 A). Dies führte zu einem 1,2-fach geringeren Pixel-Wert für die Patientenstuhlproben und einem 1,3-fach geringeren Pixel-Wert für die Kontrollstuhlproben, die mit EliA-Extraktionspuffer extrahiert wurden. Die mit EliA-Extraktionspuffer extrahierte Stuhlproben zeigten durchschnittlich eine 1,9-fach geringere AF im Vergleich zu Stuhlproben die mit 1 % BSA in TBS-PC extrahiert wurden. Dadurch war die Differenz der Stuhlproben, die mit 1 % BSA in TBS-PC extrahiert wurden, für drei Stuhlproben größer (s. Tabelle 3.9).

Der Pixel-Wert in Kanal 2 und der sFIDA-Messwert waren im Durchschnitt für die mit EliA-Extraktionspuffer extrahierten Stuhlproben dagegen höher oder gleich hoch. Für die Pixel-Werte in Kanal 2 war das Signal für Stuhlproben, die mit EliA-Extraktionspuffer extrahiert wurden, dadurch um 19 % für die Patientenstuhlproben und um 13 % für die Kontrollstuhlproben erhöht (s. Abbildung 3.10 B, C). Für die sFIDA-Messwerte zeigte sich eine Erhöhung um 31 % für Stuhlproben der Patienten und für Stuhlproben der Kontrollen gab es keinen Unterschied (s. Abbildung 3.10 C). Auch war die AF für mit EliA-Extraktionspuffer extrahierte Stuhlproben für alle bis auf einen Patienten deutlich geringer als für Stuhlproben, die mit 1 % BSA in TBS-PC extrahiert wurden.

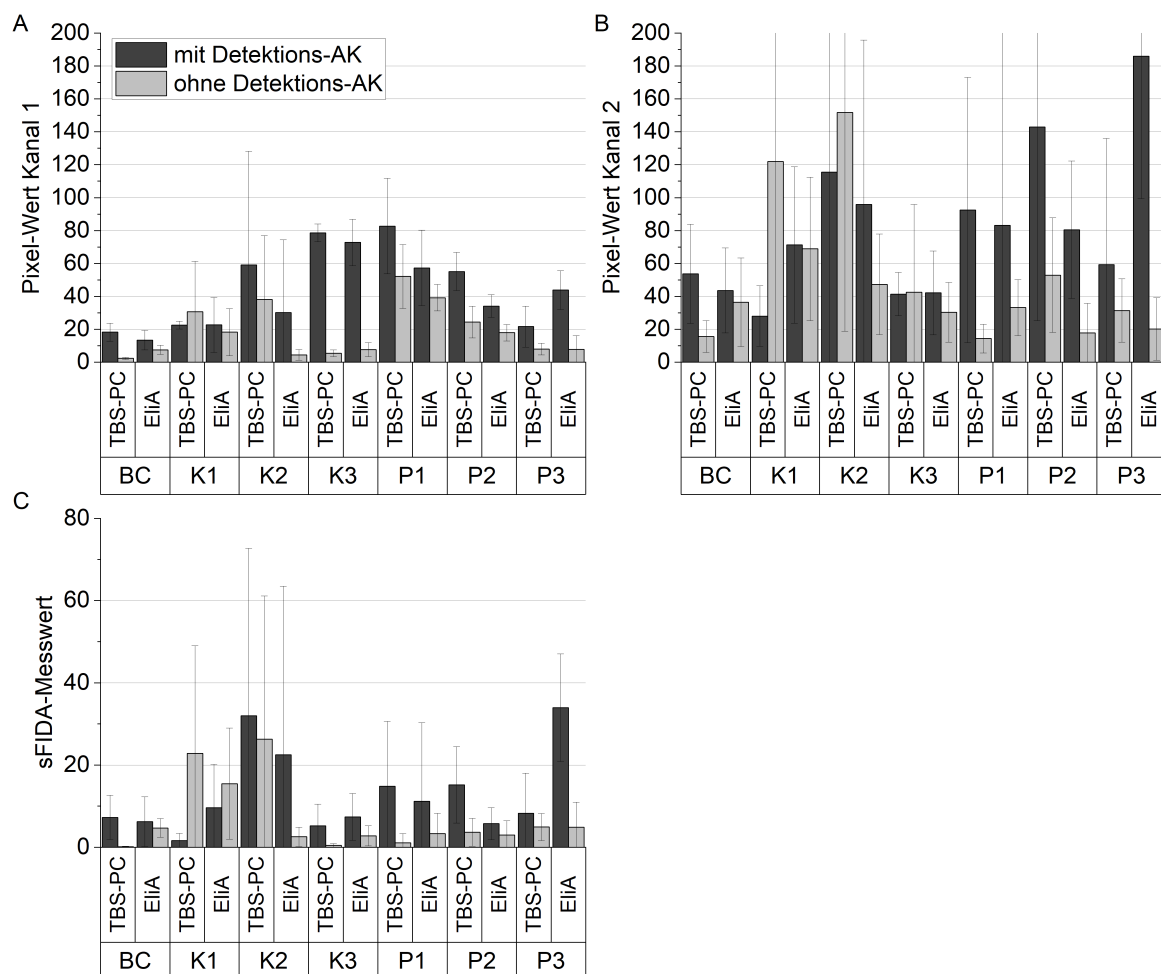
Dies zeigte sich in einer Reduktion der AF von 30 % in Kanal 1 für die mit EliA-Extraktionspuffer extrahierten Patientenstuhlproben. Für die Kontrollstuhlproben war die AF um 53 % in Kanal 2 bzw. um 59 % für den sFIDA-Messwert reduziert. Somit wiesen die Stuhlproben, die mit EliA-Extraktionspuffer extrahiert wurden eine größere Differenz zwischen Signal und AF auf (s. Tabelle 3.9). Jedoch waren die Signale und die AF insgesamt sehr niedrig und waren vor allem in Kanal 2 und für den sFIDA-Messwert nicht oder nur geringfügig höher als die BC. Zudem war die Standardabweichung derjenigen Stuhlproben, deren Signal über dem der BC lag sehr hoch. Dies deutet darauf hin, dass nicht detektierte Artefakte zu dem höheren Signal geführt haben könnten.

Die BC beider Extraktionspuffer wiesen in den Einzelkanälen und für den sFIDA-Messwert gerin-



ge Signale auf, wobei der EliA-Extraktionspuffer eine Signalreduktion von 28% in Kanal 1, von 19% in Kanal 2 und von 14% für den sFIDA-Messwert im Vergleich zeigte. Die AF war für 1% BSA in TBS-PC verglichen mit dem EliA-Extraktionspuffer um durchschnittlich 76% reduziert.

Um eine Variation der Bindung der  $\alpha$ -Syn-Aggregate an den Fänger-AK aufgrund von pH-Wert-Unterschieden auszuschließen, wurde der pH-Wert für den EliA-Extraktionspuffer und 1% BSA in TBS-PC mittels pH-Teststreifen bestimmt. Der pH-Wert der Stuhlextrakte lag für beide Extraktionspuffer im neutralen Bereich bei einem pH-Wert von ca. 7,5. Somit konnte ein Einfluss des pH-Wertes auf die Bindung ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.10 – Vergleich des EliA-Extraktionspuffers mit 1% BSA in TBS-PC als Stuhlextraktionspuffer jeweils mit und ohne Detektions-AK.**

Der EliA-Extraktionspuffer wies im Vergleich zu 1% BSA in TBS-PC als Extraktionspuffer meist ein geringeres Signal für die Kontrollen auf, für die Patienten war das Ergebnis nicht einheitlich. Die Signale und auch die AF waren insgesamt sehr niedrig und vor allem in Kanal 2 und für den sFIDA-Messwert waren die Standardabweichungen für Stuhlproben deren Signal über der BC lag sehr groß. Dies lässt keine eindeutige Unterscheidung der Versuchsbedingungen zu. Die Messung erfolgte am TIRFM bei 100x Vergrößerung.

Das SRV der AF war für den EliA-Extraktionspuffer für alle Stuhlproben sowohl in den Einzel-

kanälen als auch für den sFIDA-Messwert niedriger (s. Anhang, Tabelle 5.8). Zudem wiesen die Stuhlproben ein höheres PKV für den EliA-Extraktionspuffer auf (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Gründen wurde für alle weiteren Versuche anstatt des bisher verwendeten Extraktionspuffers der EliA-Extraktionspuffer verwendet. Allerdings waren aufgrund der niedrigen Signale die Unterschiede zwischen den Versuchsbedingungen minimal.

**Tabelle 3.9 – Differenz des Signals und der AF für den EliA-Extraktionspuffer und 1 % BSA in TBS-PC als Extraktionspuffer**

<b>Puffer</b>	<b>TBS-PC</b>	<b>EliA</b>	<b>TBS-PC</b>	<b>EliA</b>	<b>TBS-PC</b>	<b>EliA</b>
<b>Probe</b>	Kanal 1		Kanal 2		sFIDA-Messwert	
BC	<b>15,9</b>	5,8	<b>38,1</b>	7,2	<b>7,1</b>	1,5
K1	-8,1	<b>4,4</b>	-93,9	<b>2,4</b>	-21,2	<b>-5,8</b>
K2	21,0	<b>25,9</b>	-36,1	<b>48,6</b>	5,7	<b>20,0</b>
K3	<b>73,2</b>	65,2	-1,1	<b>11,8</b>	<b>4,7</b>	4,6
P1	<b>30,6</b>	18,1	<b>78,1</b>	50,1	<b>13,8</b>	7,9
P2	<b>30,7</b>	16,2	<b>90,1</b>	62,7	<b>11,5</b>	2,7
P3	13,7	<b>36,1</b>	27,9	<b>165,8</b>	3,4	<b>29,1</b>

#### 3.2.6 Anpassung der Probenverdünnung

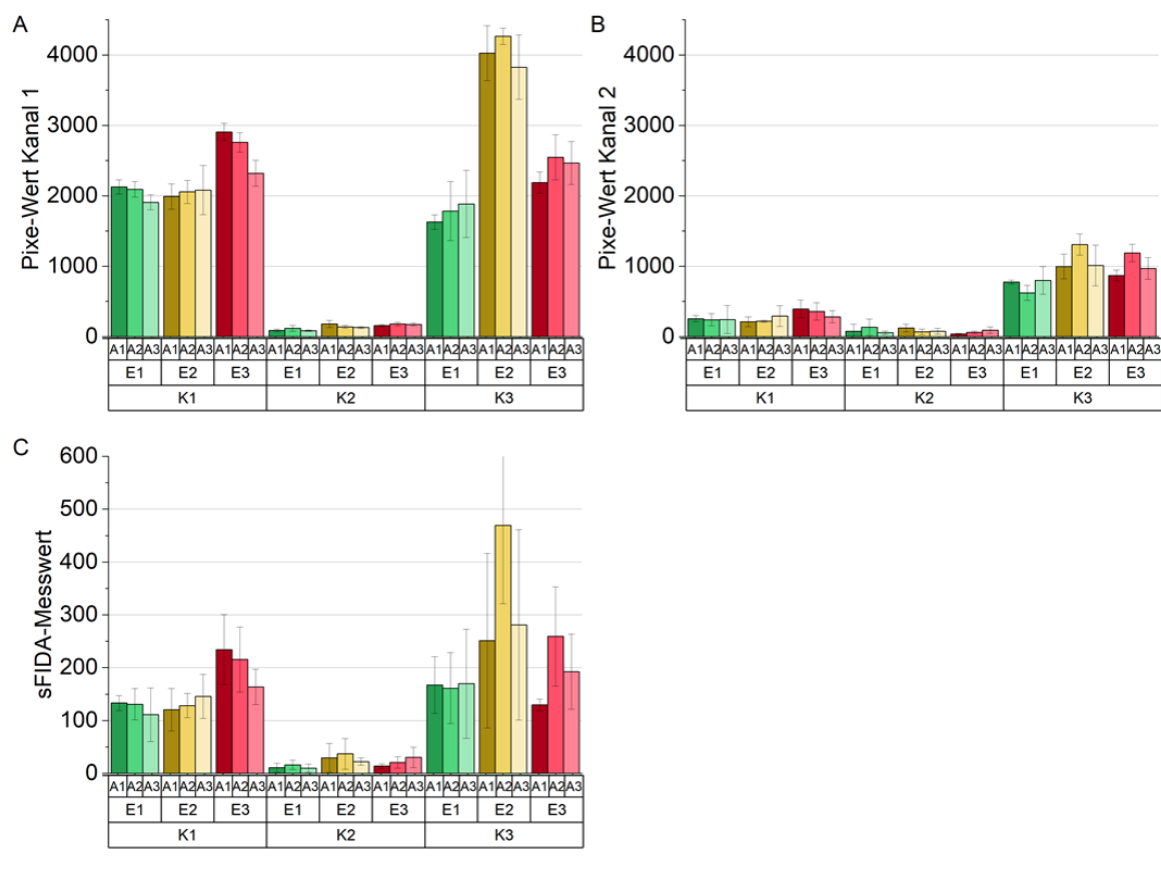
Aufgrund der AF wurden die Stuhlproben für die vorherigen Versuche mit einer 1:600 Verdünnung sehr hoch verdünnt. Allerdings waren die Signale deswegen sehr niedrig und es waren meist nur geringe Unterschiede mit hohen Standardabweichungen zwischen den Versuchsbedingungen zu erkennen. Teilweise lagen die Signale der Stuhlproben auf Höhe der BC, weshalb niedrigere Verdünnungen und auch unverdünnte Stuhlproben getestet wurden, auch wenn dadurch die AF anstieg. Durch die bereits vorgenommenen Verbesserungen der Assaybedingungen war auch für niedrigere Verdünnungen die AF deutlich niedriger als das Signal, was zu Beginn der Assayvalidierung nicht der Fall war (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde im Folgenden mit einer 1:5 Verdünnung der Stuhlproben weitergearbeitet.

#### 3.2.7 Vergleich von frischen und gefrorenen Stuhlproben und Reproduzierbarkeit der Stuhlextraktion

Weiterführend wurden für die Prozessentwicklung die Stuhlproben entweder frisch verwendet oder vor der Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren (Exp. 10). Zusätzlich wurde mit dem neuen Extraktionspuffer und den aktualisierten Assaybedingungen die Reproduzierbarkeit der Stuhlextraktion und die Präzision des Assays zur Assayvalidierung erneut getestet sowie die AF gemessen. Dazu wurden jeweils drei Aliquots von Stuhlproben, die jeweils dreimal extrahiert wurden, getestet (s. Abbildung 2.1). Es wurden Extrakte von jeweils einer hohen, mittleren und niedrigen Kontrollstuhlprobe hergestellt und die Ergebnisse anhand eines manuellen Grenzwertes von

5000 für beide Einzelkanäle ausgewertet.

Zwischen den Extrakten gab es je nach Stuhlprobe größere Schwankungen (s. Abbildung 3.11 A–C). Für K2 z. B. war Extrakt 3 signifikant unterschiedlich zu Extrakt 1 und 2 ( $p < 0,01$ , für exakte p-Werte für alle Kontrollstuhlproben s. Anhang, Tabelle 5.9). Die Aliquots eines Extraktes unterschieden sich für alle Extrakte aller Stuhlproben jedoch nicht signifikant voneinander ( $p > 0,05$ ). Es war auffällig, dass die Pixel-Werte in Kanal 2 (Abbildung 3.11 B) bis zu 9-fach geringer waren als die Pixel-Werte in Kanal 1 (Abbildung 3.11 A).



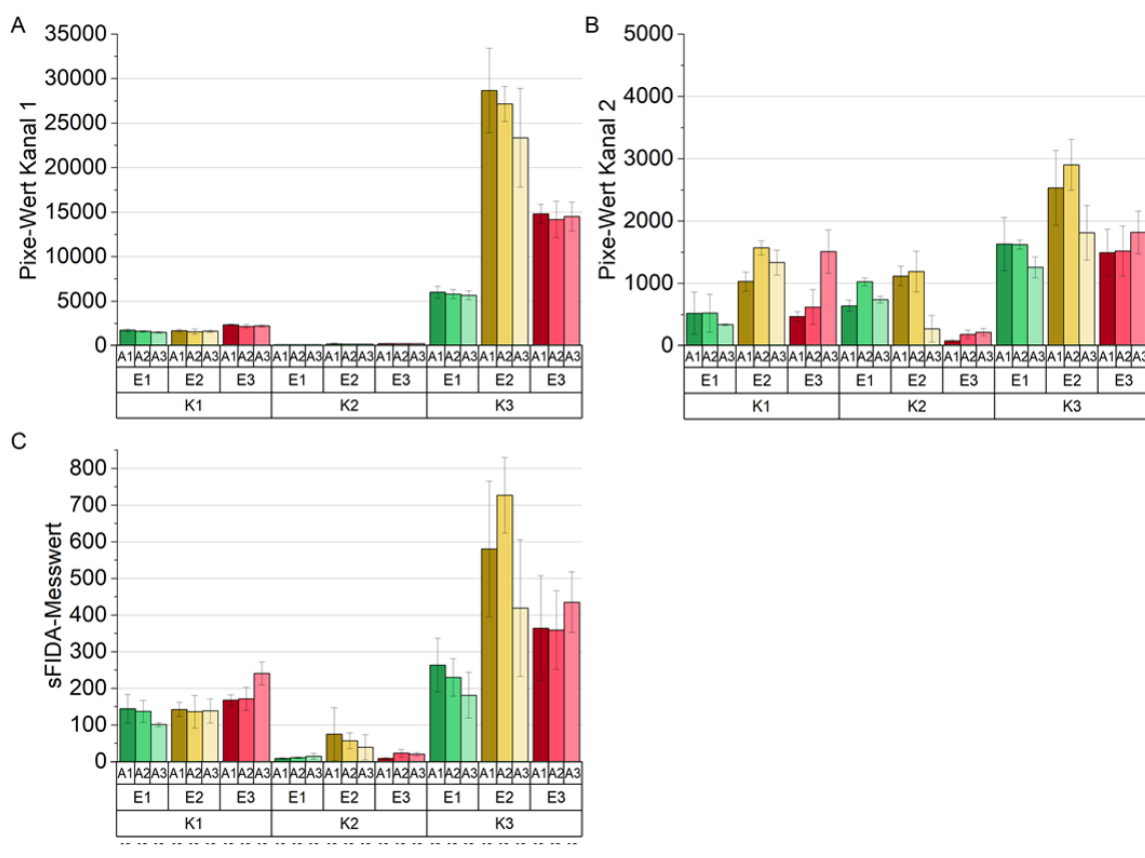
**Abbildung 3.11 – Es wurden jeweils drei Extrakte von drei Kontrollstuhlproben und von diesen jeweils drei Aliquots hergestellt und die frischen Stuhlproben im sFIDA-Assay gemessen.**

Die einzelnen Aliquots eines Extraktes unterschieden sich nicht signifikant voneinander, allerdings gab es signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Extrakten einer Kontrollstuhlprobe (A–C). Die Extrakte sind in den Farben grün, gelb und rot dargestellt, die verschiedenen Aliquots eines Extraktes in verschiedenen Abstufungen dieser Farben. Gemessen wurde am TIRFM bei 100x Vergrößerung. Manueller Grenzwert: 5000 (Kanal 1 und 2).

Somit lieferten Mehrfachmessungen eines Extraktes reproduzierbare Ergebnisse, die Extraktion selber unterlag Schwankungen, da nicht immer die exakt gleiche Menge an Stuhl aufgenommen werden konnte und durch geringe Unterschiede in der Menge des Extraktionspuffers Unterschiede zwischen Extrakten auftraten. Abweichungen konnten ebenfalls durch die 1:5 Verdünnung entstehen. Trotzdem war das Ergebnis der Mehrfachmessung zwischen mehreren Extrakten re-

### 3 ERGEBNISSE

produzierbar.



**Abbildung 3.12 – Messung der gleichen Extrakte wie in Abbildung 21, allerdings waren die Aliquots für eine Woche bei -80 °C eingefroren.**

Von 3 Kontrollstuhlproben wurden jeweils drei Extrakte hergestellt und von diesen drei Aliquots für eine Woche bei -80 °C eingefroren, um anschließend im sFIDA-Assay gemessen zu werden. Eine logarithmische Darstellung des Ergebnisses ist im Anhang in Abbildung 5.4 zur Übersicht über aller Aliquots eingefügt. Wie auch bei den frischen Proben unterschieden sich die einzelnen Aliquots eines Extraktes nicht signifikant voneinander, allerdings gab es Unterschiede zwischen den verschiedenen Extrakten einer Kontrollstuhlprobe (A–C). Die Extrakte sind in den Farben grün, gelb und rot dargestellt, die verschiedenen Aliquots eines Extraktes in verschiedenen Abstufungen dieser Farben. Gemessen wurde am TIRFM bei 100x Vergrößerung. Manueller Grenzwert: 5000 (Kanal 1 und 2).

Auch für die gefrorenen Proben waren die Signale der Aliquots eines Extraktes nicht signifikant unterschiedlich. Für die Extrakte einer Probe gab es allerdings auch bei den gefrorenen Proben signifikante Unterschiede. In Kanal 1 (s. Abbildung 3.12 A) waren die Unterschiede zwischen den mittleren Pixel-Werten der Extrakte größer als für die Kanal 1 und den sFIDA-Messwert. Die mittleren Pixel-Werte der Extrakte aller Stuhlproben wiesen signifikante Unterschiede in Kanal 1 auf (für exakte p-Werte für alle Kontrollstuhlproben s. Anhang, Tabelle 5.10). In Kanal 2 gab es dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Extrakten. Für den sFIDA-Messwert zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Extrakten. So war der mittlere sFIDA-Messwert für Extrakt 2 der K2 signifikant höher als für Extrakt 1 ( $p=0,038$ ) und Extrakt 3 ( $p=0,04$ ). Eine logarithmische Darstellung der Ergebnisse für die gefrorenen Proben ist im Anhang in Abbildung 5.4

zum Vergleich der Stuhlproben mit niedrigem Signal dargestellt.

Wurden frische und gefrorene Stuhlproben miteinander verglichen, fiel auf, dass die Pixel-Werte in den Kanälen 1 und 2 sowie für den sFIDA-Messwert für die gefrorenen Stuhlproben höher waren als für die frischen Stuhlproben. Vor allem unterschieden sich die Pixel-Werte in Kanal 2 mit einer teils 100-fachen Steigerung im Vergleich zu Kanal 1 deutlich. Außerdem waren die Unterschiede zwischen den Aliquots für die gefrorenen Proben geringer als für die frischen Proben; die Unterschiede zwischen den Extrakten waren wie bei den frischen Stuhlproben teilweise signifikant unterschiedlich. Die Präzision der Mehrfachmessung war für die gefrorenen Stuhlproben für den sFIDA-Messwert höher. Der CV%-Wert war für die mittelhohe (25 %) und hohe Stuhlprobe (44 %) niedriger im Vergleich zu der frisch gemessenen mittelhohen (28 %) und hohen Stuhlprobe (45 %). Für die niedrige Stuhlprobe war der CV%-Wert mit 45 % für die frische Stuhlprobe niedriger als für die gefrorene Stuhlprobe (83 %), allerdings führte bei niedrigen Signalen kleinste Schwankungen des Hintergrundsignals oder nicht-detektierte Artefakte zu einer starken Erhöhung des CV%-Wertes.

Zusätzlich wurde für die Replikate der drei Kontrollstuhlproben die AF mitgemessen, um zu testen, ob ein Einfrieren der Proben einen Einfluss auf diese hatte. Die Differenz zwischen Signal und AF war bei den zuvor gefrorenen Stuhlproben für den sFIDA-Messwert 1,5-fach größer als bei den frischen Stuhlproben. Die Differenz zwischen Signal und AF wurde beispielhaft für ein Aliquot aller drei Extrakte jeder Kontrolle in Tabelle 3.10 dargestellt.

**Tabelle 3.10 – Differenz zwischen Signal und AF für ein Aliquot der Extrakte**

Um den Einfluss der AF auf das Signal zwischen frischen und gefrorenen Proben darzustellen, wurde die Differenz zwischen Signal und AF berechnet. Die Differenz wurde beispielhaft für alle drei Kontrollen aller drei Extrakte und jeweils einem Aliquot aufgeführt.

Variante	frisch	gefroren	frisch	gefroren	frisch	gefroren
Probe	Kanal 1		Kanal 2		sFIDA-Messwert	
K1E1A2	<b>491,0</b>	234,9	-2,9	<b>470,1</b>	56,6	<b>109,8</b>
K1E2A2	237,7	<b>433,0</b>	84,3	<b>1406,2</b>	61,9	<b>104,5</b>
K1E3A2	735,3	<b>884,6</b>	225,8	<b>410,6</b>	<b>133,5</b>	118,9
K2E1A2	72,2	<b>96,1</b>	107,5	<b>978,1</b>	<b>8,8</b>	6,9
K2E2A2	43,0	<b>121,0</b>	14,1	<b>1034,4</b>	27,0	<b>45,0</b>
K2E3A2	95,9	<b>181,2</b>	45,8	<b>96,1</b>	<b>13,9</b>	10,4
K3E1A2	1624,9	<b>5687,1</b>	464,8	<b>1501,4</b>	120,1	<b>195,9</b>
K3E2A2	4123,0	<b>27078,9</b>	1271,8	<b>2796,4</b>	448,7	<b>694,9</b>
K3E3A2	2455,6	<b>14117,7</b>	1159,0	<b>1458,7</b>	244,1	<b>339,0</b>

A: Aliquot; E: Extrakt; K: Kontrollstuhlprobe

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde festgestellt, dass die Mehrfachmessung eines Extraktes reproduzierbare Ergebnisse lieferte. Zudem war ein Einfrieren der Proben von Vorteil, da nicht nur teilweise eine Signalsteigerung beobachtet werden konnte, sondern auch die AF reduziert wurde.

Zusätzlich bot ein Einfrieren der Proben den Vorteil, dass diese vor dem Versuch extrahiert werden konnten, was bei einer großen Anzahl an Proben eine einfachere Handhabung bedeutete.

### 3.3 Assayvalidierung am IN Cell Analyzer 6500HS-Mikroskop

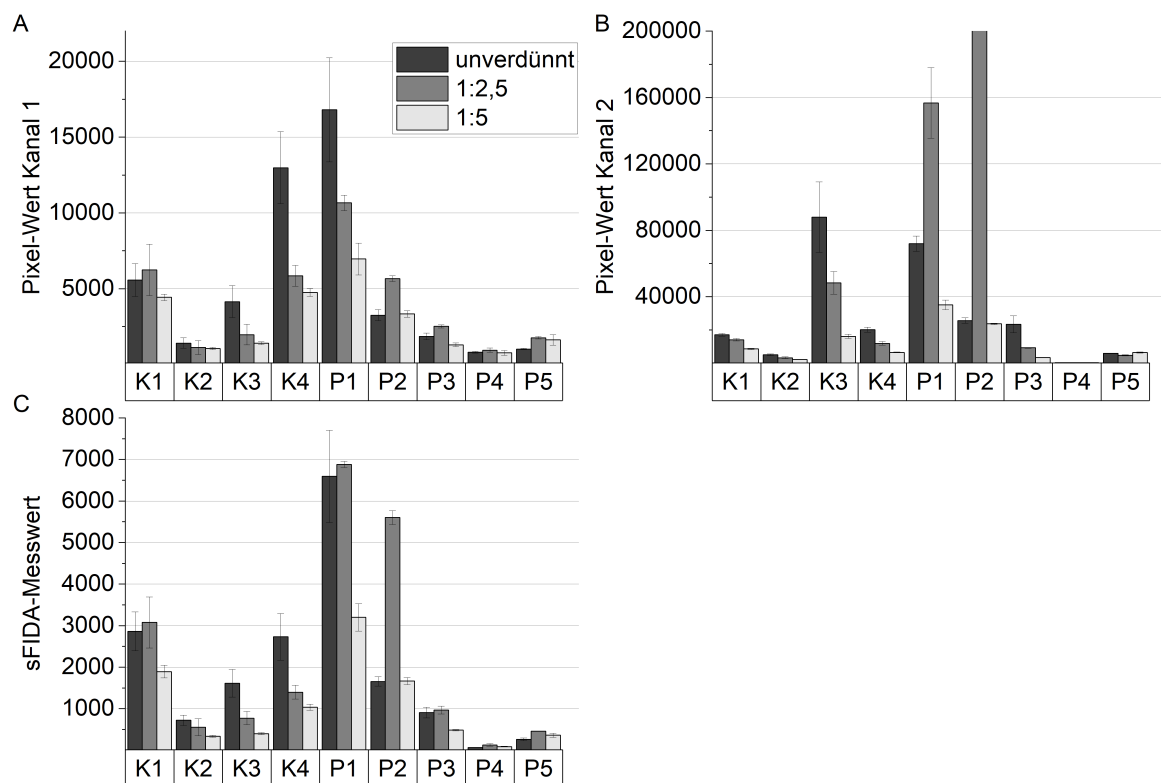
Das neue Mikroskop IN Cell Analyzer 6500HS wurde für die Messung der Proben im sFIDA getestet, da die Messzeit stark verkürzt war und der Fokus nicht mehr manuell eingestellt werden musste. Dazu wurden für einen Versuch die Ergebnisse des IN Cell Analyzer 6500HS und des TIRFM verglichen (Daten nicht gezeigt). Da mehr Signal im 2. Kanal gemessen wurde, wurde für alle weiteren Versuche der IN Cell Analyzer 6500HS verwendet. Die Signalerhöhung vor allem in Kanal 2 kann durch die höhere Eindringtiefe des IN Cell Analyzer 6500HS-Mikroskops in die Probe entstanden sein, da es sich hier um ein Konfokal-Mikroskop handelt (s. Kapitel 1.3.1).

#### 3.3.1 Vergleich von Stuhlverdünnungen

Zur möglichen Steigerung von Signal und somit auch einer Verbesserung des PKV wurden in Exp. 11 am IN Cell Analyzer 6500HS 1:5 und 1:2,5 Verdünnungen von Stuhlproben sowie unverdünnte Stuhlproben getestet, wobei die 1:5 verdünnten Stuhlproben als Referenz dienen. Zusätzlich wurde für alle Verdünnungen die AF erfasst, um auch hier eine möglichst große Differenz zwischen Signal und AF zu erhalten. Dazu wurden Stuhlproben von vier Kontrollen und fünf PD-Patienten verwendet. Ein manueller Grenzwert von 2000 für Kanal 1 und 1000 für Kanal 2 wurde für die Auswertung verwendet.

Der Pixel-Wert in Kanal 1 war für alle Kontrollstuhlproben und eine Patientenstuhlprobe (P3) für die unverdünnten Stuhlproben im Durchschnitt um das 1,6-Fache höher im Vergleich zu 1:2,5 verdünnten Stuhlproben und doppelt so hoch im Vergleich zur Referenz. Der Pixel-Wert der Stuhlproben nahm mit zunehmender Verdünnung ab (Abbildung 3.13 A). In Kanal 2 zeigten ebenfalls die unverdünnten Stuhlproben aller Kontrollen und eines Patienten (P3) den höchsten Pixel-Wert und eine Signalabnahme mit steigender Verdünnung, was für eine lineare Verdünnbarkeit der  $\alpha$ -Syn-Aggregate in Stuhlproben spricht. Zwei der 1:2,5 verdünnten Patientenstuhlproben zeigten allerdings deutlich höhere Pixel-Werte im Vergleich zu unverdünnten Stuhlproben mit einem doppelt so hohen Pixel-Wert für P1 und mit einer 146-fachen Erhöhung für P2. Allerdings wiesen diese Stuhlproben ebenfalls eine sehr hohe Standardabweichung auf und bei Betrachtung der Fluoreszenzbilder zeigte sich ein flächiges Signal, was zu der auffälligen Signalsteigerung beitrug (Bilder nicht gezeigt). Für die zwei Patientenstuhlproben mit den niedrigsten Pixel-Werten gab es keine Unterschiede zwischen den Verdünnungen, da die Konzentration von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten bereits im unverdünnten Stuhl unter der Detektionsgrenze lag (s. Abbildung 3.13 B).

Für den sFIDA-Messwert zeigte eine Kontrollstuhlprobe und alle Patientenstuhlproben den höchst-



**Abbildung 3.13 – Vergleich von unverdünnten, 1:2,5 und 1:5 mit 0,1 % BSA in TBS-PC und 0,05 % Tween20 verdünnten Stuhlproben.**

Unverdünnte Stuhlproben zeigten meist das höchste Signal, was mit zunehmender Verdünnung abnahm (A–C). Auffällig waren zwei Patientenstuhlproben (P1 und P2), bei denen eine 1:2,5 Verdünnung einen deutlich höheren Pixel-Wert, bedingt durch ein flächiges Signal, in Kanal 2 aufwies (B). Für die Proben, die nur ein geringes Signal aufwiesen, gab es keine Unterschiede zwischen den Stuhlverdünnungen. Gemessen wurde am IN Cell Analyzer 6500HS Mikroskop bei 40x Vergrößerung. Manueller Grenzwert: 2000 (Kanal 1) und 1000 (Kanal 2).

ten sFIDA-Messwert für die 1:2,5 verdünnten Stuhlproben bedingt durch das hohe Signal in Kanal 2 (Abbildung 3.13 C). Daher wies eine 1:2,5 Verdünnung von Stuhlproben in beiden Einzelkanälen und für den sFIDA-Messwert das höchste PKV auf, mit einem 1,3-fach höheren PKV für Kanal 1, einem 20-fach höheren PKV für Kanal 2 und einem 1,5-fach höheren PKV für den sFIDA-Messwert im Vergleich zur Referenz. Unverdünnte Stuhlproben wiesen dagegen immer das geringste PKV auf (Tabelle 3.11).

Zusätzlich wurde auch die Autofluoreszenz der Stuhlproben für die jeweilige Verdünnung verglichen (s. Abbildung 3.14). In Kanal 1 nahm die AF bei fast allen Stuhlproben mit zunehmender Verdünnung ab, was zu dem Rückschluss führt, dass Komponenten in der Stuhlmatrix die an  $\alpha$ -Syn-Aggregate gebunden waren, zu der AF führen könnten. Im Vergleich zum Signal war der Unterschied zur AF bei vier der 1:2,5 verdünnten Patientenstuhlproben und einer Kontrollstuhlprobe durchschnittlich doppelt so groß im Vergleich zu unverdünnten Stuhlproben. Für die restlichen Kontrollstuhlproben war die Differenz 2,3-fach größer für unverdünnte Proben (s. Abbildung 3.14 A, D, G). In Kanal 2 war die Differenz des Signals im Vergleich zur AF für die unverdünnten

**Tabelle 3.11 – Vergleich des PKV für alle Varianten mit unverdünnten, 1:2,5 und 1:5 verdünnten Stuhlproben**

Variante	unverdünnt			1:2,5 verdünnt			1:5 verdünnt		
	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert
Mittelwert Proben	25403	4743	1895	783039	4309	2807	13759	2794	1158
Mittelwert Kontrollen	32548	6025	1981	19394	3792	1449	8313	3120	915
PKV	0,8	0,8	1,0	<b>40,4</b>	<b>1,1</b>	<b>1,9</b>	1,7	0,9	1,3

PKV: Proben-Kontroll-Verhältnis

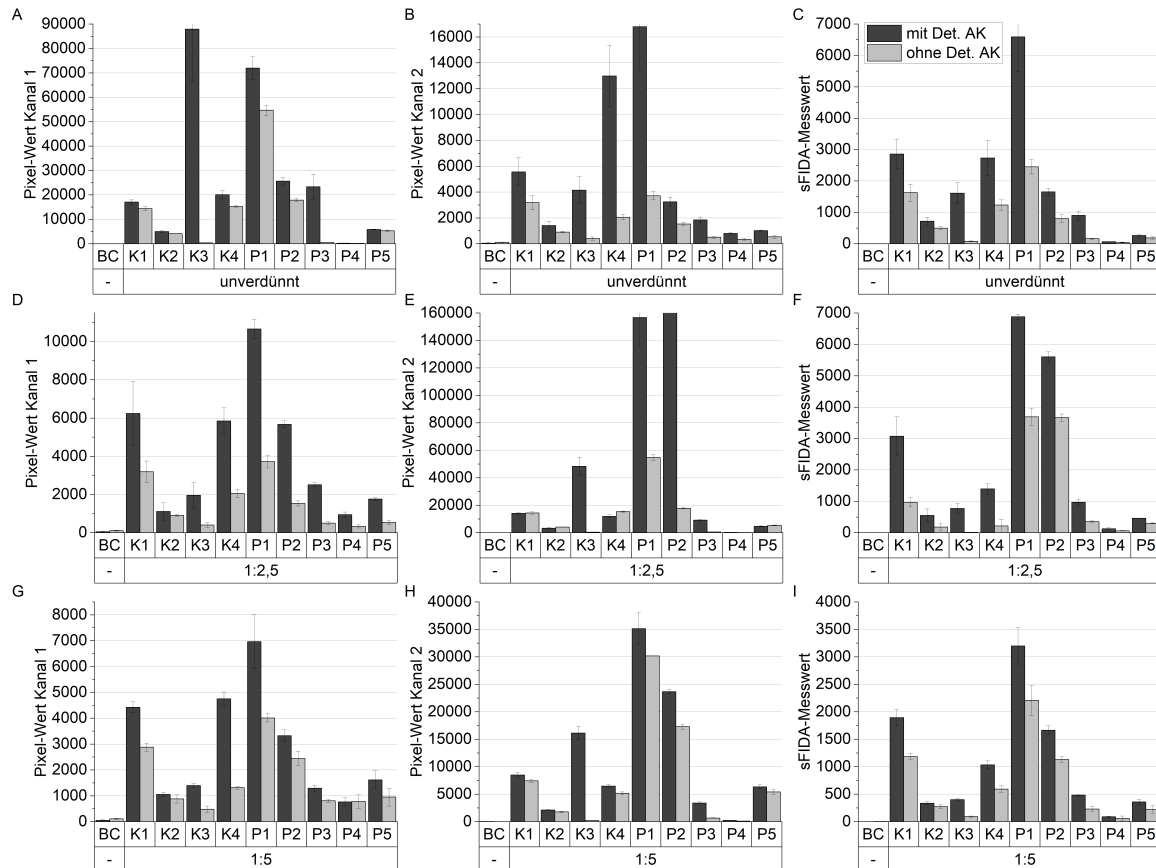
Stuhlproben außer für vier Patientenstuhlproben am höchsten. Dagegen wiesen vier Stuhlproben mit einer 1:2,5 Verdünnung eine höhere AF als Signal auf (s. Abbildung 3.14 B, E, H). Für den sFIDA-Messwert war die AF für fünf der 1:2,5 verdünnten Stuhlproben am niedrigsten und wies somit die größte Differenz zwischen Signal und AF auf. Unverdünnte Stuhlproben wiesen für vier Proben die niedrigste AF auf und bei den 1:5 verdünnten Stuhlproben war der Unterschied wieder am geringsten (Abbildung 3.14 C, F, I).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine weitere Probenverdünnung von 1:2,5 gewählt, da hier das größte PKV beobachtet werden konnte und die AF neben den unverdünnten Stuhlproben am niedrigsten war. Allerdings war bei manchen Patientenstuhlproben ein auffälliges flächiges Signal in Kanal 2 nur für die Verdünnungen sichtbar. Dies wurde in den nachfolgenden Versuchen daher weiterverfolgt.

### 3.3.2 Titration der Detektions-AK-Konzentration und Vergleich von Fluorophor-Kombinationen

Es wurde eine Titration des Detektions-AK durchgeführt, um die Konzentration mit dem höchsten SRV zu ermitteln (Exp. 12). Zusätzlich sollte die Konzentration der Detektionssonden ermittelt werden, bei der in etwa gleich hohe Signale der Aggregatkonzentrationen für beide Einzelkanäle gemessen wurden. Aufgrund des auffälligen Hintergrundes für manche Proben in Kanal 2 (CF405S) wurde zusätzlich der Syn211-AK als Detektionssonde mit dem CF488A-Fluorophor in Kombination mit dem CF633-Fluorophor getestet. Dazu wurden synthetische  $\alpha$ -Syn-Aggregate von 0 pM bis 8000 pM verwendet. Die Konzentration der ersten Detektionssonde (Syn211-CF633) wurde bei 0,625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  konstant gehalten und für die zweite Detektionssonde (Syn211-CF405S/Syn211-CF488A) Konzentrationen von 0,313  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0,625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und 1,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  eingesetzt. Eine Konzentration von 0,625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  für die Detektionssonden Syn211-CF633 und Syn211-CF405S diente dabei als Referenz. Für die Auswertung wurde ein Grenzwert von 0,01 % angewendet.





**Abbildung 3.14 – Vergleich der AF mit dem Signal unverdünnter, 1:2,5 und 1:5 verdünnter Stuhlproben.**

Vergleich der AF mit dem Signal für unverdünnte Stuhlproben (A–C), für 1:2,5 (D–F) und 1:5 in 0,1 % BSA in TBS-PC verdünnte Stuhlproben und 0,05 % Tween20 (G–I) zeigte, dass der Unterschied zwischen Signal und AF am größten für die unverdünnten und 1:2,5 verdünnten Stuhlproben war. Gemessen wurde am IN Cell Mikroskop bei 40x Vergrößerung. Manueller Grenzwert: 2000 (Kanal 1) und 1000 (Kanal 2).

In Kanal 1 (CF633) zeigte der Detektions-AK aus Syn211-CF633 und Syn211-CF405S einen durchschnittlich 1,2-fach höheren Pixel-Wert für die Konzentrationen von 0,625 µg/mL und 0,313 µg/mL und sogar einen 3-mal so hohen Pixel-Wert für die Konzentration von 1,25 µg/mL im Vergleich zu Syn211-CF633 und Syn211-CF488A (s. Abbildung 3.15 A). Die Konzentration von 0,313 µg/mL für den Detektions-AK aus Syn211-CF633 und Syn211-CF405S zeigte dabei den höchsten mittleren Pixel-Wert im Vergleich zu den anderen Konzentrationen.

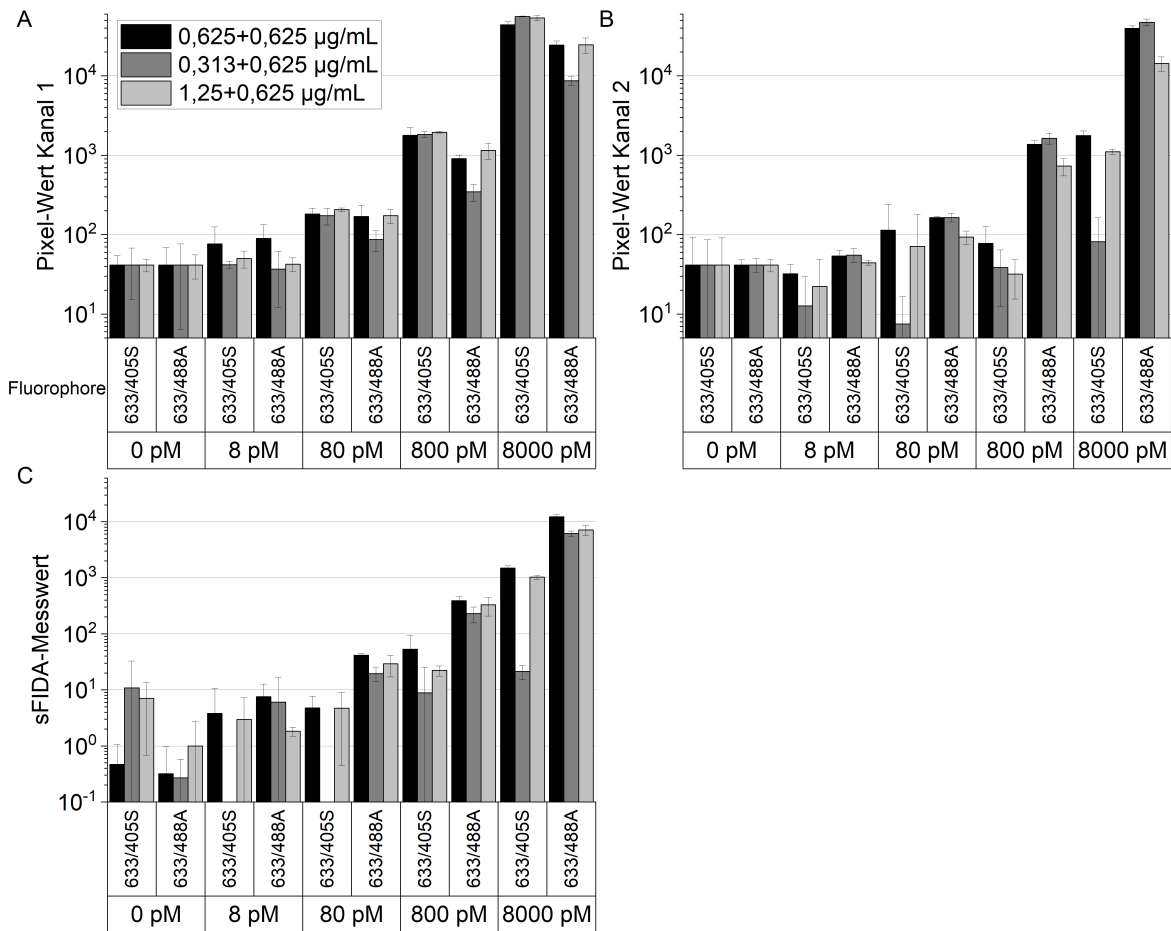
In Kanal 2 (CF405S/CF488A) zeigte der Detektions-AK aus Syn211-CF633 und Syn211-CF488A einen durchschnittlich 8,6-fach höheren Pixel-Wert über alle Konzentrationen im Vergleich zu Syn211-CF633 mit Syn211-CF405S. Die Konzentration von 1,25 µg/mL für den Detektions-AK aus Syn211-CF633 und Syn211-CF488A zeigte dabei den höchsten mittleren Pixel-Wert im Vergleich zu den anderen Konzentrationen (s. Abbildung 3.15 B).

Für den sFIDA-Messwert hatte der Detektions-AK aus Syn211-CF633 und Syn211-CF488A für alle Konzentrationen erneut durchschnittlich einen 8-mal höheren sFIDA-Messwert im Vergleich zu Syn211-CF633 und Syn211-CF405S. Hier wies die Konzentration von 0,625 µg/mL für den Detektions-AK aus Syn211-CF633 und Syn211-CF488A einen fast doppelt so hohen mittleren Pixel-Wert im Vergleich zu den anderen Konzentrationen auf (s. Abbildung 3.15 C).

Auffällig war, dass der Detektions-AK aus Syn211-CF633 und Syn211-CF405S höhere sFIDA-Messwerte für die BC hatte als der Detektions-AK aus Syn211-CF633 und Syn211-CF488A, was auf einen erhöhten Hintergrund, vor allem für die Konzentrationen von 0,313 µg/mL und 1,25 µg/mL schließen lässt (s. Abbildung 3.15 C).

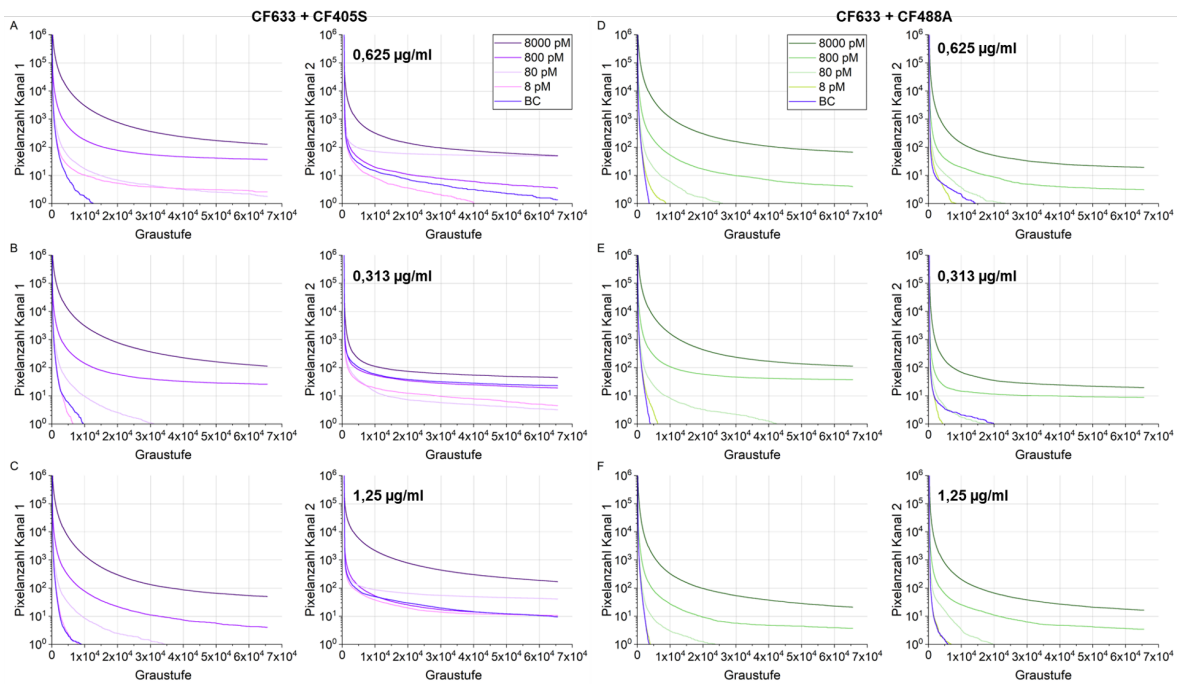
Die Histogramme der jeweiligen Detektions-AK sind in Abbildung 3.16 dargestellt, da hier der deutlich höhere Hintergrund im Kanal 2 mit Syn211-CF405S und die geringere Unterscheidbarkeit der Aggregatkonzentrationen deutlich wird. Eine höhere Unterscheidbarkeit für die Aggregate für den Detektions-AK aus Syn211-CF633 und Syn211-CF488A wurde zudem durch das höhere SRV in Kanal 2 und für den sFIDA-Messwert bestätigt (s. Tabelle 3.12).

Anhand der Ergebnisse wurde der Detektions-AK jeweils mit einer Konzentration von 0,625 µg/mL für beide Detektionssonden als die Variante mit dem höchsten SRV, vor allem für den sFIDA-Messwert bestimmt. Auch war das Signal in beiden Einzelkanälen für diese Konzentration annähernd gleich hoch. Zudem war die Unterscheidbarkeit der Aggregatkonzentrationen höher für Syn211-CF633 und Syn211-CF488A als für Syn211-CF633 und Syn211-CF405S als Detektions-AK. Daher wurde in den nachfolgenden Versuchen der Detektions-AK aus Syn211-CF633 und Syn211-CF488A mit einer Konzentration von 0,625 µg/mL verwendet.



**Abbildung 3.15 – Vergleich der Konzentrationen von 0,313 µg/mL, 0,625 µg/mL und 1,25 µg/mL für die Detektionssonden Syn211-CF405S und Syn211-CF488A.**

Die Konzentration der Detektionssonde Syn211-CF633 wurde mit 0,625 µg/mL konstant gehalten. Der Detektions-AK aus Syn211-CF633 und Syn211-CF405S bzw. Syn211-CF633 mit Syn211-CF488A wurde mit synthetischen  $\alpha$ -Syn-Aggregaten mit einer Konzentration von 0 pM bis 8000 pM getestet. In Kanal 1 waren die Pixel-Werte für den Detektions-AK aus Syn211-CF633 und Syn211-CF405S im Durchschnitt höher. Der Detektions-AK aus Syn211-CF633 und Syn211-CF405S zeigte in Kanal 2 und für den sFIDA-Messwert ein geringeres Signal im Vergleich zum Detektions-AK aus Syn211-CF633 und Syn211-CF488A (B, C). Die Konzentration von 0,625 µg/mL für beide AK zeigt für alle Aggregatkonzentrationen den höchsten sFIDA-Messwert für den Detektions-AK aus Syn211-CF633 und Syn211-CF488A (C). Gemessen wurde am IN Cell Analyzer 6500HS Mikroskop mit 40x Vergrößerung. Grenzwert: 0,001 %.



**Abbildung 3.16 – Histogramme der unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen für die Detektions-AK Syn211-CF633 und Syn211-CF405S oder Syn211-CF488A.**

Verglichen wurden die Detektionssonden Syn211-CF405S und Syn211-CF488A in Kombination mit Syn211-CF633 (immer mit einer Konzentration von 0,625 µg/mL) mittels einer  $\alpha$ -Syn Aggregatkonzentrationsreihe. In (A–C) sind die Histogramme für den Kanal 1 (links) und Kanal 2 (rechts) der Varianten mit Syn211-CF633 und Syn211-CF405S dargestellt. In (D–F) sind die Histogramme für den Kanal 1 (links) und Kanal 2 (rechts) der Varianten mit Syn211-CF633 mit Syn211-CF488A dargestellt. A und D zeigen jeweils die Antikörper-Konzentrationen von 0,625 µg/mL, B und E die für 0,313 µg/mL und C und F für 1,25 µg/mL. Es fällt auf, dass die Histogramme der Aggregatkonzentrationen die mit der Detektionssonde Syn211-CF405S (A–C) im Vergleich zu denen, die mit der Detektionssonde Syn211-CF488A (D–F) markiert wurden zum einen eine höhere BC und zum anderen eine geringere Unterscheidbarkeit der einzelnen Konzentrationen aufwiesen. Dagegen unterschieden sich die Histogramme für den Syn211-CF633 als Detektionssonde marginal voneinander. Gemessen wurde am IN Cell Analyzer 6500HS Mikroskop mit 40x Vergrößerung.

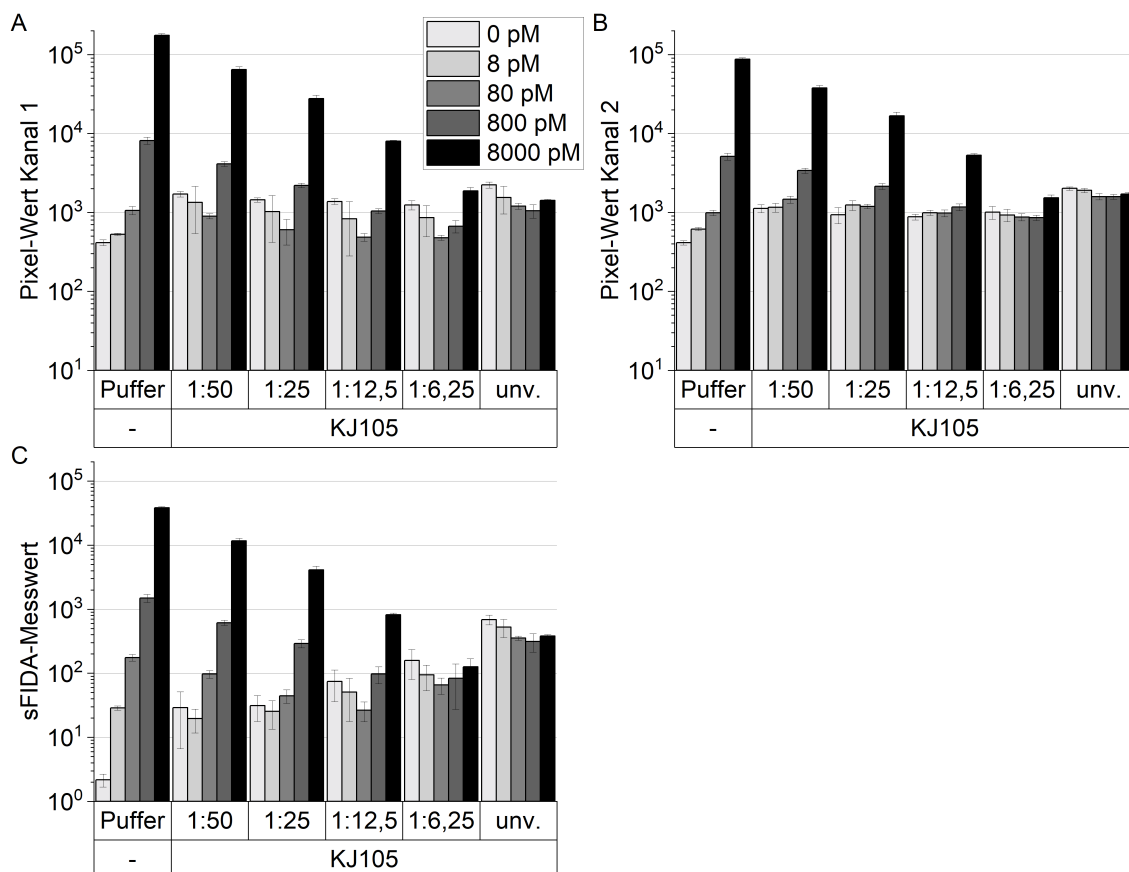
**Tabelle 3.12 – Vergleich des SRV für die Detektions-AK-Kombinationen**

Vergleich von Syn211-CF633 und Syn211-CF405S bzw. Syn211-CF633 und Syn211-CF488A für unterschiedlichen Konzentrationen. Auswertung mit einem 0,01 % Grenzwert.

<b>Kanal 1</b>						
<b>Konzentration [pM]</b>	CF633/ CF405S	CF633/ CF488A	CF633/ CF405S	CF633/ CF488A	CF633/ CF405S	CF633/ CF488A
	0,625 µg/mL		0,313 µg/mL		1,25 µg/mL	
<b>8</b>	1,2	1,1	1,1	1,0	1,1	1,0
<b>80</b>	2,3	2,2	2,2	2,0	2,6	1,5
<b>800</b>	18,4	13,9	17,7	14,9	19,6	8,0
<b>8000</b>	4428,9	354,3	476,7	390,3	474,0	145,7
<b>Kanal 2</b>						
<b>Konzentration (pM)</b>	CF633/ CF405S	CF633/ CF488A	CF633/ CF405S	CF633/ CF488A	CF633/ CF405S	CF633/ CF488A
	0,625 µg/mL		0,313 µg/mL		1,25 µg/mL	
<b>8</b>	0,8	1,3	0,4	0,8	0,7	0,9
<b>80</b>	1,2	2,0	0,5	1,2	1,0	2,1
<b>800</b>	2,3	10,2	1,0	4,6	1,9	12,4
<b>8000</b>	45,6	254,4	5,0	116,8	99,0	260,8
<b>sFIDA-Messwert</b>						
<b>Konzentration (pM)</b>	CF633/ CF405S	CF633/ CF488A	CF633/ CF405S	CF633/ CF488A	CF633/ CF405S	CF633/ CF488A
	0,625 µg/mL		0,313 µg/mL		1,25 µg/mL	
<b>8</b>	4,9	11,5	0,1	8,7	0,7	3,0
<b>80</b>	15,7	58,4	0,9	48,1	2,5	28,7
<b>800</b>	211,1	592,3	4,5	560,1	22,1	335,2
<b>8000</b>	6818,5	21172,1	93,8	19314,0	1239,9	8812,1

### 3.3.3 Analytische Validierung: Wiederfindungsrate von $\alpha$ -Syn-Aggregaten in verschiedenen Stuhlverdünnungen

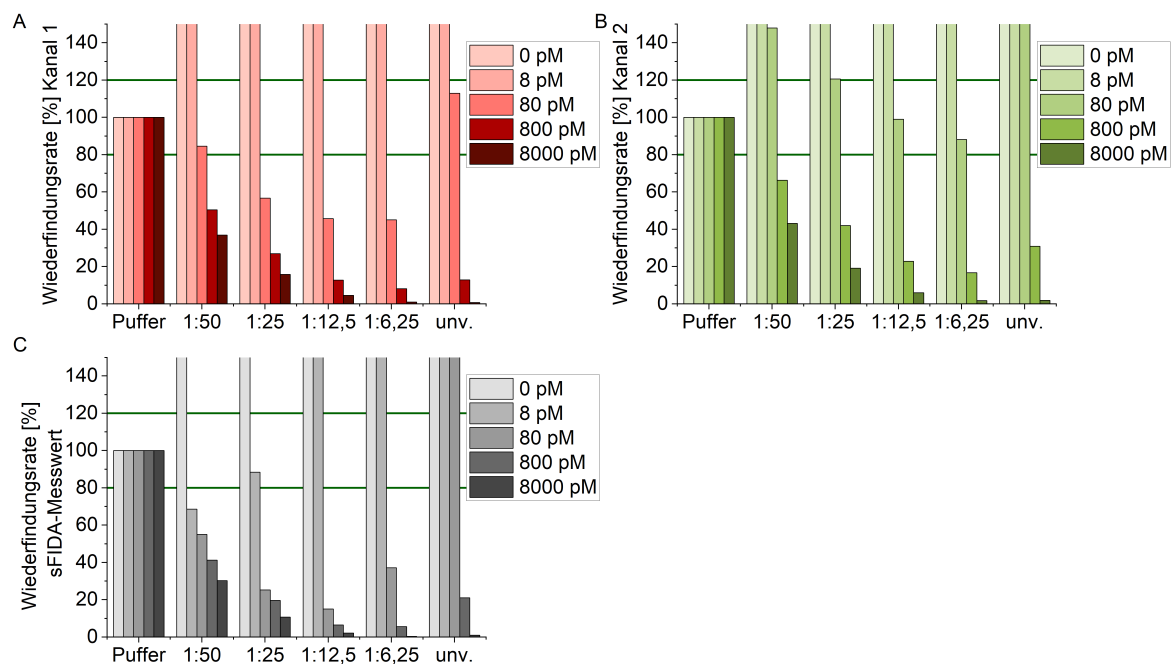
Um die Wiederfindungsrate der Aggregate in Stuhl zu validieren, wurden  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen von 0 pM bis 8000 pM entweder in 1:50, 1:25, 1:12,5, 1:6,25 verdünnte oder in eine unverdünnte Stuhlprobe einer Kontrolle (KJ105) *gespiked* (Exp. 13). Als Referenz für die Wiederfindungsrate galt das Signal in Puffer. Ein Graustufenwert von 0,01 % der BC wurde für die Auswertung verwendet.



**Abbildung 3.17 – Aggregatkonzentrationen von 0 pM bis 8000 pM wurden entweder in Puffer (Referenz) oder in 1:50, 1:25, 1:12,5, 1:6,25 verdünnte oder unverdünnte Stuhlprobe einer Kontrolle *gespiked*.**

In (A–C) fällt auf, dass das Signal der Aggregate (vor allem der hohen Aggregatkonzentrationen von 800 pM – 8000 pM) mit niedrigerer Stuhlverdünnung im Vergleich zu Puffer abnahm. Die Signalunterschiede der einzelnen Aggregatkonzentrationen wurden ebenfalls mit abnehmender Verdünnung kleiner, bis in unverdünnter Stuhlprobe keine Unterschiede mehr gemessen wurden. Die Messung erfolgte am IN Cell Analyzer 6500HS bei 40x Vergrößerung. Graustufenwert: 0,01 %.

Das Signal für die höchsten Aggregatkonzentrationen von 8000 pM und 800 pM nahm mit geringerer Stuhlverdünnung und im Vergleich zu Puffer ab (s. Abbildung 3.17 (A–C)). Für die 1:50 und teilweise auch für die 1:25 Stuhlverdünnung war noch eine Unterscheidung der Aggregatkonzentrationen möglich. Für die niedrigeren Aggregatkonzentrationen von 8 pM und 80 pM, waren diese in Stuhlverdünnungen nicht mehr von dem Signal der Stuhlprobe ohne Aggregate



**Abbildung 3.18 – Wiederfindungsrate von Aggregaten, die entweder in Puffer (Referenz) oder in 1:50, 1:25, 1:12,5, 1:6,25 verdünnte oder unverdünnte Stuhlprobe einer Kontrolle gespiked wurden.**

In (A–C) ist die entsprechende prozentuale Wiederfindungsrate, die anhand der in Puffer *gespiketen* Aggregate als Referenz berechnet wurde, dargestellt. Der in Abbildung 3.17 sichtbare Trend spiegelte sich hier ebenfalls in einer abnehmenden Wiederfindungsrate für niedrigere Stuhlverdünnungen wider. Die Wiederfindungsrate nahm dabei mit höher werdender Aggregatkonzentration unabhängig von der Stuhlverdünnung ab. Als grüne Striche wurde jeweils der Toleranzbereich für die Wiederfindungsrate in den Grafen eingezeichnet (80 % – 120 %). Die Messung erfolgte am IN Cell Analyzer 6500HS bei 40x Vergrößerung. Graustufenwert: 0,01 %.

(0 pM) zu differenzieren und das Signal veränderte sich ebenfalls nicht mehr in Abhängigkeit der Aggregatkonzentration. Für die unverdünnte Stuhlprobe war keine Unterscheidung der Aggregatkonzentrationen möglich und es war eine Abnahme des sFIDA-Messwertes mit steigender Aggregatkonzentration von 45 % für die unverdünnte Stuhlprobe ohne Aggregate im Vergleich zu 8000 pM Aggregaten *gespiked* in unverdünnter Stuhlprobe sichtbar (s. Abbildung 3.17 C). Dies zeigte sich ebenfalls in den Einzelkanälen (s. Abbildung 3.17 A, B).

Dies spiegelte sich auch in der berechneten prozentualen Wiederfindungsrate wider, bei der das Signal der Aggregate in Puffer 100 % darstellte (s. Abbildung 3.18 A–C). Die grünen Linien repräsentieren den Bereich, in dem die Wiederfindungsrate toleriert wird (80 % – 120 %). Das Signal in Puffer wurde als 100 % angenommen und ausgehend davon die Wiederfindungsrate für die Stuhlprobenverdünnungen berechnet. Für die Kontrollstuhlprobe ohne Aggregate lag das Signal stets über der Pufferkontrolle genauso wie für die Aggregatkonzentrationen von 8 pM – 80 pM ab einer 1:12,5 Stuhlprobenverdünnung bzw. 8 pM – 800 pM für die unverdünnte Stuhlprobe, was zu einer Wiederfindungsrate von über 100 % führte (s. Abbildung 3.18 A–C). Mit zunehmender Aggregatkonzentration nahm die Wiederfindungsrate ab und lag für den sFIDA-Messwert

für die 1:50 verdünnte Stuhlprobe durchschnittlich bei 42 % (ausschließlich der Konzentrationen 0 pM – 8 pM) und für die unverdünnte Stuhlprobe durchschnittlich bei 11 % (ausschließlich der Konzentrationen 0 pM – 80 pM) (s. Abbildung 3.18 C).

Zusätzlich wurde auch hier die AF der Stuhlprobenverdünnungen gemessen (s. Anhang, Abbildung 5.5). Mit abnehmender Verdünnung nahm die AF zu, allerdings war die Signalsteigerung deutlich größer als die Zunahme der AF, wodurch die Differenz zwischen Signal und AF für die unverdünnte Probe 3,3-fach höher war im Vergleich zu einer 1:50 Verdünnung der Stuhlprobe (s. Anhang, Tabelle 5.11). Dadurch, dass das meiste Signal mit unverdünnten Stuhlproben gemessen wurde und die AF im Vergleich zum Signal am geringsten ausfiel, wurde in den folgenden Versuchen mit unverdünnten Stuhlproben weitergearbeitet, auch wenn die Wiederfindungsrate für 1:50 verdünnte Stuhlproben deutlich näher am Toleranzbereich lag.

### 3.3.4 PTA-Fällung von Stuhlproben

Um die Detektion von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhl zu verbessern in dem die Aggregate aufkonzentriert wurden und so möglicherweise störende Matrixeffekte zu entfernen, wurden im folgenden Versuch die Stuhlproben mittels PTA-Fällung gefällt (Exp. 14). Die PTA-Fällung wurde mit unverdünnten und 1:2,8 verdünnten Stuhlproben jeweils in verschiedenen Volumina des Mastermix durchgeführt, wodurch die Ausgangsmenge an Stuhlprobe für beide Ansätze gleich war. So sollte überprüft werden, ob eine Verdünnung der Stuhlproben und somit der darin enthaltenen Bestandteile die gegebenenfalls die PTA-Fällung stören könnten, in einer erhöhten Aufkonzentrierung der Aggregate durch die PTA-Fällung resultierte. Zusätzlich wurde wieder die AF der Stuhlproben für alle Versuchsbedingungen gemessen. Hierfür wurden vier Kontrollstuhlproben und sechs iRBD-Patientenstuhlproben verwendet. Für die Auswertung wurde ein Grenzwert von 0,001 % der BC angewendet.

Im Folgenden wurden nur die Ergebnisse der PTA-Fällung für die unverdünnten Stuhlproben mit und ohne Detektions-AK dargestellt (s. Abbildung 3.19).

Nicht PTA-gefällte Stuhlproben wiesen für jeweils drei Stuhlproben der Kontrollen und der Patienten niedrigere Pixel-Werte in Kanal 1 auf als mit PTA-Fällung, sodass der Pixel-Wert der Stuhlproben ohne PTA-Fällung im Durchschnitt für die Patientenstuhlproben um 69 % und für die Kontrollstuhlproben um 57 % niedriger war. Da zusätzlich die AF nach einer PTA-Fällung der Stuhlproben anstieg, war die Unterscheidung bei PTA gefällten Proben zwischen Signal und AF geringer als ohne. Die machte AF einen prozentualen Anteil von 24 % für die Stuhlproben ohne PTA-Fällung und für die Stuhlproben mit PTA-Fällung einen Anteil von 54 % aus (Abbildung 3.19 A, D). In Kanal 2 wiesen nicht PTA-gefällte Stuhlproben von Kontrollen mit einem 92 % geringeren Pixel-Wert und Stuhlproben von Patienten mit einem 96 % geringeren Pixel-Wert ei-



ne noch deutlichere Reduktion des Pixel-Wertes im Vergleich zu PTA-gefällten Stuhlproben auf (s. Abbildung 3.19 B, E). Eine Erhöhung der AF von Stuhlproben nach PTA-Fällung um etwas mehr als das Doppelte konnte in Kanal 2 beobachtet werden. Für den sFIDA-Messwert zeigte eine PTA-Fällung die deutlichste Steigerung des Signals für alle außer einer Stuhlprobe mit einer 100-fachen Erhöhung des sFIDA-Messwertes für die Patientenstuhlproben und einer 25-fachen Erhöhung für die Kontrollstuhlproben im Vergleich zu nicht PTA-gefällten Stuhlproben (Abbildung 3.19 C, F). Allerdings machte hier die AF für die Stuhlproben ohne PTA-Fällung einen prozentualen Anteil von 29 % und für die Stuhlproben mit PTA-Fällung einen Anteil von 52 % aus

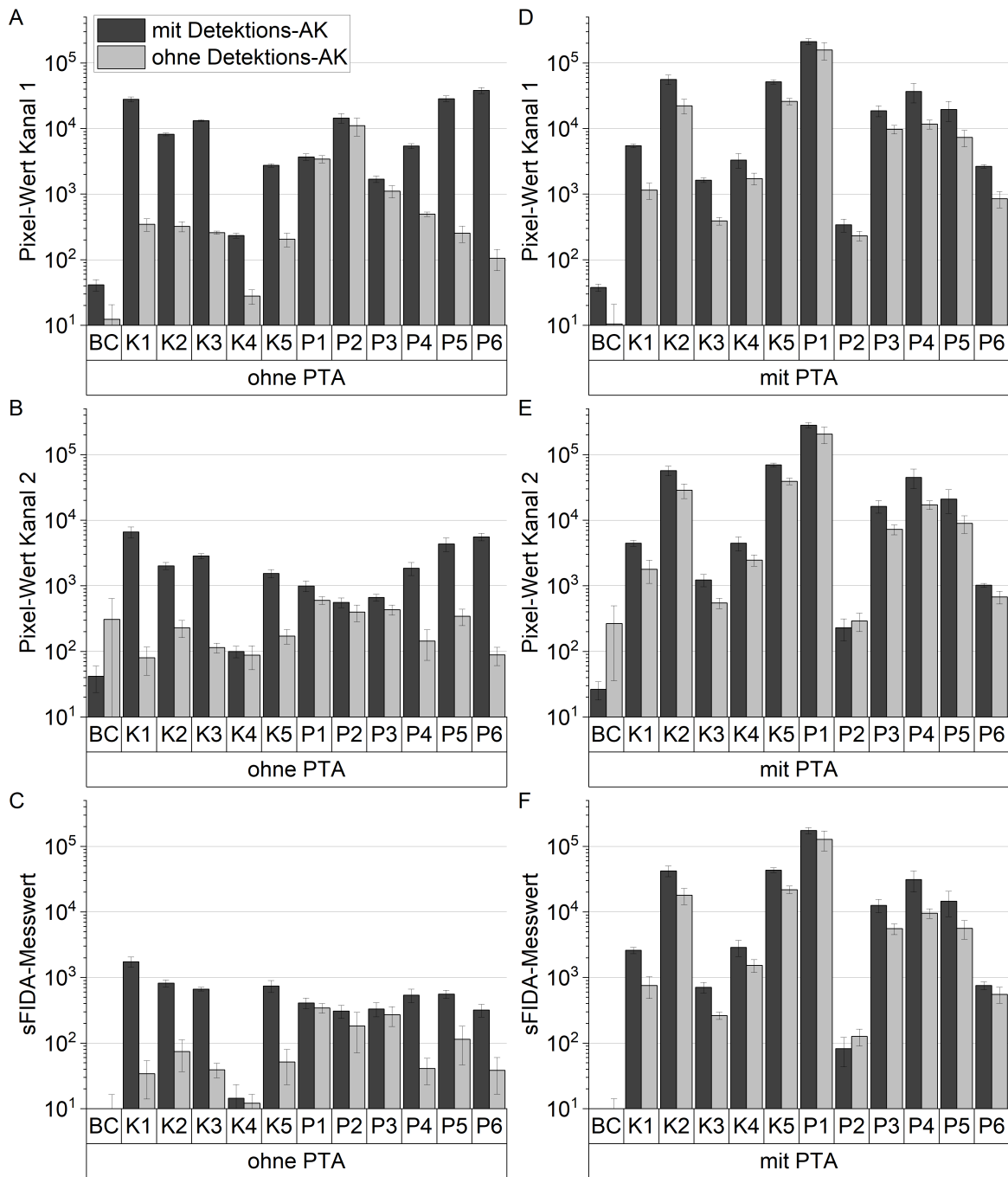
Die 1:2,8 verdünnten Proben zeigten ebenfalls eine Signalsteigerung nach der PTA-Fällung. Durch die Verdünnung war das Signal der 1:2,8 verdünnten Stuhlproben ohne PTA-Fällung niedriger verglichen mit unverdünnten Stuhlproben allerdings gab es keinen Unterschied für PTA-gefällte Stuhlproben. Die Differenz zwischen Signal und AF war kleiner für 1:2,8 verdünnte Stuhlproben im Vergleich zu unverdünnten Stuhlproben (Daten nicht gezeigt).

Die Pixel-Werte bzw. der sFIDA-Messwert der BC unterschieden sich nicht zwischen dem mit und ohne PTA-Fällung behandelten Puffer, somit führten die Komponenten der PTA-Fällung selber nicht zu unspezifischem Signal, was zu der Signalsteigerung der Stuhlproben geführt haben könnte.

Anhand dieser Ergebnisse wurde weiterführend mit unverdünnten Stuhlproben ohne PTA-Fällung gearbeitet. Eine PTA-Fällung hat nicht zu einer Verringerung der AF bei gleichzeitiger Erhöhung des Signals geführt, sondern im Gegensatz die AF erhöht. Auch eine Verdünnung der Stuhlproben vor der PTA-Fällung führte nicht zu einer verbesserten PTA-Fällung und damit verbundener Steigerung des Signals und Verringerung der AF. Zusätzlich hatte die PTA-Fällung bei mehr Stuhlproben von Kontrollen als Patienten zu einer Signalsteigerung geführt, weswegen eine PTA-Fällung als nicht sinnvoll erachtet wurde.

### 3.3.5 Vergleich verschiedener Fänger- und Detektions-AK

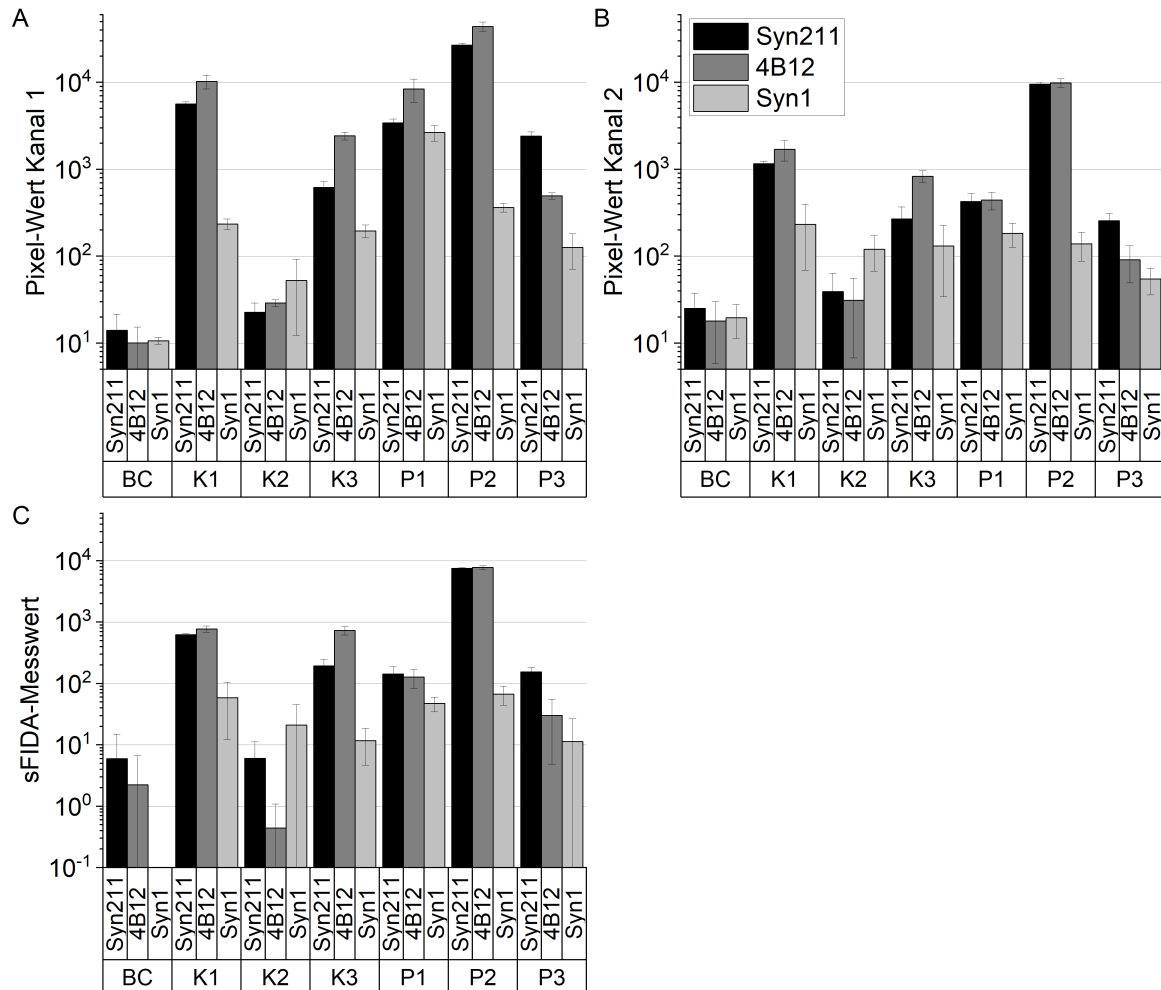
Um die Bindung und Detektion von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten gegebenenfalls weiter zu optimieren, wurden in Exp. 15 erneut verschiedene Fänger-AK zusammen mit Detektions-AK an unverdünnten Stuhlproben getestet. Als Fänger-AK wurden die Syn211-, 4B12- und Syn1-AK getestet, wobei der Syn211-AK als Detektions-AK verwendet wurde. Für den Vergleich der Detektions-AK wurden verschiedene Kombinationen aus den Syn211- und 4B12-AK jeweils entweder mit dem Syn211- oder 4B12-AK als Fänger-AK getestet (s. Tabelle 2.12; Daten für Syn1 nicht gezeigt). Als Referenz diente der Syn211-AK sowohl als Fänger-AK als auch als Detektions-AK. Hierfür wurden jeweils Stuhlproben dreier Kontrollen und iRBD-Patienten sowie für alle Versuchsbedingungen auch eine BC getestet. Ein manueller Grenzwert von 1500 wurde für Kanal 1 und 2 für



**Abbildung 3.19 – Vergleich des Signals und der AF mit und ohne PTA-Fällung.**

Kanal 1 wurde in A und D abgebildet, Kanal 2 in B und E und der sFIDA-Messwert in C und F. Die Proben ohne PTA-Fällung (A–C) zeigten jeweils mit und ohne Detektions-AK für unverdünnte Proben geringere Signale und auch geringere AF als PTA-gefällte (D–F) Stuhlproben. Das Signal mit PTA-Fällung war deutlich höher als ohne, allerdings war auch die AF erhöht und die Unterscheidung so deutlich verringert als ohne PTA-Fällung. Die Messung erfolgte am IN Cell Analyzer 6500HS Mikroskop bei 40x Vergrößerung. Grenzwert: 0,001 %.

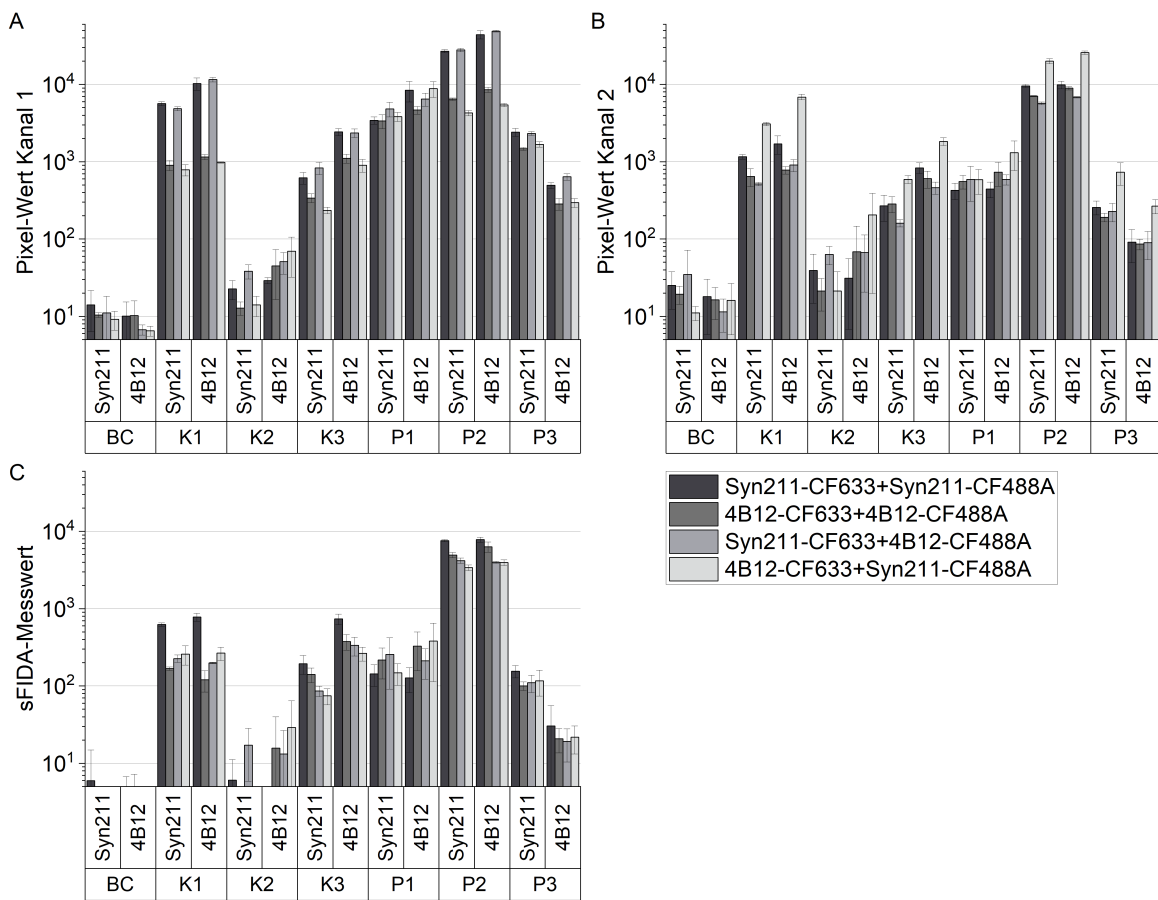
die Auswertung verwendet.



**Abbildung 3.20 – Vergleich der Syn211-, 4B12- und Syn1-AK als Fänger-AK.**

(A–C) zeigt, dass der Syn1-AK für alle Varianten ein niedrigeres Signal aufwies als die anderen beiden Fänger-AK. Der 4B12-AK als Fänger-AK zeigte für die Kontrollstuhlproben einen höheren sFIDA-Messwert als der Syn211-AK, dafür zeigte der Syn211-AK einen gleich hohen oder höheren sFIDA-Messwert als der 4B12-AK für die Patienten. Für alle Fänger-AK wurde der Syn211-AK als Detektions-AK verwendet. Die Messung erfolgte am IN Cell Analyzer 6500HS Mikroskop bei 40x Vergrößerung. Manueller Grenzwert: 1500 (Kanal 1 und 2).

Der Syn211- und 4B12-AK zeigten verglichen mit dem Syn1-AK als Fänger-AK höhere Signale für alle Stuhlproben, mit Ausnahme der Kontrollstuhlprobe K2 (s. Abbildung 3.20 A–C). Der Syn211-AK zeigte verglichen mit dem 4B12-AK als Fänger-AK für alle Kontrollstuhlproben einen 46 % niedrigeren sFIDA-Messwert, aber dagegen für alle Patientenstuhlproben einen 1,1 % niedrigeren sFIDA-Messwert (s. Abbildung 3.20 C). Dadurch wies der Syn211-AK im Vergleich zum 4B12-AK als Fänger AK ein 1,8-fach höheres PKV für den sFIDA-Messwert auf (s. Tabelle 3.13). Auch für die Einzelkanäle war das PKV für den Syn211-AK im Vergleich zum 4B12-AK höher. Die BC unterschieden sich für die verschiedenen Fänger-AK nicht signifikant.



Der Vergleich der Detektions-AK zeigte für den Detektions-AK aus Syn211-CF633 und Syn211-CF488A zumeist das höchste Signal in Kanal 1 und für den sFIDA-Messwert (s. Abbildung 3.21 A, C). In Kanal 2 lieferte der Detektions-AK aus 4B12-CF633 und Syn211-CF488A die höchsten Pixel-Werte für die Stuhlproben (s. Abbildung 3.21 B). Dabei fiel auf, dass das Signal für den Syn211-AK als Detektionssonde immer einen höheren Pixel-Wert in beiden Einzelkanälen lieferte als der 4B12-AK als Detektionssonde wodurch für den sFIDA-Messwert der Detektions-AK aus aus Syn211-CF633 und Syn211-CF488A das höchste Signal für alle bis auf eine Stuhlprobe aufwies. Dies war unabhängig vom Fänger-AK.

Das PKV was für den Syn211-AK als Fänger-AK für alle Detektions-AK höher als für den 4B12-AK als Fänger-AK (s. Tabelle 3.13). Für den Vergleich zwischen den Detektions-AK zeigte der 4B12-CF633 und 4B12-CF488A als Detektions-AK für beide Fänge-AK insgesamt das höchste bzw. das zweithöchste PKV. Somit war das PKV für den Detektions-AK aus 4B12-CF633 und 4B12-CF488A mit dem Syn211-AK verglichen mit dem 4B12-AK als Fänger-AK um das 1,3-fache für den sFIDA-Messwert gesteigert.

Anhand dieser Ergebnisse wurde für die weiteren Versuche der Syn211-AK als Fänger-AK mit 4B12-CF633 und 4B12-CF488A als Detektions-AK verwendet.

Tabelle 3.13 – PKV für den 211- und 4B12-AK als Fänger-AK mit verschiedenen Detektions-AK

Fänger-AK	Syn211-AK											
Detektions-AK	Syn211-CF633 + Syn211CF-488A			4B12-CF633 + 4B12-CF488A			Syn211-CF633 + 4B12-CF488A			4B12-CF633 + Syn211CF-488A		
	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert
Mittelwert Proben	10935,4	3419,5	2625,9	3767,8	2603,5	1754,3	11669,1	2173,8	1520,2	3256,8	7091,0	1220,5
Mittelwert Kontrollen	2097,2	490,1	274,6	418,4	316,9	103,3	1906,5	246,6	109,9	344,1	1231,8	111,8
PKV	5,2	7,0	9,6	9,0	8,2	<b>17,0</b>	6,1	<b>8,8</b>	13,8	<b>9,5</b>	5,8	10,9
Fänger-AK	4B12-AK											
Detektions-AK	Syn211-CF633 + Syn211CF-488A			4B12-CF633 + 4B12-CF488A			Syn211-CF633 + 4B12-CF488A			4B12-CF633 + Syn211CF-488A		
	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert
Mittelwert Proben	17691,5	3470,6	2656,1	4494,9	3253,9	2229,9	18699,5	2498,3	1403,1	4837,7	9108,6	1448,8
Mittelwert Kontrollen	4231,7	855,1	505,2	767,3	484,8	170,9	4648,5	478,2	182,5	650,8	2967,8	186,3
PKV	4,2	4,1	5,3	5,9	<b>6,7</b>	<b>13,1</b>	4,0	5,2	7,7	<b>7,4</b>	3,1	7,8

PKV: Proben-Kontroll-Verhältnis

**Tabelle 3.14 – Verdünnungslinearität für eine 1:5 Verdünnungsreihe der  $\alpha$ -Syn-Aggregate mit dem Syn211- oder 4B12-AK als Detektions-AK**

Detektions-AK	Syn211-AK			4B12-AK		
	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert
<b>1,6</b>	1,3	7,1	1,8	4,1	4,3	15,6
<b>8</b>	1,4	2,9	1,6	4,7	5,0	1,5
<b>40</b>	<b>1,1</b>	2,0	<b>1,1</b>	2,2	2,2	3,0
<b>200</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,9</b>	2,8	4,9	<b>1,2</b>
<b>1000</b>	<b>0,9</b>	<b>0,9</b>	<b>0,8</b>	1,3	2,1	2,1
<b>5000</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	0,3	0,7	0,2

### 3.3.6 Vergleich des 4B12- und Syn211-AK als Detektions-AK

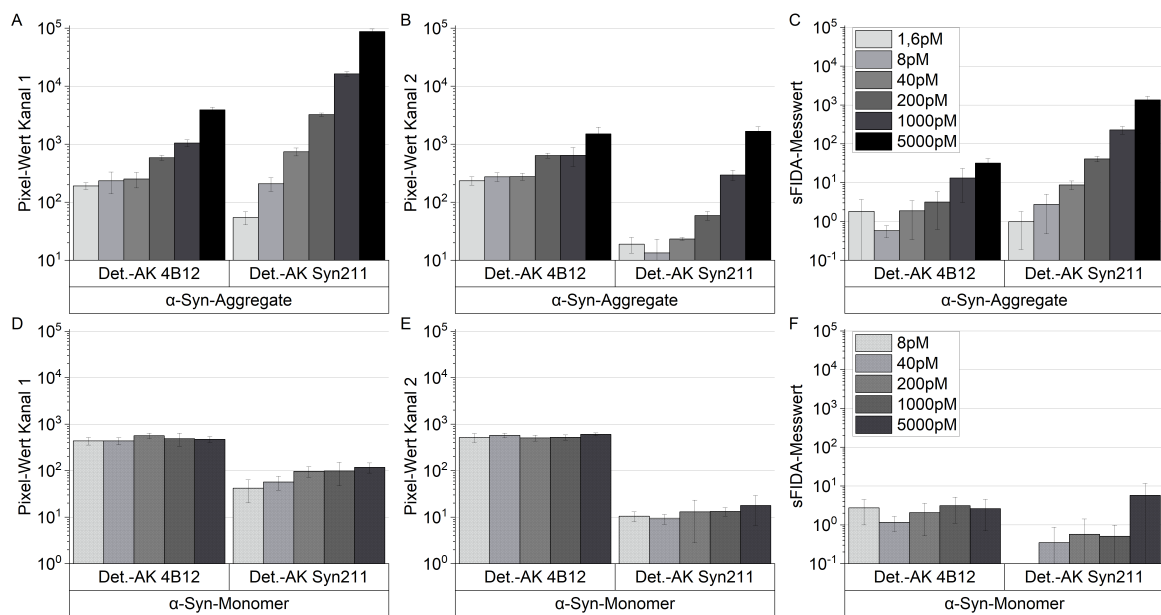
Da die Assayvalidierung im letzten Versuch soweit abgeschlossen war, wurden alle vorhandenen Stuhlproben der PD- und iRBD-Patienten und der Kontrollgruppe im sFIDA-Assay gemessen (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde erst die abschließende Assayvalidierung des sFIDA-Assays durchgeführt und zusätzlich eine 1:5 Verdünnungsreihe der synthetischen  $\alpha$ -Syn-Aggregate von 1,6 pM – 5000 pM und der  $\alpha$ -Syn-Monomere von 8 pM – 5000 pM, die mit dem Detektions-AK aus Syn211-CF633 und Syn211-CF488A markiert wurden, mitgeführt (Exp. 16, vergleiche Kapitel 2.5.5). Für die Auswertung wurde ein Grenzwert von 0,01 % der BC gewählt.

Dieses Experiment zeigte, dass der 4B12-AK als Detektions-AK die synthetischen  $\alpha$ -Syn-Aggregate, die als Positivkontrolle dienten, deutlich unspezifischer gebunden hat, was zu einer reduzierten Differenzierbarkeit der Aggregatkonzentrationen im Vergleich zu der Verwendung des Syn211-AK als Detektions-AK führte (s. Abbildung 3.22 A–C). Dies wurde auch anhand der Verdünnungslinearität, die in Tabelle 3.14 aufgeführt ist, deutlich. Eine optimale Verdünnungslinearität liegt bei 1 und Werte von 0,8 bis 1,2 liegen im Toleranzbereich. Für den 4B12-AK als Detektions-AK konnte keine optimale Verdünnungslinearität erzielt werden, für den Syn211-AK als Detektions-AK konnte dagegen eine lineare Verdünnung für  $\alpha$ -Syn-Aggregate ab 40 pM erreicht werden (s. Tabelle 3.14).

Zusätzlich war der sFIDA-Messwert für Monomere durchschnittlich 1,6-fach höher für den 4B12-AK im Vergleich zum Syn211-AK als Detektions-AK (s. Abbildung 3.22 D–F).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden die abschließende Assayvalidierung und die Messung aller Proben mit dem Syn211-AK als Detektions-AK wiederholt.

### 3 ERGEBNISSE



**Abbildung 3.22 – Vergleich des 4B12- und Syn211-AK als Detektions-AK für die Detektion von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten und  $\alpha$ -Syn-Monomeren.**

Die  $\alpha$ -Syn-Aggregate konnten nach Detektion durch den Syn211-AK als Detektions-AK für alle Aggregatkonzentrationen deutlicher differenziert werden und zeigten zusätzlich ein höheres Signal für die hohen Aggregatkonzentrationen (ab ca. 200 pM) vor allem für den sFIDA-Messwert (A–C). Das Signal für  $\alpha$ -Syn-Monomere war für den 4B12-AK als Detektions-AK höher als für Syn211-AK (D–F). Die Messung erfolgte am IN Cell Analyzer 6500HS Mikroskop bei 40x Vergrößerung. Grenzwert: 0,01 %.

### 3.4 Abschließende Assayvalidierung und Quantitative Messung aller Stuhlproben

Die nachfolgenden Ergebnisse der Assayvalidierung und der quantitativen Messung aller Stuhlproben wurden in dem im Anhang (s. Kapitel 5.2.9) genannten Manuskript zusammengefasst und eingereicht, bisher aber noch nicht veröffentlicht. Für die folgenden Messungen wurden nur 384-Kavitäten-Mikrotiterplatten von Greiner verwendet und nur der sFIDA-Messwert für die Ergebnisse berücksichtigt und ausgewertet.

#### 3.4.1 Abschließende Assayvalidierung

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob  $\alpha$ -Syn-Aggregate mit dem Stuhl ausgeschieden wurden und mittels sFIDA-Assay nachweisbar und quantifizierbar sind. Nachdem der sFIDA-Assay für den Nachweis von  $\alpha$ -Syn-Aggregate in Stuhlproben adaptiert wurde, wurde vor der quantitativen Messung aller Stuhlproben die abschließende Assayvalidierung (s. Kapitel 2.5.5) mit den aktuellen Assaybedingungen durchgeführt (s. Kapitel 2.5.4.6).

Zusätzlich wurde für sFIDA-Messungen die *Intra-Assay-Varianz* und *Inter-Assay-Varianz* bestimmt. Für alle Proben wurden auch (Kontroll-) immundepletierte Proben gemessen um nachzu-



weisen, dass tatsächlich  $\alpha$ -Syn-Aggregate in dem sFIDA-Assay gemessen wurden. Als Standard dienten  $\alpha$ -Syn-SiNaPs und auf der letzten Mikrotiterplatte wurden ebenfalls  $\alpha$ -Syn-Aggregate mitgemessen.

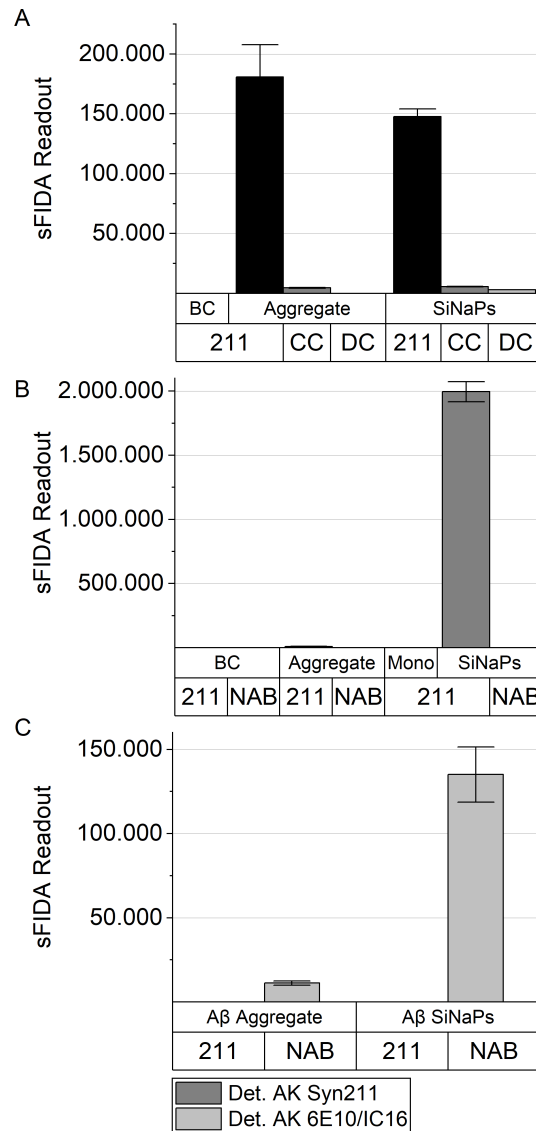
Während der Assayvalidierung wurde zudem mit A $\beta$ -SiNaPs und -Aggregaten die Selektivität des sFIDA-Assays validiert und mittels eines AK gegen A $\beta$  mit  $\alpha$ -Syn-SiNaPs und -Aggregaten auf unspezifische Bindungen untersucht. Für die Auswertungen wurde ein Grenzwert von 0,001 % der BC verwendet, nur für die Immundepletion wurde ein Grenzwert von 0,0003 % angewendet.

#### 3.4.1.1 sFIDA-Messungen sind sehr selektiv für $\alpha$ -Syn-Aggregate

Zur Validierung des sFIDA-Assays auf seine Selektivität wurden unspezifische Bindungen von  $\alpha$ -Syn-SiNaPs und  $\alpha$ -Syn-Aggregaten an die Oberfläche der 384-Kavitäten-Mikrotiterplatte überprüft. Dazu wurden die Signale jeweils mit und ohne Fänger-AK (CC) verglichen und es konnte eine Reduktion ohne Fänger-AK relativ zum sFIDA-Messwert von 96 % für SiNaPs und 97 % für Aggregate gezeigt werden (s. Abbildung 3.23 A). Zusätzlich wurden die Stuhlproben ebenfalls ohne Detektions-AK (DC) gemessen. Dies reduzierte den sFIDA-Messwert für  $\alpha$ -Syn-SiNaPs um 98 % und den für  $\alpha$ -Syn-Aggregate vollständig (100 %), sodass der sFIDA-Messwert nicht von der generell niedrigen BC unterscheidbar war (s. Abbildung 3.23 A).

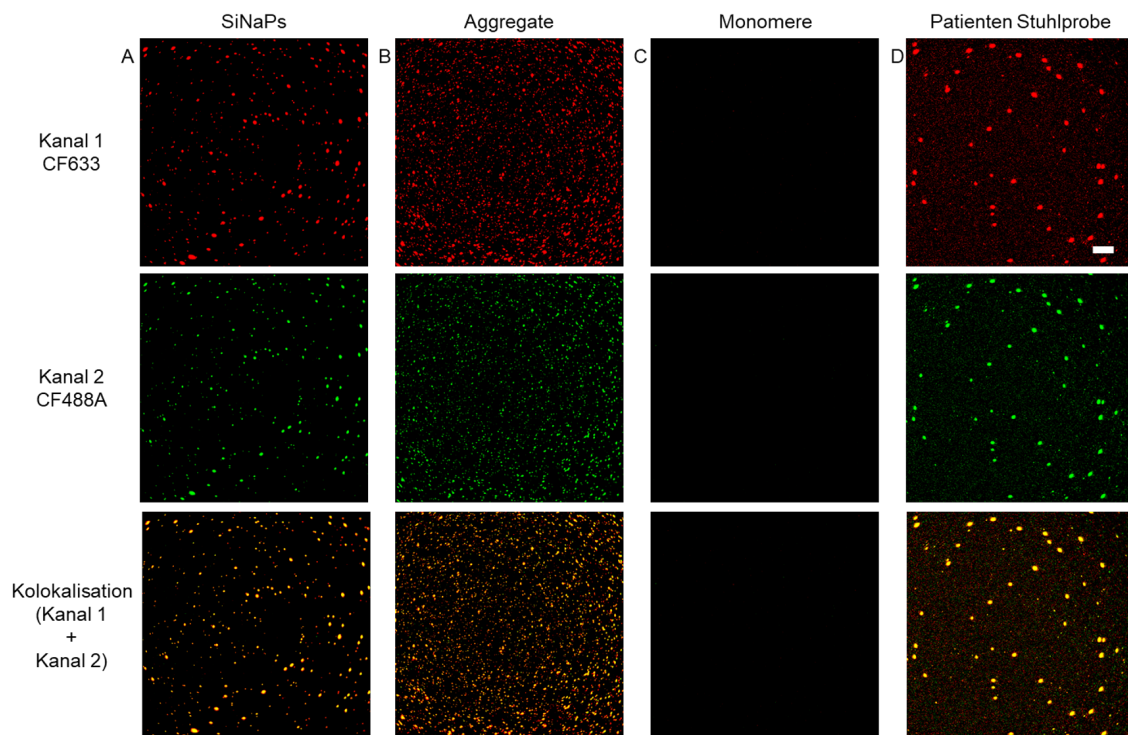
Es wurde auch die Fähigkeit des sFIDA-Assays getestet monomeres  $\alpha$ -Syn zu detektieren. Wie in Abbildung 3.23 B gezeigt, war der sFIDA-Messwert für  $\alpha$ -Syn-Monomere genauso wie die BC vernachlässigbar. Der sFIDA-Messwert der  $\alpha$ -Syn-Monomere entsprach 0,2 % der Positivkontrolle, die aus synthetischen  $\alpha$ -Syn-Aggregaten bestand, eingesetzt in der gleichen Konzentration wie die Monomere. Die Ergebnisse zeigen, dass die mögliche Präsenz von Monomeren in Stuhlproben aufgrund des sFIDA-Assay-Aufbaus aus dem gleichen Fänger- und Detektions-AK, keinen Einfluss auf den sFIDA-Messwert hatte. Um zu bestimmen, ob eine Kreuzreaktivität der  $\alpha$ -Syn-SiNaPs oder  $\alpha$ -Syn-Aggregate vorlag, wurde der NAB228-AK der spezifisch gegen Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) gerichtet ist als Fänger-AK eingesetzt, um zu testen, ob dieser synthetische  $\alpha$ -Syn-Aggregate oder  $\alpha$ -Syn-SiNaPs bindet. Das gemessene Signal war für synthetische  $\alpha$ -Syn-Aggregate im Vergleich zu der Positivkontrolle mit dem Syn211-AK als Fänger-AK um 98 % und das für  $\alpha$ -Syn-SiNaPs um fast 100 % reduziert (s. Abbildung 3.23 B).

Zuletzt wurde die Selektivität des sFIDA-Assays bestimmt, indem synthetische A $\beta$ -Aggregate und A $\beta$ -SiNaPs mit dem Syn211-AK gegen  $\alpha$ -Syn als Fänger-AK und Detektions-AK eingesetzt wurden. Als Positivkontrolle der Detektion von A $\beta$ -Aggregaten und A $\beta$ -SiNaPs diente der NAB228-AK als Fänger-AK und 6E10-CF633 und IC16-CF488A als Detektions-AK. Im Gegenteil zur AK-Kombination spezifisch für A $\beta$  detektierte der für  $\alpha$ -Syn spezifische Syn211-AK weder synthetische A $\beta$ -Aggregate noch A $\beta$ -SiNaPs (s. Abbildung 3.23 C).



**Abbildung 3.23 – Der sFIDA-Assay mit AK gegen  $\alpha$ -Syn detektiert spezifisch  $\alpha$ -Syn-Aggregate und  $\alpha$ -Syn-SiNaPs, aber keine  $\alpha$ -Syn-Monomere, A $\beta$ -Aggregate oder A $\beta$ -SiNaPs.**

(A) Wenn entweder der Fänger-AK (Fänger-AK-Kontrolle (CC)) oder der Detektions-AK (Detektions-AK-Kontrolle (DC)) weggelassen wurden war der sFIDA-Messwert der CC um 97 % für  $\alpha$ -Syn-Aggregate bzw. 96 % für  $\alpha$ -Syn-SiNaPs im Vergleich zum sFIDA-Messwert mit Fänger-AK reduziert. Für die DC war der sFIDA-Messwert vollständig (100 %) für  $\alpha$ -Syn-Aggregate reduziert, wobei das Signal nicht mehr von der generell niedrigen BC unterscheidbar war und um 98 % für  $\alpha$ -Syn-SiNaPs reduziert. (B) Der sFIDA-Messwert von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten und  $\alpha$ -Syn-SiNaPs, wenn sie mit dem NAB228-AK gegen A $\beta$  gebunden wurden, war um 98 % für  $\alpha$ -Syn-Aggregate und um fast 100 % für  $\alpha$ -Syn-SiNaPs reduziert verglichen mit dem Signal mit dem Syn211-AK als Fänger-AK. Der sFIDA-Messwert für  $\alpha$ -Syn-Monomere (Mono) war im Vergleich zu der gleichen Konzentration an Monomeren in aggregiertem  $\alpha$ -Syn auf das Level der BC reduziert. (C) Zusätzlich wurden A $\beta$ -Aggregate und A $\beta$ -SiNaPs mit dem Syn211-AK gegen  $\alpha$ -Syn als Fänger-AK und Detektions-AK gemessen. Als Positivkontrolle wurden dieselben A $\beta$ -Aggregate und A $\beta$ -SiNaPs mit AK spezifisch gegen A $\beta$  (Fänger-AK: NAB288-AK, Detektions-AK: 6E10-CF633/IC16-CF488A) gemessen. Der Graph zeigt, dass der Syn211-AK die A $\beta$ -Aggregate und A $\beta$ -SiNaPs nicht erkannte. Gemessen wurde am IN Cell Analyzer 6500HS Mikroskop bei 40x Vergrößerung. Grenzwert: 0,001 %. Logarithmische Darstellung im Anhang (Abbildung 5.6).



**Abbildung 3.24 – Repräsentative Fluoreszenzbilder von  $\alpha$ -Syn-SiNaPs, synthetischen  $\alpha$ -Syn-Aggregaten,  $\alpha$ -Syn-Monomeren und einer PD-Patientenstuhlprobe.**

Die Abbildung zeigt beispielhafte Fluoreszenzaufnahmen, die im Kanal 1 (roter Fluoreszenzkanal, CF633), im Kanal 2 (grüner Fluoreszenzkanal, CF488A) und dem kolokalisierte Signal (Kokalisation aus Kanal 1 und Kanal 2) von (A) 0,32 pM  $\alpha$ -Syn-SiNaPs in Puffer, (B) 1581 pM synthetischen  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Puffer (Konzentration basierend auf der verwendeten Monomerkonzentration), (C) 1000 pM  $\alpha$ -Syn-Monomeren in Puffer und (D) einer Stuhlprobe eines PD-Patienten. Um die 16-Bit-Bilder heller darzustellen, wurde der Kontrast und die Minimum-/Maximum-Werte in sFIDAData angepasst. Skala: 30  $\mu$ m.

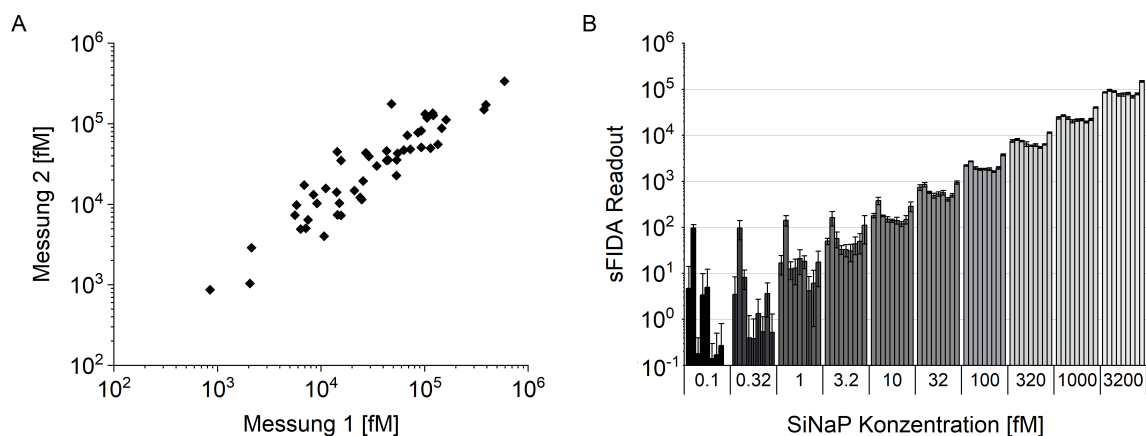
#### 3.4.1.2 sFIDA-Messungen von $\alpha$ -Syn-SiNaPs und Stuhlproben zeigen eine geringe *Intra-Assay-Varianz*

Als Standard für die Signalkalibrierung und LOD-Berechnung wurden  $\alpha$ -Syn-SiNaPs, von denen jeder mehrere Monomere von  $\alpha$ -Syn besitzt, verwendet. Abbildung 3.24 zeigt beispielhaft Mikroskopiebilder des  $\alpha$ -Syn-SiNaP-Standards, der synthetischen  $\alpha$ -Syn-Aggregate, der  $\alpha$ -Syn-Monomere und von einer PD-Patientenstuhlprobe für Kanal 1 (roter Fluoreszenzkanal, CF633), Kanal 2 (grüner Fluoreszenzkanal, CF488A) und das kolokalisierte Signal (Kokalisation aus Kanal 1 und Kanal 2).

Für alle Experimente betrug der mittlere CV%-Wert für die Proben 26,3% und für den  $\alpha$ -Syn-SiNaP-Standard 28,4%. Der CV%-Wert wurde anhand des sFIDA-Messwertes der vier Replikate einer Stuhlprobe berechnet (s. Anhang, Tabelle 5.12).

### 3.4.1.3 Wiederholte sFIDA-Messungen von $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhlproben weisen eine hohe *Inter-Assay*-Varianz auf

Um die *Inter-Assay*-Varianz zwischen unabhängigen sFIDA-Assays zu bestimmen, wurden 50 zufällig ausgewählte Stuhlproben wiederholt an zwei verschiedenen Tagen unter den gleichen Bedingungen gemessen. Beide Messungen zeigten eine signifikante Korrelation der sFIDA-Messwerte mit einem Spearman-Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,916$  ( $p = 0,2 \cdot 10^{-6}$ ) (s. Abbildung 3.25 A). Als Nächstes wurde die Reproduzierbarkeit des Assays durch Mehrfachmessungen des  $\alpha$ -Syn-SiNaP-Standards, der zur Kalibrierung aller Stuhlproben in neun unabhängigen Assays verwendet wurde, belegt (s. Abbildung 36 B). Die wiederholten Messungen erzielten auch hier reproduzierbare Ergebnisse der sFIDA-Messwerte mit einer signifikanten Korrelation und einem Spearman-Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,979$  ( $p = 3,85 \cdot 10^{-62}$ ).



**Abbildung 3.25 – Wiederholte Messungen von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhlproben und von  $\alpha$ -Syn-SiNaPs zeigten höchst reproduzierbare Ergebnisse.**

Die *Inter-Assay*-Varianz des sFIDA-Assays wurde getestet, indem (A) wiederholte Messungen von 50 zufällig ausgewählten Stuhlproben durch den gleichen Operator im gleichen Labor an verschiedenen Tagen durchgeführt wurde. Die Ergebnisse waren mit einem Spearman-Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,916$  ( $p = 0,2 \cdot 10^{-6}$ ) höchst reproduzierbar. (B) Neun unabhängige Messungen der Verdünnungsreihe des  $\alpha$ -Syn-SiNaP-Standards, der für die Kalibrierung des Stuhlproben-Datensets verwendet wurde, zeigten mit einem Spearman-Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,979$  ( $p = 3,85 \cdot 10^{-62}$ ) ebenfalls sehr reproduzierbare Ergebnisse für alle Konzentrationen. Gemessen wurden alle Experimente am IN Cell Analyzer 6500HS Mikroskop bei 40x Vergrößerung. Grenzwert: 0,001 %.

### 3.4.1.4 Der sFIDA detektiert attomolare Konzentrationen von $\alpha$ -Syn-SiNaPs

Die analytische Sensitivität des sFIDA-Assays wurde mithilfe des  $\alpha$ -Syn-SiNaP-Standards bestimmt. Dazu wurde ein einseitiger Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, um die niedrigste SiNaP-Konzentration, die sich signifikant von der BC unterschied für jeden SiNaP-Standard und so den Kalibrierbereich und den LOD zu bestimmen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das untere Limit der Kalibrationskurve auf 0,32 fM und das obere Limit auf 3200 fM gesetzt. In allen Experimenten konnte eine starke Korrelation zwischen dem sFIDA-Messwert und der entspre-

**Tabelle 3.15 – LOD-Werte für jedes Experiment**Die LOD-Werte wurden anhand der  $\alpha$ -Syn-SiNaPs bestimmt.

Experiment	LOD [fM]
1	0,06
2	N/A
3	0,05
4	0,72
5	0,15
6	0,11
7	0,22
8	0,69
9	0,43
Mittelwert	0,30

LOD: Nachweisgrenze; N/A: nicht anwendbar

chenden SiNaP-Konzentration mit einem Spearman-Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,979$  ( $p = 3,85 \cdot 10^{-62}$ ) beobachtet werden. Nach der Kalibrierung betrug der mittlere LOD 0,3 fM für alle Versuche (s. Tabelle 3.15).

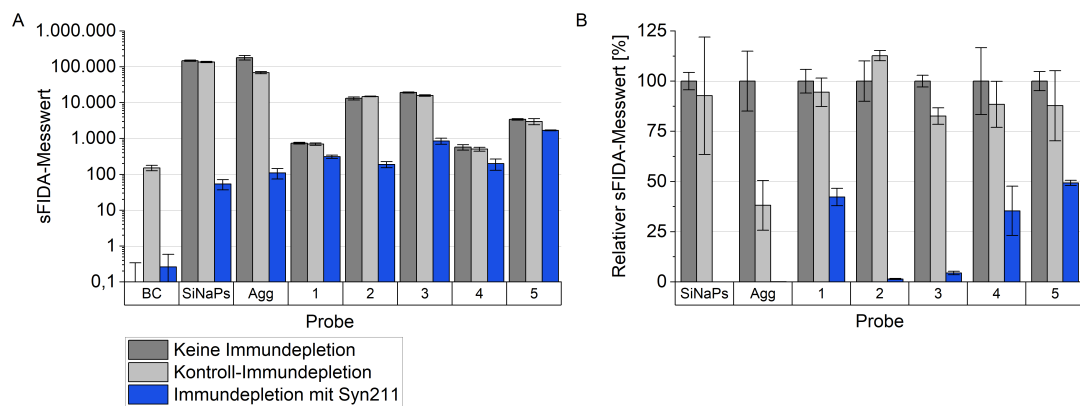
Für alle gemessenen Proben lag die Konzentration über dem LOD des jeweiligen Experiments (Daten nicht gezeigt). Auf einer Mikrotiterplatte wurde ebenfalls eine  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationsreihe von 1,58 pM bis 5000 pM mitgemessen. Anhand dieser konnte ein LOD-Wert von 1,96 pM bzw. wenn ein Kalibrationsbereich von 1,58 pM bis 1581 pM gewählt wurde, von 1,77 pM ermittelt werden. Da die Konzentration der synthetischen Aggregate sich auf die eingesetzte Monomerkonzentration bezieht, wurde die Konzentration deutlich unterschätzt.

#### 3.4.1.5 Eine Immundepletion entfernt $\alpha$ -Syn-Aggregate aus Stuhlproben

Um weiter zu beweisen, dass der sFIDA-Assay selektiv für  $\alpha$ -Syn-Aggregate ist, wurde eine Immundepletion durchgeführt. Dabei wurden die Stuhlproben mit Dynabeads inkubiert, die mit dem Syn211-AK beschichtet waren, der spezifisch gegen  $\alpha$ -Syn gerichtet ist, um  $\alpha$ -Syn-Aggregate in Stuhlproben oder als Positivkontrolle  $\alpha$ -Syn-SiNaPs und synthetische  $\alpha$ -Syn-Aggregate zu depletieren. Als weitere Kontrolle wurden die Proben ebenfalls mit leeren Dynabeads, an die kein AK gekoppelt war, als sogenannte Kontroll-Immundepletion inkubiert. Nach der (Kontroll-)Immundepletion wurden die Überstände im sFIDA-Assay analysiert.

Der sFIDA-Messwert für immundepletierete Stuhlproben wurde im Durchschnitt um 73 % und für  $\alpha$ -Syn-SiNaPs und synthetische  $\alpha$ -Syn-Aggregate um 100 % verringert (s. Abbildung 3.26). Eine Kontroll-Immundepletion derselben Stuhlproben und  $\alpha$ -Syn-SiNaPs resultierte nur in einer durchschnittlichen Reduzierung des Signals von 7 %. Für die synthetischen  $\alpha$ -Syn-Aggregate allerdings resultierte eine Kontroll-Immundepletion in einer Signalreduzierung von 38 %. Wie in Abbildung 3.27 zu sehen waren die Fluoreszenzsignale zwischen Stuhlproben ohne Immunde-

### 3 ERGEBNISSE



#### Abbildung 3.26 – Beispielhafte Ergebnisse der Immundepletion für $\alpha$ -Syn-SiNaPs und synthetische $\alpha$ -Syn-Aggregate (Agg) sowie für fünf Stuhlproben.

Der  $\alpha$ -Syn-SiNaP-Standard, synthetische  $\alpha$ -Syn-Aggregate und fünf beispielhafte Stuhlproben wurden mit magnetischen Beads die mit dem Syn211-AK beschichtet (Immundepletion mit Syn211) und zusätzlich als Negativkontrolle Beads ohne AK-Beschichtung (Kontroll-Immundepletion) immundepletiert. Stuhlproben ohne Immundepletion (keine Immundepletion) dienten als Referenz. (A) Die Immundepletion eliminierte das Signal für die  $\alpha$ -Syn-SiNaPs und synthetischen  $\alpha$ -Syn-Aggregate vollständig (100 %) und reduzierte das Signal für  $\alpha$ -Syn-Aggregate in Stuhlproben um durchschnittlich 73 %, rangierend von 51 % – 99 % je nach Stuhlprobe. Eine Kontroll-Immundepletion beeinflusste das Signal mit einer Reduktion von ca. 7 % für die  $\alpha$ -Syn-SiNaPs und Stuhlproben nicht signifikant, allerdings wurde das Signal der Aggregate um 38 % reduziert. Für die BC zeigte sich ein erhöhtes Signal nach der Kontroll-Immundepletion. (B) Der relative sFIDA-Messwert in % stellt das prozentuale Verhältnis des sFIDA-Messwertes der immundepletierten zu nicht-immundepletierten Stuhlproben dar. Die Ergebnisse der Immundepletion für alle Stuhlproben wurden im Anhang in Abbildung 5.7 für alle PD-Patienten, in Abbildung 5.8 für alle iRBD-Patienten und in Abbildung 5.9 für alle Kontrollen dargestellt. Die Messung erfolgte am IN Cell Analyzer 6500HS Mikroskop bei 40x Vergrößerung. Grenzwert: 0,0003 %.

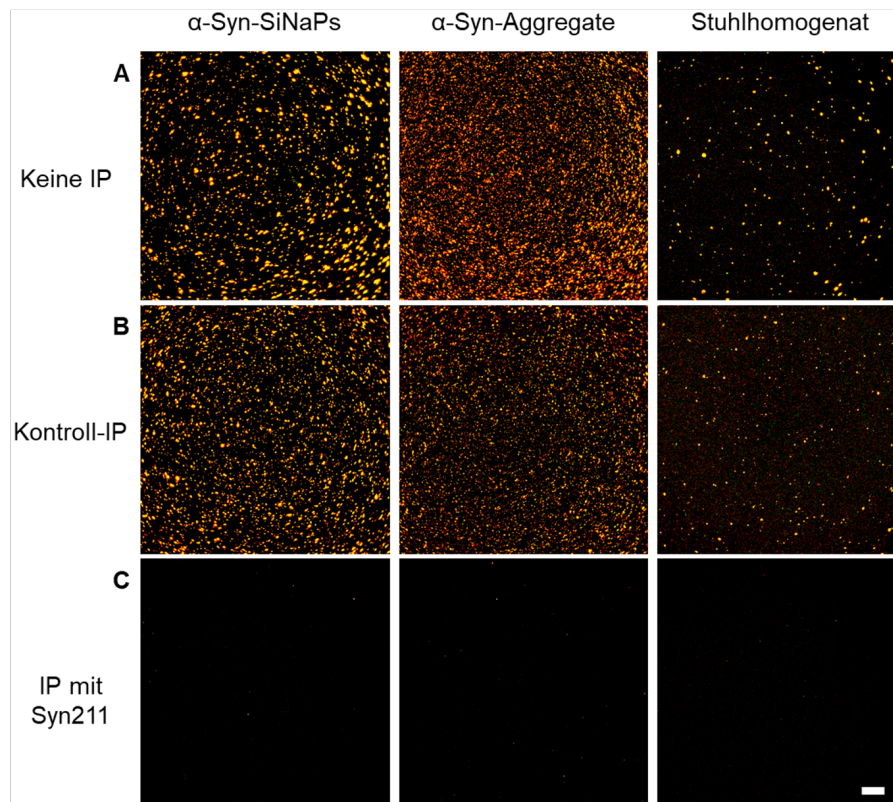
pletion und Kontroll-Immundepletion fast identisch. Nach einer Immundepletion dagegen wurden deutlich reduzierte sFIDA-Messwerte gemessen, was zeigt, dass  $\alpha$ -Syn-Aggregate aus den Proben depletiert wurden und die Kontroll-Immundepletion keinen oder sehr geringen Einfluss auf die meisten Stuhlproben nahm.

#### 3.4.2 Quantitative Messung aller Stuhlproben

##### 3.4.2.1 Deskriptive Analyse der Patienten- und Kontroll-Kohorten

Abschließend wurde die  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentration in Stuhlproben von 94 PD-Patienten, 72 iRBD-Patienten und 57 HC gemessen, um die diagnostische Validität des sFIFA-Assays und die Eignung als diagnostischen Test zu bewerten. Aufgrund der hohen Stuhlprobenanzahl mussten die Probenmessungen auf neun 384-Kavitäten-Mikrotiterplatten aufgeteilt werden. Für alle Messungen wurden dieselben AK, Puffer und Chemikalien verwendet und der Ablauf immer gleich gehalten, um eine Varianz des sFIDA-Assays möglichst gering zu halten.

Demografische und klinische Informationen für die drei Kohorten über Geschlecht, Alter, Bil-



**Abbildung 3.27 – Beispiel-Fluoreszenzaufnahmen von  $\alpha$ -Syn-SiNaPs,  $\alpha$ -Syn-Aggregaten und einer PD-Patientnstuhlprobe jeweils ohne Immundepletion, nach Kontroll-Immundepletion und nach Immundepletion mit Syn211.**

Wenn keine Immundepletion (ohne IP) und wenn eine Kontroll-Immundepletion (Kontroll-IP) durchgeführt wurden, unterschieden sich die Fluoreszenzaufnahmen geringfügig in ihrer Intensität (A, B). Die Signalstärke war für die synthetischen  $\alpha$ -Syn-Aggregate etwas verringert (B). Mit Immundepletion (IP mit Syn211) war kein Signal mehr sichtbar (C). Dargestellt wurde das kolokalisierte Signal für alle Varianten. Die Aufnahmen wurden am IN Cell Analyzer 6500HS erstellt. Um die 16-Bit-Bilder heller darzustellen, wurde der Kontrast und die Minimum-/Maximum-Werte in sFIDa angepasst. Skala: 30  $\mu$ m.

**Tabelle 3.16 – Demografische und klinische Informationen zu Patienten und HC, die Stuhlproben abgegeben haben.**

Sechs Kontrollen mit zu hohem RBDSQ-Wert wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

	<b>PD- Patienten</b>	<b>iRBD- Patienten</b>	<b>HC</b>
Anzahl	94	72	51
Weiblich [Anzahl (%-Wert)]	29 (30,9)	10 (13,9)	31 (60,8)
Alter [Jahre $\pm$ SD]	64,5 $\pm$ 9,9	66,3 $\pm$ 6,4	56,4 $\pm$ 17,1
Bildung [Jahre $\pm$ SD]	15,4 $\pm$ 4,1	15,9 $\pm$ 4,0	16,0 $\pm$ 3,3
Krankheitsdauer [Jahre $\pm$ SD]	9,0 $\pm$ 5,8	7,4 $\pm$ 5,5	N/A
DemTect [Wert $\pm$ SD]	13,8 $\pm$ 3,3	14,8 $\pm$ 2,3	15,9 $\pm$ 2,3
MDS-UPDRS III [Wert $\pm$ SD]	24,1 $\pm$ 14,9	4,0 $\pm$ 2,7	N/A
NMSS [Wert $\pm$ SD]	30,6 $\pm$ 23,1	16,2 $\pm$ 18,0	12,5 $\pm$ 14,4
CCCSS [Wert $\pm$ SD]	4,1 $\pm$ 4,0	2,8 $\pm$ 2,7	2,5 $\pm$ 2,5
Geruch [Wert $\pm$ SD]	5,3 $\pm$ 2,6	6,6 $\pm$ 2,7	10,4 $\pm$ 1,7
Screening-Fragebogen für Parkinson [Wert $\pm$ SD]	5,6 $\pm$ 2,2	0,3 $\pm$ 0,8	0,3 $\pm$ 0,8
iRBD Screening-Fragebogen [Wert $\pm$ SD]	4,9 $\pm$ 3,0	9,0 $\pm$ 2,7	1,7 $\pm$ 1,6
Hoehn und Yahr [Wert $\pm$ SD]	3,0 $\pm$ 0,9	N/A	N/A
Levodopa-Herausforderungstest [% $\pm$ SD]	40 $\pm$ 20	N/A	N/A

PD: Parkinson-Krankheit; iRBD: isolierte REM-Schlaf-Verhaltensstörung; HC: gesunde Kontrolle; SD: Standardabweichung; NMSS: Skala zur Erfassung nicht-motorischer Symptome; MDS-UPDRS III: Skala zur Verlaufsbeobachtung bei PD Teil III; CCCSS: Cleveland-Clinics-Obstipations Punktesystem; N/A: nicht vorhanden

dung, Krankheitsdauer, Gedächtnis, Motorik, nicht-motorische Symptome, Konstipation und weitere Informationen sind in Tabelle 3.16 enthalten. Aufgrund eines zu hohen RBDSQ-Wertes ( $> 5$ ) wurden sechs Individuen der HC aus der Auswertung ausgeschlossen (daher  $n = 51$ ). Der Ausschluss dieser sechs HC führte zu keiner Veränderung der Signifikanzen in der Auswertung. Für die individuellen Patienten und Kontrollen (inklusive der sechs ausgeschlossenen Kontrollen) wurden die demographischen und klinischen Daten sowie die Aggregatkonzentrationen im Anhang in Tabelle 5.13 aufgelistet. Für die folgende Auswertung der sFIDA-Assays wurde ein Grenzwert von 0,0003 % der BC verwendet.

Es gab einen geschlechtsbezogenen Verzerrungseffekt für Männer in der PD- (69,1 %) und ausgeprägter in der iRBD-Kohorte (86,1 %). Für die HC war der geschlechtsbezogene Verzerrungseffekt in Richtung Frauen (60,8 %) verschoben. Das Alter der PD (64,5  $\pm$  9,9 Jahre) und iRBD-Patienten (66,3  $\pm$  6,4 Jahre) unterschied sich nicht signifikant, während die HC im Durchschnitt 8–10 Jahre jünger waren (56,4  $\pm$  17,1 Jahre). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Bildungsjahren zwischen den Kohorten detektiert werden. Die Erkrankungsdauer der PD-Patienten betrug 9,0  $\pm$  5,8 Jahre und für die iRBD-Patienten 7,4  $\pm$  5,5 Jahre. Die kognitive Leistung (DemTect Wert) von HC (15,9  $\pm$  2,3) war signifikant höher als die der PD- (13,8  $\pm$  3,3,  $p < 0,001$ ) und der iRBD-Patienten (14,8  $\pm$  2,3,  $p = 0,02$ ; s. Anhang, Abbildung 5.10 A) [45]. PD-Patienten hatten mit 24,1  $\pm$  14,9 Punkten im MDS-UPDRS III signifikant höhere ( $p < 0,001$ )



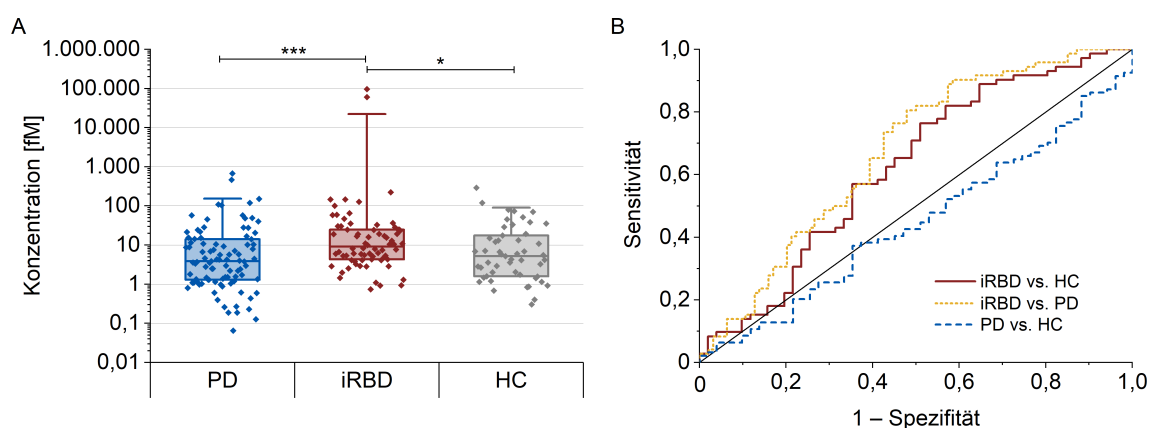
Werte als die iRBD-Patienten mit  $4,0 \pm 2,7$  Punkten [43]. Ebenso hatten PD-Patienten ( $30,6 \pm 23,1$ ) signifikant höhere ( $p < 0,001$ ) Punktzahlen für den NMSS als iRBD-Patienten ( $16,2 \pm 18,0$ ) oder HC ( $12,5 \pm 14,4$ ; s. Anhang, Abbildung 5.10 B) [44].

Des Weiteren litten PD-Patienten ( $5,3 \pm 2,6$ ) stärker unter Hyposmie (s. Anhang, Abbildung 5.10 C), was sich in einer signifikant niedrigeren ( $p < 0,01$ ) Anzahl an korrekt identifizierten Geruchsproben im Vergleich zu iRBD-Patienten ( $6,6 \pm 2,7$ ) oder HC ( $10,4 \pm 1,7$ ) widerspiegelte. Basierend auf dem CCCSS litten zudem PD-Patienten ( $4,1 \pm 4,0$ ) signifikant häufiger ( $p < 0,05$ ) unter Verstopfungen als iRBD-Patienten ( $2,8 \pm 2,7$ ) und HC ( $2,5 \pm 2,5$ ) (s. Anhang, Abbildung 5.10 D) [141]. Zusätzlich schnitten PD-Patienten ( $5,6 \pm 2,2$ ) signifikant höher ( $p < 0,001$ ) im Screening-Fragebogen für Parkinsonismus ab verglichen mit iRBD-Patienten ( $0,3 \pm 0,8$ ) und HC ( $0,3 \pm 0,8$ ; s. Anhang, Abbildung 5.10 E) [140]. Die Ergebnisse des RBDSQ (s. Anhang, Abbildung 5.10 F) wiesen ebenfalls signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) zwischen den iRBD- ( $9,0 \pm 2,7$ ) und PD-Patienten ( $4,9 \pm 3,0$ ) oder den HC ( $1,7 \pm 1,6$ ) sowie zwischen den PD-Patienten und den HC auf [40]. Durchschnittlich schnitten PD-Patienten mit  $3,0 \pm 0,9$  Punkten auf der Hoehn-und-Yahr-Skala und mit  $40\% \pm 20\%$  in dem Levodopa-Herausforderungstest ab [42].

#### 3.4.2.2 $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen sind in Stuhl von iRBD-Patienten erhöht

Schließlich wurde der sFIDA-Assay genutzt, um die  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentration in Stuhlproben von PD- und iRBD-Patienten sowie HC zu messen. Mithilfe des  $\alpha$ -Syn-SiNaP-Standards wurde der sFIDA-Messwert aller Stuhlproben kalibriert und die  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentration berechnet (s. Anhang, Tabelle 5.13). Statistische Analysen wurden mit nicht-parametrischen Tests durchgeführt, da keine der drei Kohorten eine Normalverteilung aufwies ( $p$ -Wert  $< 0,05$ ; s. Anhang Tabelle 5.14). Nach dem Kruskal-Wallis-H-Test war die mittlere Konzentration von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhlproben von iRBD-Patienten ( $9,2$  fM) im Vergleich zu der Konzentration in HC ( $5,2$  fM,  $p = 0,024$ ) sowie PD-Patienten ( $3,8$  fM,  $p < 0,001$ ) signifikant erhöht (Abbildung 3.28 A). Die Ergebnisse für die iRBD-Patienten blieben auch nach Ausschluss der höchsten Ausreißer signifikant (Daten nicht gezeigt). Zwischen den PD-Patienten und den HC konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die ROC-Kurven (s. Abbildung 3.28 B) zeigten eine hohe Sensitivität ( $> 75\%$ ) des sFIDA-Assays  $\alpha$ -Syn-Aggregate in Stuhl von iRBD-Patienten versus HC oder PD-Patienten zu detektieren, aber eine geringere Spezifität (iRBD vs. PD:  $52,1\%$ ; iRBD vs. HC:  $49,0\%$ ; s. Tabelle 3.17). Im Gegensatz dazu war der sFIDA-Assay höchst spezifisch ( $96,1\%$ ), aber deutlich weniger sensitiv ( $6,4\%$ )  $\alpha$ -Syn-Aggregate in Stuhl von PD-Patienten versus HC zu erkennen. Zusätzlich konnte eine schwache positive Korrelation mit einem Spearman-Korrelationskoeffizienten zwischen dem DemTect-Wert und der  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentration ( $r = 0,221$ ,  $p < 0,05$ ) und zwischen dem RBDSQ-Wert und der  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentration ( $r = 0,223$ ,  $p < 0,05$ ) festgestellt werden. Weitere Korrelationen zwischen der  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentration in Stuhlproben von PD- und iRBD-Patienten sowie HC und

### 3 ERGEBNISSE



**Abbildung 3.28 – Kalibrierte sFIDA-Ergebnisse und ROC-Kurven der Messung von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhlproben.**

(A) Die mittleren Konzentrationen der  $\alpha$ -Syn-Aggregate in Stuhlproben von iRBD-Patienten (9,2 fM) wiesen signifikant erhöhte Konzentrationen im Vergleich zu denen der HC (5,2 fM,  $p = 0,024$ ) oder PD-Patienten (3,8 fM,  $p < 0,001$ ) auf. Proben von PD-Patienten und HC unterschieden sich nicht signifikant. Die Boxen kennzeichnen obere und untere Quartile. Horizontale Linien innerhalb der Boxen stellen den Median dar. Signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten wurden mittels Kruskal-Wallis-H-Test berechnet. Die Sternchen (\*) spiegeln folgende Signifikanzen wieder: \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*:  $0,001 \leq p < 0,01$ , \*:  $0,01 \leq p < 0,05$ . Fehlerbalken stellen die Standardabweichung ( $\pm$  SD) dar. (B) Darstellung der dazugehörigen ROC-Kurven. Anhand der ROC-Kurven zeigte eine Unterscheidung von PD-Patienten versus HC im sFIDA-Assay eine Spezifität von 96,1 % und eine Sensitivität von 6,4 % mit einer Fläche unter der Kurve (AUC, engl.: *area under the curve*) von 0,447. Im Vergleich dazu zeigte eine Unterscheidung von iRBD-Patienten versus HC im sFIDA-Assay eine Spezifität von 49,0 % und einer Sensitivität von 76,4 % mit einer AUC von 0,622 (s. Tabelle 3.17 für weitere Spezifitäten und Sensitivitäten sowie p-Werte). Die Messung erfolgte am IN Cell Analyzer 6500HS Mikroskop bei 40x Vergrößerung. Grenzwert: 0,0003 %.

demographischen oder klinischen Daten wurden nicht beobachtet (s. Anhang, Tabelle 5.15).

**Tabelle 3.17 – Ergebnisse der ROC-Analyse auf Spezifität, Sensitivität und Fläche unter der Kurve (AUC) mit dem entsprechenden p-Wert für  $\alpha$ -Syn-Aggregate in Stuhlproben**

	Spezifität [%]	Sensitivität [%]	AUC	p-Wert
sFIDA-Messwert				
iRBD vs. HC	49,0	76,4	0,622	0,021
iRBD vs. PD	52,1	80,6	0,670	$1,81 \cdot 10^{-4}$
PD vs. HC	96,1	6,4	0,447	0,291

PD: Parkinson-Krankheit; iRBD: isolierte REM-Schlaf-Verhaltensstörung;

HC: gesunde Kontrolle; AUC: Fläche unter der Kurve

## 4 Diskussion und Ausblick

Bis heute wird eine Diagnose für PD nur anhand klinischer Parameter gestellt und teilweise bildgebende Verfahren genutzt, die zum einen erst in einer späten Phase von PD nach Einsetzen der motorischen Symptome erfolgen können und zum anderen sehr teuer und aufwendig sind [38]. Daher ist es sehr wichtig, Methoden zur Detektion von prodromalem PD und auch anderen Synucleinopathien zu entwickeln. Diese kann ebenfalls bei der Entwicklung neuer Therapien helfen, die effizienter zu Beginn einer Krankheit sind.

Aufgrund der Zusammensetzung von LB und LN, den neuropathologischen Hauptmerkmalen bei PD und anderen Synucleinopathien wurde aggregiertes  $\alpha$ -Syn als potentieller Biomarker ausgewählt, dem Hauptbestandteil der akkumulierten Proteine in LB und LN [51, 150]. Zudem führen seltene Mutationen im SNCA-Gen zu familiärer PD, was die Wichtigkeit von  $\alpha$ -Syn für die Erkrankung an PD hervorhebt [151]. Daraufhin wurde die  $\alpha$ -Syn-Konzentration von Aggregaten und auch Gesamt- $\alpha$ -Syn in verschiedenen Körperflüssigkeiten, hauptsächlich in Liquor, aber auch in Speichel oder Tränenflüssigkeit untersucht [88, 92, 152]. Da die Aggregatkonzentrationen in Körperflüssigkeiten sehr gering sind, werden hochspezifische und sensitive Methoden benötigt [108]. Daher wurde der sFIDA-Assay für die spezifische Detektion und Quantifizierung von  $A\beta_{1-42}$ -Aggregaten in Liquor entwickelt [116].

Diese Arbeit zielte im ersten Teil darauf ab, den hochspezifischen und sensitiven sFIDA-Assay für die erstmalige Detektion von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhlproben anzupassen und zu validieren. Im zweiten Teil wurden  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhlproben mittels sFIDA-Assay quantifiziert und untersucht, ob durch Messung von Stuhlproben Patienten von gesunden Kontrollen unterschieden werden können. Damit sollte die Eignung des sFIDA-Assays zur frühzeitigen Diagnose von PD oder prodromaler PD in Form von iRBD als diagnostischer Test getestet werden.

### 4.1 $\alpha$ -Syn-Aggregate sind in Stuhl vorhanden und können mittels sFIDA-Assay nachgewiesen werden

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Syn-Aggregate in Stuhl nachgewiesen werden können und durch die Assayentwicklung deren Detektion optimiert werden. Dies scheint zu bestätigen, dass  $\alpha$ -Syn-Aggregate vom Körper in das Lumen des Gastrointestinaltraktes sekretiert und in Stuhl ausgeschieden werden [96]. Den Ursprung und den Verbleib von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten im Gastrointestinaltrakt zu untersuchen, ist in Zukunft jedoch unerlässlich. Eine kürzlich veröffentlichte Studie bekräftigt diese Ergebnisse in Hinsicht auf  $A\beta$ , da sie in C57BL/6 Mäusen zeigen konnten, dass  $A\beta_{42}$  vom Blut in den Gastrointestinaltrakt abgesondert wird und im Kot nachweisbar ist. Zusätzlich konnte die Gruppe nachweisen, dass die Ausschei-

dung von A $\beta$ 42 durch das Darmmikrobiom beeinflusst wird [103].

Während der Assayvalidierung wurden die Assaybedingungen für Parameter wie Fänger-AK und Blockieren der Oberfläche, Probenbehandlung, Detektions-AK sowie Pufferlösungen optimiert, um das SRV, das PKV und auch die Sensitivität und die Spezifität des sFIDA-Assays zu verbessern [127]. Während der Assayvalidierung fiel auf, dass die Stuhlproben autofluoreszieren, was bedeutet, dass Signal in beiden Kanälen ohne Detektions-AK gemessen wurde, obwohl hier kein Signal erwartet wurde. Aus diesem Grund wurde ab diesem Zeitpunkt die Assayentwicklung unter Berücksichtigung der AF durchgeführt.

Stuhl ist eine hochkomplexe Matrix bestehend aus abgestorbenen Bakterien, unverbaubaren Essensbestandteilen wie Zellulose, Lipiden (z. B. Cholesterin), nicht-organischen Bestandteilen und Proteinen. Auch Zellschrott, abgesondert von der mukosalen Membran des Gastrointestinaltraktes, Bilirubin (Gallen Pigmente) oder abgestorbene Leukozyten sind weitere Stuhlbestandteile von Stuhl [153–155]. Es ist weithin bekannt, dass endogene Bestandteile wie Lipofuscin oder Flavine in Bakterien autofluoreszieren. Flavine zeigen z. B. grünen Bereich von 500 nm – 650 nm in ihrer oxidierten Form [156].

Bei Untersuchungen von Mausexkrementen konnten zudem diätabhängige Veränderungen in der Autofluoreszenz von Exkrementen, welche durch Bakterien verursacht wurden, festgestellt werden. Eine Alfalfa-reichhaltige Ernährung führe zu höherer AF, vor allem im tiefroten Bereich (695 nm – 770 nm), wobei die Autoren vermuteten, dass die AF aufgrund von Chlorophyll und dessen Abbauprodukten verursacht wurde, deren Emissionsmaxima bei 680 nm – 740 nm liegt [157, 158]. Die AF trat dabei über ein breites Spektrum von Wellenlängen auf, vor allem auch im grünen (515 nm – 575 nm) oder Nahinfrarot-Bereich (775 nm – 825 nm) [157, 159]. Es konnte auch gezeigt werden, dass Zellulose, ein Hauptbestandteil des Zytoskellets in Pflanzen, AF bei Anregungswellenlängen von 510 nm – 530 nm zeigte [160]. Diese Emissionsmaxima überschneiden sich mit denen der in dieser Arbeit verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlängen der Mikroskope im roten (CF633) und grünen (CF488A) Kanal, allerdings nicht für den blauen (CF405S) Kanal (vgl. Tabelle 2.14).

Auch bestimmte Lipide autofluoreszieren und könnten ebenfalls zu der AF der Stuhlextrakte beitragen [161]. Aufgrund der membranbindenden Eigenschaften von  $\alpha$ -Syn ist es auch möglich, dass Oligomere an Lipide gebunden sind, welche möglicherweise autofluoreszierende Eigenschaften aufweisen [162]. Da der Syn211-AK die C-terminale Domäne bindet und  $\alpha$ -Syn über den N-Terminus an Lipidmembranen bindet, wäre der C-Terminus somit für den AK zugänglich [162–164]. Dies würde die AF in diesem hochselektiven Immunoassay erklären, da eine Bindung von  $\alpha$ -Syn stattfindet.

Aufgrund der komplexen Matrix der Stuhlproben war es nicht ohne weiteres möglich, die autofluoreszierenden Komponenten zu bestimmen, weswegen der Assay so optimiert wurde, dass

die AF möglichst gering war und keinen Einfluss auf das Signal hatte. Eine Extraktion der Stuhlproben wurde zunächst mit Puffern mit mindestens 1 % BSA durchgeführt, was zu einer höheren AF der Stuhlproben führte. Der kommerziell erhältliche EliA-Extraktionspuffer zeigte hingegen eine Verringerung der AF. Zu Beginn wurden die Stuhlproben verdünnt, wobei ein Verdünnungspuffer mit 0,1 % BSA und 0,05 % Tween20 in TBS-PC die niedrigste AF erzielte. Dabei könnte Tween20 zu einer Verringerung der unspezifischen Bindungen geführt haben [117]. Ein zu hoher Anteil an BSA schien die Autofluoreszenz zu verstärken. Als eine weitere Maßnahme, die AF zu verringern, wurden die Stuhlproben sehr hoch verdünnt. So wurde kaum noch Autofluoreszenz gemessen, da die autofluoreszierenden Moleküle so stark verdünnt wurden, dass das gemessene Signal ebenfalls sehr gering und teilweise nur noch auf Höhe der BC war. Allerdings wurden  $\alpha$ -Syn-Aggregate ebenfalls stark verdünnt, was einen Vergleich verschiedener Varianten schwierig machte, da gemessene Unterschiede sehr gering waren und im Bereich der Standardabweichung lagen. Aus diesem Grund wurde zunächst eine 1:5 Verdünnung und später unverdünnte Stuhlproben verwendet. Durch die Optimierung des sFIDA-Assays in Bezug auf die Verringerung der AF konnte diese so weit reduziert werden, dass eine Verdünnung der Proben nicht mehr zu einer größeren Differenz zwischen Signal und AF führte. So war zu Beginn die AF häufig sogar höher als das gemessene Signal. Nach der Assayvalidierung betrug die AF dagegen nur noch durchschnittlich 29 % für den sFIDA-Messwert (vgl. Kapitel 3.3.4). Warum die AF zu Beginn größer als das Signal sein konnte ist unklar, allerdings ist es möglich, dass die autofluoreszierenden Bestandteile in Stuhl durch das Fluorophor der Detektionssonden teilweise abgeschwächt wurden [165].

Ob bakterielle, durch Chlorophyll, Zellulose, Lipide oder andere in humanen Stuhlproben enthaltene Bestandteile die AF verursachen, muss noch untersucht werden. Dazu könnte vor zukünftigen Probenahmen zunächst die Diät der Spender erfasst werden und so besonders zur AF beitragende Lebensmittel systematisch erfasst werden. Für weiterführende Probenahmen sollte dann zuvor ein Diätplan eingehalten werden, um so verursachte AF zu vermeiden.

Da ein veränderter Stuhlextraktionspuffer, Verdünnungspuffer und auch ein Einfrieren der Stuhlproben zu einer Reduktion der AF beitrugen, könnten bestehende Wechselwirkungen zwischen autofluoreszierenden Bestandteilen und  $\alpha$ -Syn z. B. aufgrund von pH-Wert-Veränderung aufgelöst worden sein. Mittels weiterer Forschung kann zukünftig so herausgefunden werden, welche Komponenten (oder welche Wechselwirkungen zwischen Komponenten) der Stuhlmatrix zu der AF beitragen bzw. diese verursachen. Außerdem kann eine Aufkonzentrierung oder Extraktion von  $\alpha$ -Syn aus den Stuhlproben wie eine PTA-Fällung oder Immundepetion getestet und verbessert werden. Alternativ kann auch nach der Probeninkubation ein Schritt zum Quenchen der autofluoreszierenden Komponenten eingeführt werden und erst im Anschluss die  $\alpha$ -Syn-Aggregate markiert werden [166]. Eine Detektion durch den Einsatz von Nanopartikeln, die durch Röntgenstrahlung angeregt werden ist eine weitere Möglichkeit, die AF zu umgehen, da biologische

Chromophore hierdurch kaum angeregt werden [167].

Wird davon ausgegangen, dass mögliche Moleküle, die AF verursachen, an  $\alpha$ -Syn gebunden sind, könnte BSA zu einer verbesserten Bindung von  $\alpha$ -Syn an den Fänger-AK geführt haben und eine Reduktion der AF wäre insgesamt nicht nötig gewesen.

Im Zuge der Assayvalidierung wurde der Syn211-AK in mehreren Assays als der Fänger-AK mit dem höchsten PKV validiert und eine Konzentration von 7,5  $\mu\text{g/mL}$  bestimmt. Als blockierendes Reagenz wurden verschiedene Moleküle wie BSA und MP sowie kommerziell erhältliche Blockierungslösungen aus Peptid- oder Caseinfragmenten getestet. Die kommerziellen Puffer führten teilweise zu einer starken Reduktion des Signals, aber nicht zu einer Verbesserung der Unterscheidbarkeit von Patienten- und Kontrollstuhlproben. Eine mögliche Erklärung könnte eine Wechselwirkung von Stuhlbestandteilen mit den Peptid- oder Caseinfragmenten sein, wodurch Infolgedessen die Bindung von  $\alpha$ -Syn an den Fänger-AK unterdrückt wurde. Allerdings gibt es bisher keine Nachweise darüber. BSA führte sowohl zu dem höchsten Signal als auch zu der höchsten AF. Es konnte gezeigt werden, dass BSA so wie  $\alpha$ -Syn Lipide bindet. Es besteht die Möglichkeit, dass die in Stuhlproben enthaltenen Lipide an BSA gebunden waren und so zu der erhöhten AF geführt haben [168]. Für MP sind bisher keine Interaktionen mit  $\alpha$ -Syn oder Lipiden beschrieben.

Auch als Detektions-AK wurde der Syn211-AK gewählt. Der 4B12-AK zeigte zwar eine deutlichere Unterscheidung von Patienten- und Kontrollstuhlproben in Bezug auf deren  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentration allerdings konnte der 4B12-AK die als Standard genutzten synthetischen  $\alpha$ -Syn-Aggregate weniger effizient erkennen, was zu einer geringeren Differenzierung der Konzentrationen führte (Abbildung 3.22 A). Der Syn211-AK ist ein hochspezifischer AK, der nur humanes  $\alpha$ -Syn und das aus Zebrafischen erkennt und keine Kreuzreaktivität mit  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Syn zeigt [119]. Der 4B12-AK ist ebenfalls spezifisch für humanes  $\alpha$ -Syn und detektiert im Western-blot monomeres, oligomeres und fibrilläres  $\alpha$ -Syn aus LB zeigt allerdings unspezifische Banden in  $\alpha$ -Syn *knock-out* Neuronen [169].

Eine Möglichkeit, warum der 4B12-AK im sFIDA-Assay die synthetischen  $\alpha$ -Syn-Aggregate weniger effizient erkannte, könnte sein, dass die Epitope 103-108, die der AK erkennt, in den synthetischen  $\alpha$ -Syn-Aggregaten aufgrund ihrer Tertiärstruktur nicht zugänglich waren. Strukturelle Untersuchungen der hergestellten synthetischen  $\alpha$ -Syn-Aggregate sollten daher durchgeführt werden. Zusätzlich erkannte der 4B12-AK als Detektions-AK  $\alpha$ -Syn-Monomere eher als der Syn211-AK (s. Abbildung 3.22 B), was dadurch zustande gekommen sein könnte, dass der Syn211-AK, welcher als Fänger-AK eingesetzt wurde und der 4B12-AK keine überlappenden Epitope besitzen [170]. Dies könnte sich dann ebenfalls auf den sFIDA-Messwert ausgewirkt haben, da aufgrund der hohen Monomerkonzentration kolokalisiertes Signal entstand. Neben dem Detektions-AK selber wurde auch der Detektions-AK-Puffer optimiert. Die Zugabe von 0,1 % BSA

und Tween20 führte durch das Blockieren von unspezifischen Bindestellen und Stabilisierung des AK zu einer spezifischeren Bindung des Detektions-AK an  $\alpha$ -Syn-Aggregate und somit zu einer Verringerung des Hintergrundsignals und einer verbesserten Detektion von  $\alpha$ -Syn [117, 171].

Um herauszufinden, ob die Signale der  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentration für die Kalibrierkurve und in den Stuhlproben ähnlich war, wurden synthetische Aggregate in Stuhlproben *gespiked*. Hier zeigte sich eine geringe Wiederfindungsrate mit abnehmender Verdünnung der Stuhlprobe (s. Abbildung 3.17). In einer 1:50 und 1:25 Verdünnung der Stuhlprobe konnte noch eine Zunahme des sFIDA-Messwertes mit steigender Aggregatkonzentration beobachtet werden. Bei unverdünntem Stuhl war kein Unterschied mehr zwischen den verschiedenen Aggregatkonzentrationen zu erkennen. Dies könnte an der komplexen Matrix von Stuhl liegen, dessen Komponenten die Bindung der Aggregate an die AK teilweise inhibieren könnten [154, 155]. Es ist auch möglich, dass die synthetischen Aggregate in Stuhlhomogenaten durch noch aktive Proteasen abgebaut wurden und deshalb nicht mehr detektierbar waren [172, 173]. Trotz des Zusatzes eines Proteaseinhibitor-Cocktails in den Stuhlextraktionspuffer, der zu einer Steigerung des Signals bei Stuhlproben durch die Inaktivierung von in Stuhl vorhandenen und während der Extraktion freigesetzten Proteasen führte, könnten die synthetischen Aggregate aufgrund einer abweichenden Struktur oder fehlenden Wechselwirkungen anfälliger für einen proteolytischen Abbau gewesen sein [174, 175]. Durch zukünftige Inkubationsstudien könnte getestet werden, ob die Signalreduktion durch einen Abbau oder durch die Maskierung der Aggregate verursacht wird, indem Aggregate unterschiedlich lange in Stuhl inkubiert werden.

Daher kann angenommen werden, dass die gemessenen Aggregatkonzentrationen in Stuhlproben deutlich unter dem lagen, was tatsächlich in den Stuhlproben vorhanden war. Für eine weiterführende analytische Validierung sollte der Verdünnungspuffer des Kalibrationsstandards an die Eigenschaften der Stuhlproben angepasst werden, um die  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentration akkurater bestimmen zu können.

Um Matrixeffekte zu beseitigen, wurde versucht, mittels einer PTA-Fällung  $\alpha$ -Syn-Aggregate aus den Stuhlproben aufzureinigen. Für Maus-Hirnhomogenate konnte so eine Aufkonzentrierung von Prionen erzielt werden [176]. Aufgrund der prionenähnlichen Eigenschaften von  $\alpha$ -Syn lag es nahe, diese Methode ebenfalls für die Aufreinigung von  $\alpha$ -Syn zu testen. So konnten aus Hirnhomogenaten von MSA-Patienten, allerdings nicht von PD-Patienten, in der Vergangenheit pathogene  $\alpha$ -Syn-Prionen erfolgreich aufkonzentriert werden, allerdings ist der Mechanismus durch den die Fällung erfolgt noch weitestgehend ungeklärt [177, 178]. Es konnte im sFIDA-Assay zwar eine Signalsteigerung in PTA-gefällten Stuhlproben beobachtet werden, allerdings war auch die AF deutlich gesteigert und somit auch die Differenz zum Signal geringer im Vergleich zu Stuhlproben ohne PTA-Fällung. Die erhöhte AF könnte unter der Annahme, dass die PTA-Fällung nicht erfolgreich war, daher zustande kommen, dass durch die Zentrifugation und das anschließende

Lösen des Pellets in einer kleinen Menge an Puffer im Vergleich zum Ausgangsvolumen neben  $\alpha$ -Syn-Aggregaten auch autofluoreszierende Komponenten aufkonzentriert werden.

Es wäre auch möglich, dass Komponenten der PTA-Fällung zu der AF beitragen. Obwohl die mitgeführte Pufferkontrolle für die PTA-Fällung kein erhöhtes Signal im Vergleich zur Pufferkontrolle ohne PTA-Fällung zeigte (s. Abbildung 3.19), ist es wahrscheinlich, dass aufgrund von fehlenden Interaktionspartnern das PTA nicht pelletiert wurde und so nicht im Assay gemessen wurde. Es wurde gezeigt, dass verschiedene Wolframate wie z. B. das hier verwendete Natrium-Wolframat Lumineszenz z. B. durch ultraviolette Strahlung aufweisen [179], was das hier gesteigerte Signal erklären könnte. Für Sarkosyl sind keine fluoreszierenden Eigenschaften beschrieben. Aufgrund der hohen AF konnte die PTA-Fällung für Stuhlproben nicht verwendet werden, um  $\alpha$ -Syn-Aggregate aus Stuhlproben aufzukonzentrieren und im sFIDA-Assay zu messen.

Die Verbesserung und Anpassung des Assays für Stuhlproben war so weit abgeschlossen, dass eine Messung aller vorhandenen Stuhlproben durchgeführt wurde. Daher wurde für die abschließende Assayvalidierung und die Messung von 223 Stuhlproben von PD und iRBD-Patienten und Kontrollen unverdünnte, nicht weiter behandelte Stuhlhomogenate verwendet.

### **4.2 Abschließende Assayvalidierung und quantitative Probenmessung**

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass  $\alpha$ -Syn-Aggregate in Stuhl quantifiziert werden können und dass der sFIDA-Assay hoch sensitiv und sehr spezifisch ist. Die Messung von Stuhlproben im sFIDA-Assay kann zukünftig ebenfalls die Bestimmung der  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentration für eine mögliche Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen ermöglichen.

Aufgrund der meist sehr geringen Konzentration an Analyten in Körperflüssigkeiten sollte der sFIDA-Assay möglichst sensitiv sein [108]. Die LOD-Berechnung erfolgte anhand der BC, wobei die mittlere LOD bei 0,3 fM lag. Für synthetische  $\alpha$ -Syn-Aggregate lag der LOD bei 1,77 pM, wobei die Konzentration vermutlich deutlich unterschätzt wurde, da sich die Aggregatkonzentration auf die eingesetzte Monomerkonzentration bezog. Die als Standard und zur Kalibration eingesetzten  $\alpha$ -Syn-SiNaPs konnten im attomolaren Konzentrationsbereich nachgewiesen werden und dienten der Umrechnung von Pixel-Werten bzw. sFIDA-Messwerten in molare Konzentrationen.

Durch Immundepletion sowie der Messung von Konzentrationsreihen von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten und  $\alpha$ -Syn-SiNaPs konnte gezeigt werden, dass der für Stuhl angepasste sFIDA-Assay  $\alpha$ -Syn spezifisch und sensitiv über einen großen Konzentrationsbereich nachweisen konnte.



Weglassen des Syn211-Fänger-AK oder Detektions-AK, durch den Austausch des Syn211-Fänger-AK gegen einen A $\beta$ -spezifischen AK oder durch den Wechsel des Substrats zu  $\alpha$ -Syn-Monomeren, A $\beta$ -Aggregaten oder A $\beta$ -SiNaPs konnte gezeigt werden, dass der für Stuhl angepasste sFIDA-Assay  $\alpha$ -Syn-Aggregat- und  $\alpha$ -Syn-SiNaPs-Konzentrationen sehr spezifisch und sensitiv über einen großen Konzentrationsbereich misst.

Die Reduktion des Signals nach der Kontroll-Immundepletion könnte durch proteolytischen Abbau oder Zerfall von Aggregaten während der Inkubation bei Raumtemperatur oder unspezifisches Anhaften von Aggregaten an die Dynabeads begründet sein. Die synthetischen Aggregate könnten dafür anfälliger sein, da sie nicht in einer komplexen Matrix vorliegen, wie die Aggregate in Stuhlproben oder durch die Bindung an den SiNaP-Grundkörper geschützt sind [175].

Nach der Messung aller Stuhlproben der Patienten- und Kontroll-Kohorten wurde eine Überschneidung der  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen in Stuhlproben von Patienten und gesunden Kontrollen beobachtet. Für eine Unterscheidung von iRBD-Patienten von gesunden Kontrollen konnte eine Spezifität von 49,0 % und eine Sensitivität von 76,4 % erreicht werden. Für die Unterscheidung von iRBD-Patienten von PD-Patienten konnte eine Spezifität von 52,1 % und einer Sensitivität von 80,6 % erreicht werden. Eine Unterscheidung von PD-Patienten von gesunden Kontrollen war nicht möglich. Die Ergebnisse waren weniger spezifisch, aber mit einer Sensitivität von 70 % – 80 % zeigte der sFIDA-Assay eine ähnlich hohe Sensitivität wie andere Studien mit dem Ziel  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen in Liquor-Proben verschiedener Synucleinopathien von gesunden Kontrollen zu unterscheiden [120, 180, 181]. Da dies der erste Assay ist, der  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen in Stuhl quantifiziert, ist ein Vergleich unserer Ergebnisse mit früheren Studien, z. B. in Liquor nicht uneingeschränkt möglich.

Alle gemessenen Stuhlproben besaßen Konzentrationen über der berechneten LOD mit Werten zwischen 0,1 fM und 100 pM, wobei 87 % der Stuhlproben Konzentrationen zwischen 1 fM und 300 fM aufwiesen. Überraschenderweise zeigten iRBD-Patienten signifikant erhöhte  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Im Gegensatz dazu zeigten Stuhlproben von PD-Patienten nicht nur signifikant geringere Konzentrationen von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten als die von iRBD-Patienten, sondern auch keinen Unterschied zu gesunden Kontrollen (s. Abbildung 3.28 A). In Liquor wurde bereits gezeigt, dass  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen in PD- und iRBD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht waren [92, 120, 180, 182]. Auch in dieser Studie konnte eine signifikante Erhöhung der  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentration in iRBD-Patienten zu gesunden Kontrollen beobachtet werden, allerdings nicht in PD-Patienten. Zudem haben mehrere longitudinale Studien gezeigt, dass PD-Patienten mit fortschreitender Krankheit einen Anstieg von aggregiertem  $\alpha$ -Syn in Liquor aufweisen [183, 184].

Eine Erklärung dafür, warum wir keinen Anstieg der  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen im Stuhl von PD-Patienten oder eine Korrelation mit dem Alter oder der Krankheitsdauer beobachtet haben,

könnten die kürzlich vorgeschlagenen ZNS-*originären* und PNS-*originären* PD-Untergruppen mit unterschiedlicher Beeinträchtigung des ENS sein, was es schwieriger macht, einen Unterschied zu gesunden Kontrollen zu beobachten [58, 185, 186]. Dennoch ist die Unterscheidung zwischen potenziellem ZNS-*originären* und PNS-*originären*-PD bei *de-novo*-PD mit Hilfe der PSG zur Erkennung von RBD am zuverlässigsten. Da wir eine PD-Stichprobe im mittleren Stadium und nur eine fragebogenbasierte Bewertung der RBD-Symptome hatten, konnten wir unsere PD-Patientenkohorte nicht zuverlässig in ZNS-*originären* und PNS-*originären*-PD-Untergruppen trennen.

Eine weitere Erklärung könnte sein, dass unterschiedliche biologische Mechanismen die Konzentration von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhl und Liquor von PD-Patienten kontrollieren. Es könnten mehr  $\alpha$ -Syn-Aggregate in Stuhl während der prodromalen und frühen Phase von PD und weniger in fortgeschrittenen Stadien ausgeschieden werden, ähnlich der Abnahme an A $\beta$ 42 in Liquor während des Krankheitsverlaufs bei Alzheimer [187]. Es könnte auch spekuliert werden, dass die  $\alpha$ -Syn-Aggregate in Stuhl während der sehr frühen Krankheitsstadien eventuell nicht ausschließlich in den Gastrointestinaltrakt durch betroffene submukosale Neuronen abgesondert werden, sondern auch durch systemische Entfernungsmechanismen für  $\alpha$ -Syn-Aggregate über die Leber und Galle, die im Laufe der Krankheit ineffizienter werden. Dies könnte erklären, warum  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen in Stuhl und Liquor während der frühen Krankheitsstadien korrelieren, aber weniger in späteren Phasen. Um die Dynamik von  $\alpha$ -Syn-Aggregat-Ausscheidung oder Freisetzung in Stuhl besser zu verstehen, müssen die Konzentrationen in longitudinal gesammelten Stuhlproben von iRBD- und PD-Patienten erfasst werden.

Die hier gemessenen Daten zeigen, dass iRBD-Patienten mit einem hohen Risiko Synucleinopathien zu entwickeln, signifikant höhere Konzentrationen an  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhl im Vergleich zu gesunden Kontrollen haben, was den Nutzen des sFIDA-Assays prodromales PD zu detektieren, hervorhebt [30]. Stuhl ist nun neben Liquor, Haut und Nasenschleimhaut, in denen sich  $\alpha$ -Syn-Aggregate in iRBD-Patienten ansammeln, eine zusätzliche wertvolle und einfach zugängliche Ressource mit einem Potenzial für diagnostische Zwecke [180, 188–190]. Ob iRBD-Patienten mit hohen  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen eher zu PD, DLB oder MSA konvertieren oder mit einer größeren Wahrscheinlichkeit eine bestimmte Art von Synucleinopathien entwickeln, muss noch geklärt werden. Interessanterweise wurden ebenfalls hohe  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen in Stuhl mancher Kontrollen gemessen. Dies könnte entweder an einer prodromalen iRBD-/PD-Pathologie oder anderen Faktoren liegen, die eine krankheitsunabhängige Aggregation von  $\alpha$ -Syn im Gastrointestinaltrakt verursachen. Studien zu Gastrointestinaltrakt-Entzündung wiesen einen Zusammenhang zwischen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (CED; engl.: *inflammatory bowel disease*, IBD) bzw. einem krankhaft veränderten Mikrobiom und erhöhter  $\alpha$ -Syn Aggregation nach [191, 192]. In Bezug auf die oben genannte Vermutung könnte es ebenso bedeuten, dass diese Personen ein noch sehr effizientes Entsorgungssystem für  $\alpha$ -Syn-

Aggregate in Stuhl besitzen. Es wird ebenfalls kontrovers diskutiert, ob  $\alpha$ -Syn in physiologischer Form als intrinistisch ungeordnetes Monomer oder auch als Tetramer vorliegt [193–195]. Eine Tetramerkonformation wäre mit dem sFIDA-Assay nachweisbar, was die zum Teil hohen Konzentrationen der gesunden Kontrollen erklären könnte. Allerdings liefert dies keine Erklärung, warum nicht in allen gesunden Kontrollen hohe Konzentrationen gemessen wurden.

Es wird von entscheidender Bedeutung für die Präzision und den diagnostischen Nutzen des sFIDA-Stuhl-Assays sein, ob diese Personen andere prodromale Anzeichen von PD zeigen und im Verlauf ebenfalls an PD oder einer verwandten Synucleinopathie erkranken oder nicht. Eine longitudinale Messung von Stuhlproben von PD-Patienten und gesunden Kontrollen kann helfen, das Ausscheidungsprofil von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhl zu verstehen und so letztendlich PD-Patienten von gesunden Kontrollen zu unterscheiden.

### 4.3 Limitierungen und Ausblick

Die sFIDA-Messung von Stuhlproben hat auch mehrere Limitationen. Aufgrund der Spezifität des Syn211-AK, der die Epitope 121–125 von  $\alpha$ -Syn erkennt, kann der sFIDA-Assay  $\alpha$ -Syn-Aggregate, die ausschließlich aus Fragmenten bestehen, denen der C-Terminus mit diesem Epitop fehlt oder bei denen dieses Epitop an Tyrosin 125 posttranslational nitruiert oder phosphoryliert ist, nicht detektieren [79, 119]. Die Häufigkeit an  $\alpha$ -Syn-Aggregaten, bei denen innerhalb eines Aggregats allen  $\alpha$ -Syn-Proteinen dieses spezielle Epitop fehlt oder es maskiert ist, dürfte jedoch sehr gering sein. Des Weiteren lassen aktuelle Studien vermuten, dass Tyrosin 125 in  $\alpha$ -Syn bei PD und DLB nicht phosphoryliert wird [196]. Außerdem unterscheidet sFIDA nicht zwischen jenen  $\alpha$ -Syn-Aggregaten, die *seeding*-inkompetent oder harmlos für Neurone sind (*off-pathway*) und solchen, die schädlich für Neurone sein können (*on-pathway*) [197, 198].

Die vorliegende Arbeit dient als Grundstein für weitere Forschungen. Zukünftig könnte die Sensitivität und Spezifität des Assays z. B. durch eine Kombination von Messungen von aggregiertem  $\alpha$ -Syn mit weiteren potenziellen Biomarkern wie phosphoryliertem  $\alpha$ -Syn, Tau, GFAP oder NFL, die im ENS exprimiert werden und eventuell während der frühen Krankheitsphase verändert sein können verbessert werden [25, 27, 28, 199]. Ein weiterer Ansatz, diesen Assay zu verbessern, könnte eine Extraktion und Aufkonzentrierung der  $\alpha$ -Syn-Aggregate aus Stuhlproben sein, wie z. B. durch eine Immunpräzipitation vor der Quantifizierung. Die hier durchgeführte Immundepletion hat gezeigt, dass im sFIDA-Assay spezifisch  $\alpha$ -Syn-Aggregate gemessen werden. Jedoch zeigten manche Proben nach der Immundepletion ein erhöhtes Signal, was durch die Inkubation bei RT verursacht worden sein könnte. Eine Anpassung des Protokolls sollte vorgenommen werden und die Inkubation z. B. bei 4 °C über Nacht durchgeführt werden. Anschließend könnten die Aggregate von den Dynabeads wieder abgelöst werden, wobei ein schonendes Protokoll ange-

wendet werden sollte, damit die Aggregate ihre Konformation beibehalten.

Die Ernährung und das Darmmikrobiom beeinflussen wahrscheinlich die Detektion von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhl [135]. Stuhl besitzt eine komplexe Matrix, die Wasser, Proteine, Fettsäuren, Polysaccharide, bakterielle Biomasse, unverdaute Essensreste und Gallenflüssigkeit enthält, die die Antikörperbindung inhibieren können und  $\alpha$ -Syn-Aggregate von der Detektion abschirmen könnten [153–155]. Stuhl enthält zudem Proteasen, deren Aktivität durch das Mikrobiom verändert werden kann [172, 173]. Die Proteasen können während der Prozessierung der Stuhlproben noch aktiv sein, weshalb die gemessenen  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen als ein unteres Limit der vorhandenen  $\alpha$ -Syn-Aggregate angesehen werden müssen.

Ein Einsatz von Lipasen zum Abbau diverser Fettsäuren, die die effiziente Bindung von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten an die AK behindern oder auch zur AF beitragen könnten, ist auch eine mögliche weitere Verbesserung des Assays. Auch könnten zusätzliche Messungen von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Gewebe oder weiteren Körperflüssigkeiten neben der alleinigen Messung von Stuhlproben weiter die Sensitivität und Spezifität des sFIDA-Assays verbessern und so die diagnostische Genauigkeit steigern [180, 188–190]. Auch das Messen von Stuhlproben anderer neurodegenerativer Erkrankungen kann zu neuen Erkenntnissen über die Ausscheidung von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten und damit zu einer verbesserten Diagnose dieser Erkrankungen beitragen.

Es konnten bereits  $\alpha$ -Syn-Oligomere in z. B. Urin, Speichel und Tränen nachgewiesen werden [86, 89, 200]. Daher wurde bei der Probensammlung zur Erstellung der Biobank nicht nur Stuhl, sondern auch Urin, Speichel und Tränenflüssigkeit gesammelt. Eine Optimierung des sFIDA-Assays kann auch für diese Körperflüssigkeiten vorgenommen werden, um die Ergebnisse für Stuhl mit denen der anderen Körperflüssigkeiten zu vergleichen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass  $\alpha$ -Syn-Aggregate in Stuhl ausgeschieden werden und mit dem sFIDA-Assay gemessen werden können, was eine Diagnose von prodromalen Synucleinopathien ermöglichen könnte. Dies kann wertvoll für die Entwicklung von Therapien sein, die auf frühe Krankheitsstadien abzielen, was zu einer besseren Wirksamkeit führen könnte.

## 5 Anhang

### 5.1 Anhang Material und Methoden

#### 5.1.1 Anhang Material

**Tabelle 5.1 – Verwendete Chemikalien, Hersteller und Artikelnummer**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	440140-100ML
6-Maleinimido-hexansäure (MIHA)	abcr GmbH, Karlsruhe, Deutschland	55750-53-3
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	E7750
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	M6250
BSA, Album Fraktion V	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A6588.0050
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (Na <sub>2</sub> EDTA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A2937
cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche, Basel, Schweiz	50-100-3301
N, N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	227056-1L
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	276855
Dynabeads, Protein G	Invitrogen, Waltham, USA	10004D
fettfreies, getrocknetes Milchpulver (MP, <i>nonfat dried milk powder</i> )	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A0830
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A2942
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	S5881
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	6885
N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz (Sarkosyl)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	5322974
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	130672

Polyacrylamid-Suspension Bio-Gel P 30 Gel	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA	1504154
Natrium-phosphorwolframat (PTA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	P6395
ProClin 300 (PC)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	48912-u
Tris	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A2264
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	abcr GmbH, Karlsruhe, Deutschland	AB121644
Tween20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A4974

**Tabelle 5.3 – Verwendete Verbrauchsmaterialien, Hersteller und Artikelnummer**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
Greiner-Platte (Sensoplate Plus 384 Well, <i>f</i> -Bottom, Glass Bottom, Black, Single Packed)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhäuser, Deutschland	781856
1,5 mL Mikroröhre Protein <i>low-binding</i> mit Schraubverschluss	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	72.703.600
Papier-Stuhlfänger	MED+ORG Alexander Reichert GmbH, Niedereschach, Deutschland	MUO61000
pH-Teststreifen, pH: 4,5–10	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland	92120
2 mL Pierce Centrifuge Columns	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Scientific/Pierce	89896
Pipettierwanne schmal mit Unterteilung (25 mL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	8095
Pipettierwanne groß 100 mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	8085

**Tabelle 5.2 – Verwendete Peptide, Fragment und Hersteller**

<b>Peptid</b>	<b>Fragment</b>	<b>Hersteller</b>
$\alpha$ -Syn-Peptidfragment	AS 115–130	Peptides and Elephants, Henningsdorf, Deutschland
A $\beta$ -Peptidfragment	AS 1–15	Peptides and Elephants, Henningsdorf, Deutschland

1,5 mL Reaktionsgefäß, <i>low-binding</i>	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland	30108116
2 mL Reaktionsgefäß, <i>low-binding</i>	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland	30108132
SealPlate Film, steril	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	Z369667-100EA
Simplix-Stuhlprobenröhrchen, 15 mg, 4 Rillen einseitig	Gaudlitz, Coburg, Deutschland	T0001860-02-00- 20
Spritzenfilter PDVF Filter (0,22 µm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	P666.1
Stuhlröhrchen (15 mL) mit Schraubverschluss braun und mit integriertem Löffel im Deckel	Ratiomed GmbH, Regensburg, Deutschland	MWR122171
200 µL Spitzen, <i>Low Retention</i>	Sarstedt	70.760.107
Thermo-Platte (384-Well- Glasboden-Mikrotiterplatte)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	164586
1,5 mL Ultrazentrifugations-Tubes	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland	357448
UV-Küvetten, 50 µL	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland	
Zentrifugenröhrchen (Falcon) 15 mL	VWR International, Radnor, USA	734-0451

Tabelle 5.4 – Verwendete Geräte und Hersteller

Gerät	Hersteller
Celldiscoverer 7 (CD7)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
IN Cell Analyzer 6500HS	GE Healthcare, Chicago, USA
Magnetrack ( <i>16-Tube SureBeads Magnetic Rack</i> )	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Mikroplattenwaschgerät (405 LS Microplate Washer)	BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA
Sonopuls Ultraschallhomogenisator	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Thermomixer (ThermoMixer C)	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Sterilbank	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland

TIRFM	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Ultraschallbad Ultrasonic Celaner USC-THD/HF	VWR International, Radnor, USA
Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Optima MAX-XP)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
UV/Vis-Spektrophotometer	Shimadzu, Kyōto, Japan

---

### 5.1.2 Anhang Methoden

#### 5.1.2.1 Datenanalyse

In Tabelle 5.6 sind alle für die Auswertungen verwendeten Grenzwerte aufgelistet. Wurde der prozentuale Grenzwert verwendet, wurden keine exakten Werte angegeben, da je nach Versuch mehrere BC für die unterschiedlichen Versuchsbedingungen verwendet wurden. Wurde ein manueller Grenzwert verwendet wurden die Werte für Kanal 1 und 2 angegeben.



**Tabelle 5.5 – Verwendete Software und deren Hersteller**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Citavi 6.14	Swiss Academic Software GmbH; Waedenswil, Schweiz
IBM SPSS Statistics 28.0.1.1 (15)	IBM, Armonk, USA
OriginPro 2020 SR1	OriginLab Corporation, Northampton, USA
sFIDAta Softwaretool 0.16.4	Intern entwickelt
SigmaPlot 11.0	Systat Software, Frankfurt am Main, Deutschland

**Tabelle 5.6 – Übersicht der Grenzwerte für die einzelnen Versuche**

<b>Experiment</b>	<b>Grenzwert Kanal 1/Kanal 2</b>
<b>Exp. 1</b>	man. Grenzwert: 3000/1800
<b>Exp. 2</b>	man. Grenzwert: 850/1450
<b>Exp. 3</b>	0,1 %
<b>Exp. 4</b>	man. Grenzwert: 2000/3000
<b>Exp. 5</b>	man. Grenzwert: 3000/3000
<b>Exp. 6</b>	0,1 %
<b>Exp. 7</b>	man. Grenzwert: 5000/5000
<b>Exp. 8</b>	0,01 %
<b>Exp. 9</b>	man. Grenzwert: 5000/7000
<b>Exp. 10</b>	man. Grenzwert: 5000/5000
<b>Exp. 11</b>	man. Grenzwert: 2000/1000
<b>Exp. 12</b>	0,01 %
<b>Exp. 13</b>	0,01 %
<b>Exp. 14</b>	0,001 %
<b>Exp. 15</b>	man Grenzwert: 1500/1500
<b>Exp. 16</b>	0,01 %

## 5.2 Anhang Ergebnisse

### 5.2.1 Auswahl des blockierenden Reagenzes und Vergleich von Stuhlprobenverdünnungen

In Abbildung 5.1 ist der Vergleich der blockierenden Reagenzien BSA, MP, BS und SB für 1:400 verdünnte Stuhlproben dargestellt und in Abbildung 5.2 ist der Vergleich der blockierenden Reagenzien BSA, MP, BS und SB für 1:600 verdünnte Stuhlproben dargestellt.

Abbildung 5.2 zeigt die Messung der AF für eine 1:600 verdünnte PD-Patientenstuhlprobe nach Blockieren mit BSA, MP, BS oder SB.

In Tabelle 5.7 zeigt die Differenz von Signal und AF für die 1:600 verdünnte Stuhlprobe für jedes blockierende Reagenz.

### 5.2.2 Vergleich des Stuhl-Extraktionspuffers

### 5.2.3 Vergleich von frischen und gefrorenen Replikaten und Reproduzierbarkeit der Stuhlextraktion

Zur besseren Übersicht wurde das Ergebnis für die zuvor eingefrorenen Proben als logarithmische Darstellung aufgeführt, sodass die Unterschiede der niedrigen zweiten Kontrolle ebenfalls dargestellt werden konnten.

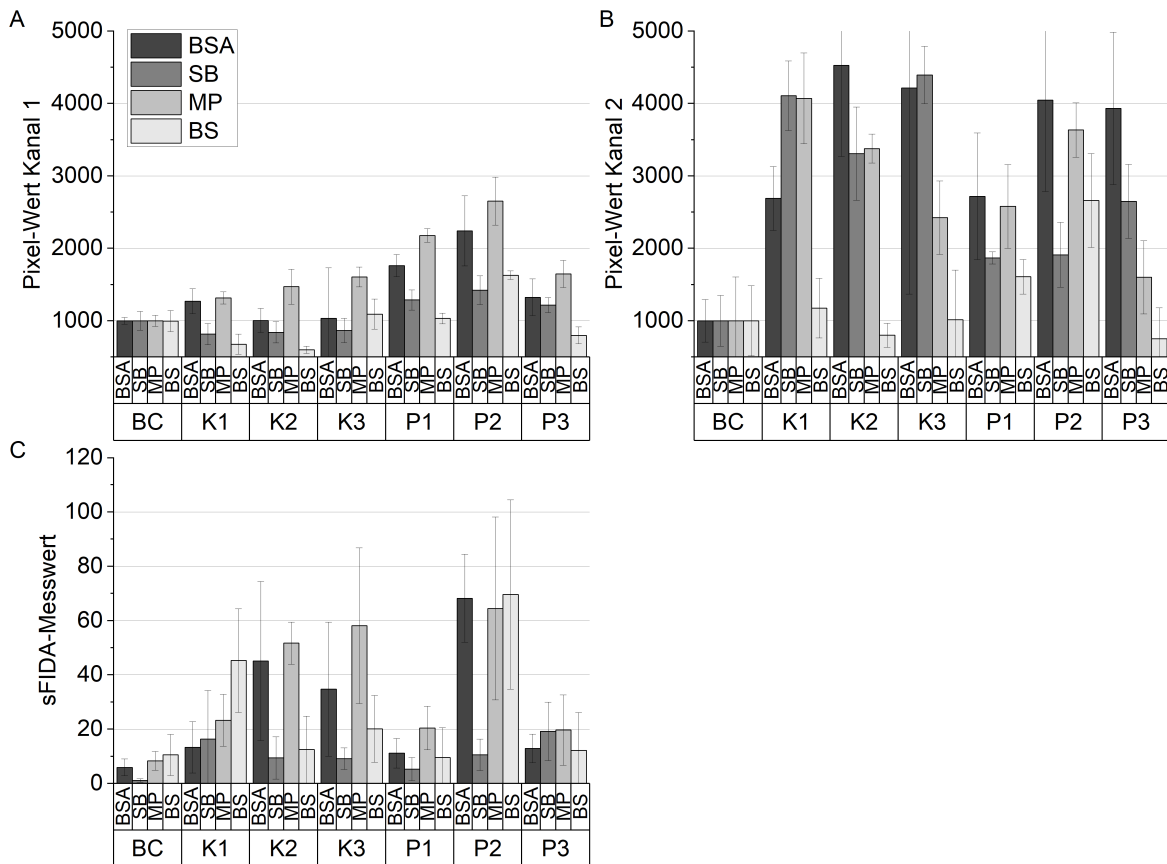
### 5.2.4 Analytische Validierung: Wiederfindungsrate von $\alpha$ -Syn-Aggregaten in verschiedenen Stuhlverdünnungen

Zusätzlich zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde die AF für die Verdünnungen der Kontrollstuhlprobe mitgemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.5 dargestellt.

In Tabelle 5.11 ist die Differenz von Signal und AF für alle Stuhlverdünnungen bzw. der unverdünnten Stuhlprobe aufgeführt.

**Tabelle 5.7 – Abgezogene AF vom Signal für einen Patientenstuhlprobe für die 1:600 Verdünnung für das jeweilige blockierende Reagenz**

blockierendes Reagenz	0,5 % BSA	SB	1 % MP	BS
Kanal 1	-216,4	385,3	<b>1189,5</b>	899,8
Kanal 2	2391,4	3805,8	<b>4891,3</b>	2975,0
sFIDA-Messwert	30,8	21,6	31,7	<b>45,3</b>

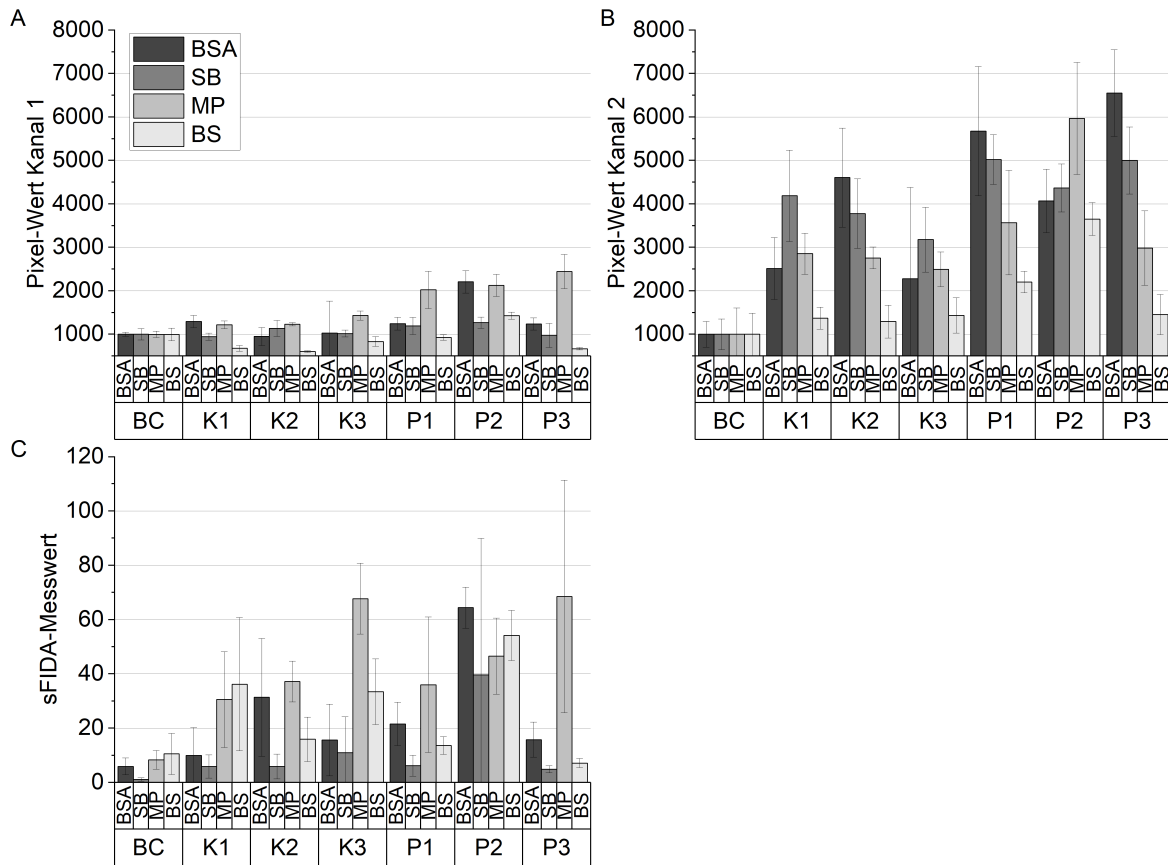


**Abbildung 5.1 – Vergleich der blockierenden Reagenzien BSA, MP, BS und SB für 1:400 verdünnte Stuhlproben.**

(A–C) zeigen die verschiedenen blockierenden Reagenzien jeweils mit Detektions-AK für 1:400 verdünnte Stuhlproben, wobei je nach Stuhlprobe unterschiedliches Blockieren vorteilhaft war. BS zeigte allerdings für fast alle Stuhlproben ein sehr geringes Signal und SB wies für Kontrollstuhlproben ein höheres Signal und für Patientenstuhlproben ein niedriges Signal auf. Die Messung erfolgte am TIRFM in 100x Vergrößerung. Grenzwert: 0,1 %.

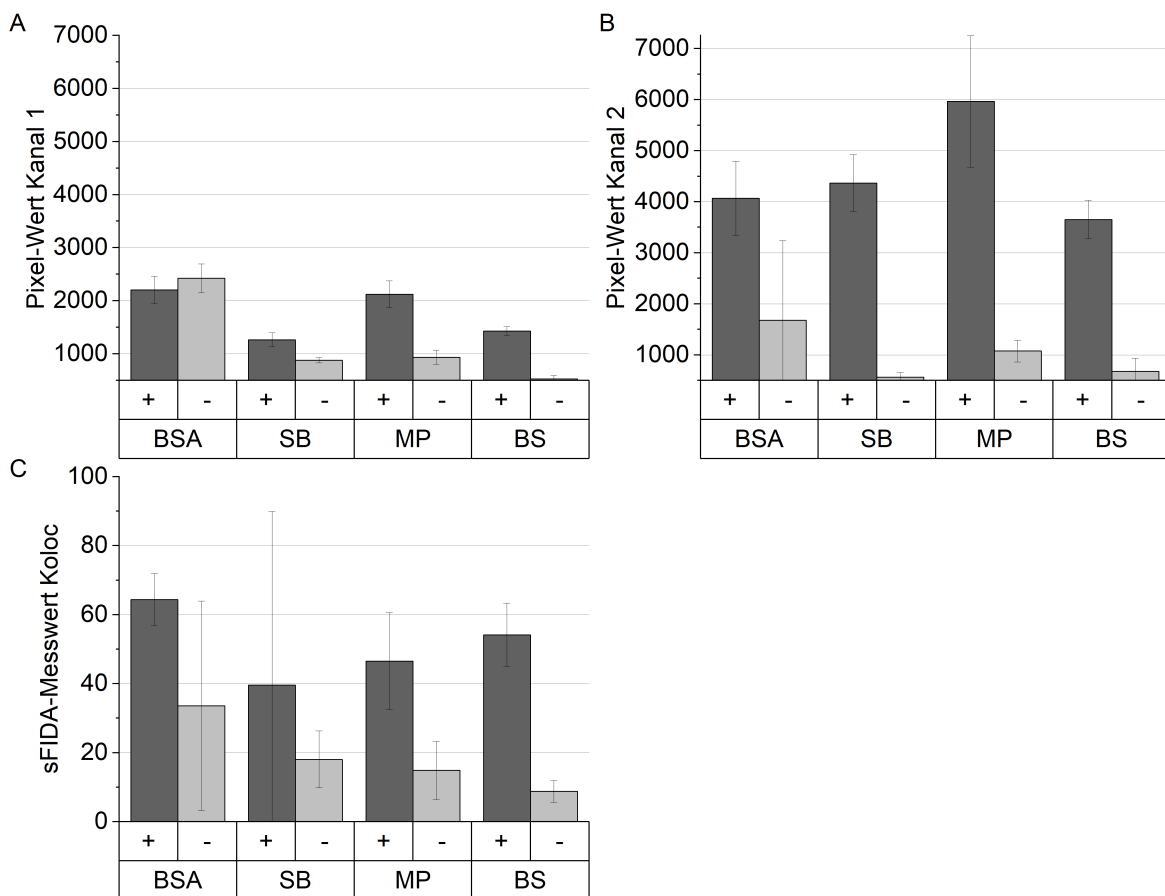
**Tabelle 5.8 – SRV der AF für den EliA-Extraktionspuffer und 1 % BSA in TBS-PC**

Puffer	TBS-PC	EliA	TBS-PC	EliA	TBS-PC	EliA
Probe	Kanal 1		Kanal 2		sFIDA-Messwert	
K1/BC	13,2	<b>2,4</b>	7,8	<b>1,9</b>	162,9	<b>3,3</b>
K2/BC	16,4	<b>0,6</b>	9,7	<b>1,3</b>	187,6	<b>0,5</b>
K3/BC	2,3	<b>1,0</b>	2,7	<b>0,8</b>	3,4	<b>0,6</b>
P1/BC	22,4	<b>5,2</b>	0,9	<b>0,91</b>	7,9	<b>0,7</b>
P2/BC	10,5	<b>2,4</b>	3,4	<b>0,5</b>	26,1	<b>0,6</b>
P3/BC	3,4	<b>1,0</b>	2,0	<b>0,6</b>	35,1	<b>1,0</b>



**Abbildung 5.2 – Vergleich der blockierenden Reagenzien BSA, MP, BS und SB für 1:600 verdünnte Stuhlproben.**

In (A–C) sind die verschiedenen blockierenden Reagenzien jeweils mit Detektions-AK für 1:600 verdünnte Stuhlproben dargestellt. Je nach Stuhlprobe war, wie bei der 1:400 Verdünnung, unterschiedliches Blockieren vorteilhaft. BS zeigte wieder für fast alle Proben ein sehr geringes Signal und SB wies für Kontrollstuhlproben ein höheres Signal auf, dafür für Patientenstuhlproben ein niedriges Signal (vor allem für den sFIDA-Messwert). Die Messung erfolgte am TIRFM in 100x Vergrößerung. Grenzwert: 0,1%.



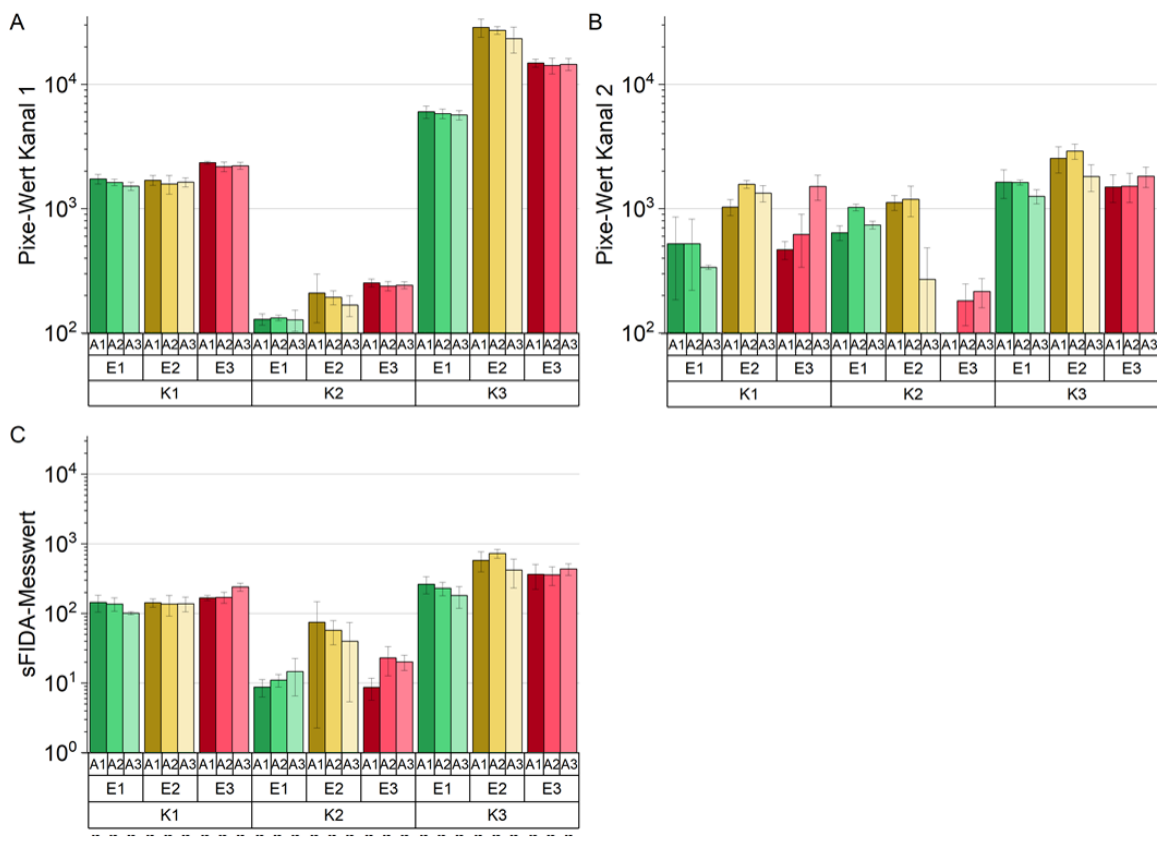
**Abbildung 5.3 – Vergleich der AF der blockierenden Reagenzien BSA, Milchpulver (MP), The Blocking Solution (BS) und Smart Block (SB) für die 1:600 Verdünnung einer Patientienstuhlprobe.**

Alle neuen blockierenden Reagenzien wiesen eine deutlich geringe AF im Vergleich zu BSA auf (A–C). Die größte Unterscheidung zwischen Signal und AF zeigte sich dabei insgesamt für MP. Die Messung erfolgte am TIRFM in 100x Vergrößerung. Grenzwert: 0,1 %.

**Tabelle 5.9 – p-Werte des Vergleichs von frischen Extrakten der drei Kontrollstuhlproben, berechnet mittels Two-Way-ANOVA mit Holm-Sidak-Test**

Kontrolle	Kanal	K1	K2	K3
Extrakt 1 vs. Extrakt 2	Kanal 1	0,763	0,132	< 0,001
	Kanal 2	0,452	0,937	0,017
	sFIDA-Messwert	0,658	0,144	0,012
Extrakt 2 vs. Extrakt 3	Kanal 1	0,003	0,156	< 0,001
	Kanal 2	0,004	0,937	0,022
	sFIDA-Messwert	0,004	0,423	0,116
Extrakt 3 vs. Extrakt 1	Kanal 1	0,003	0,018	0,043
	Kanal 2	0,002	0,937	0,785
	sFIDA-Messwert	0,003	0,039	0,074

K: Kontrolle; vs.: versus



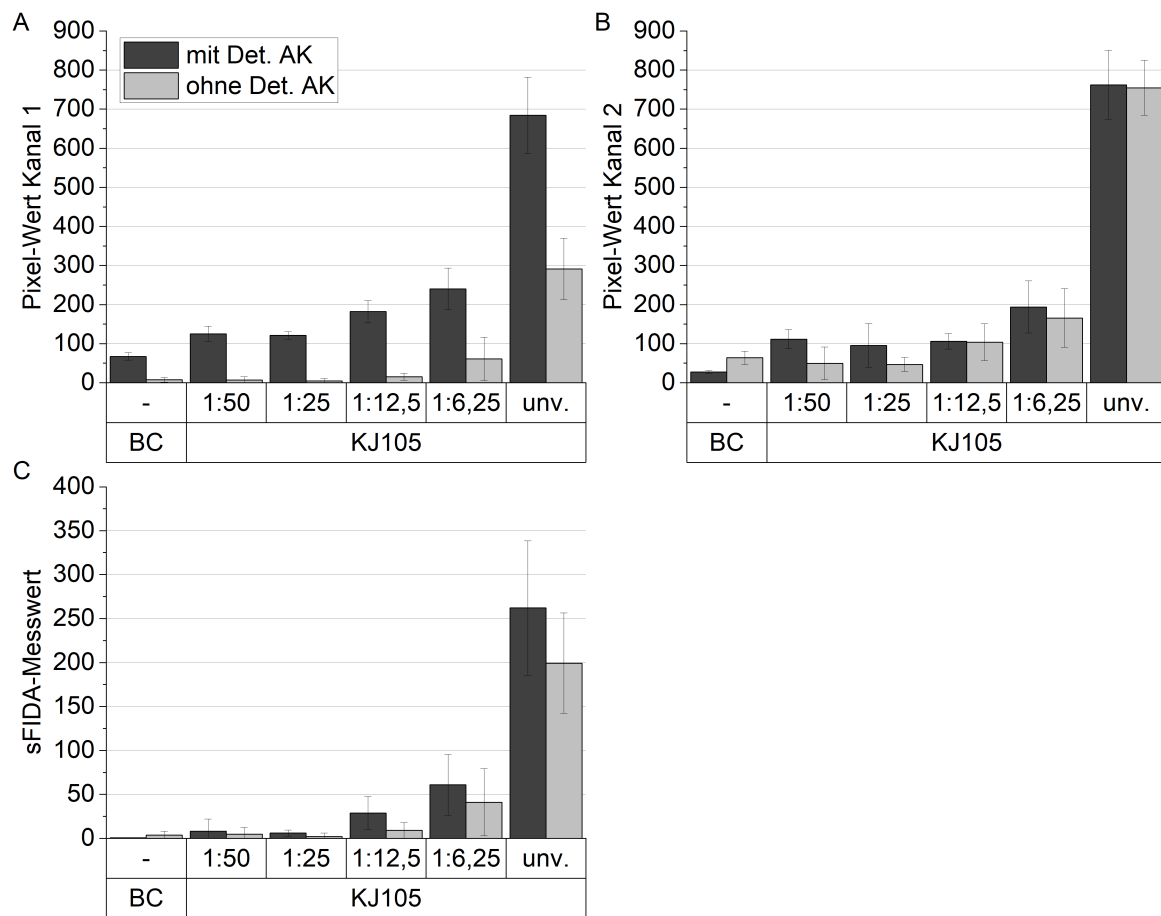
**Abbildung 5.4 – Logarithmische Darstellung zur besseren Vergleichbarkeit der Extrakte und Aliquots der gefrorenen Stuhlproben.**

Die Extrakte sind in den Farben grün, gelb und rot dargestellt, die verschiedenen Aliquots eines Extraktes in verschiedenen Abstufungen dieser Farben. Wie auch bei den frischen Proben, unterschieden sich die einzelnen Aliquots eines Extraktes nicht voneinander, allerdings gab es Unterschiede zwischen den verschiedenen Extrakten einer Kontrollstuhlprobe (A–C). Gemessen wurde am TIRFM bei 100x Vergrößerung. Logarithmische Darstellung der y-Achse. Man. Grenzwert: 5000 (Kanal 1 und 2).

**Tabelle 5.10 – p-Werte des Vergleichs von gefrorenen Extrakten der drei Kontrollstuhlproben, berechnet mittels *Two-Way-ANOVA* mit Holm-Sidak-Test**

Kontrolle	Kanal	K1	K2	K3
Extrakt 1 vs. Extrakt 2	Kanal 1	0,836	0,006	< 0,001
	Kanal 2	0,120	0,089	0,071
	sFIDA-Messwert	0,134	0,038	0,039
Extrakt 2 vs. Extrakt 3	Kanal 1	< 0,001	0,006	0,001
	Kanal 2	0,120	0,089	0,071
	sFIDA-Messwert	0,134	0,040	0,161
Extrakt 3 vs. Extrakt 1	Kanal 1	< 0,001	<0,001	0,002
	Kanal 2	0,120	0,089	0,071
	sFIDA-Messwert	0,134	0,615	0,161

K: Kontrolle; vs.: versus

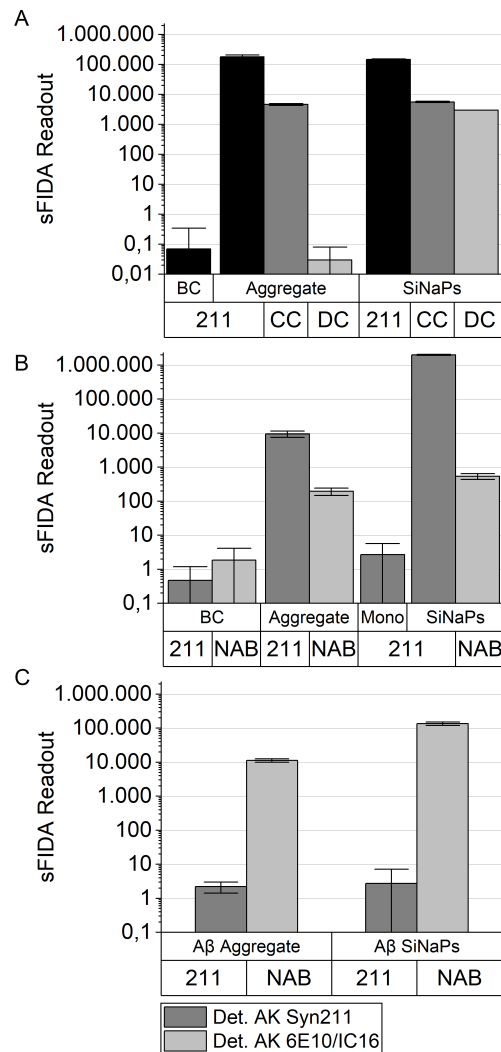


**Abbildung 5.5 – Messung der AF der 1:50, 1:25, 1:12,5, 1:6,25 verdünnten oder unverdünnten Stuhlprobe.**

In (A–C) ist der Pixel-Wert bzw. der sFIDA-Messwert der Verdünnungen der Kontrollstuhlprobe mit und ohne Detektions-AK dargestellt. Die Messung erfolgte am IN Cell bei 40x Vergrößerung. Grenzwert: 0,01 %.

**Tabelle 5.11 – Differenz von Signal und AF für die Stuhlverdünnungen 1:50 bis 1:6,25 verdünnt und unverdünnter Probe**

Verdünnung	Kanal 1	Kanal 2	sFIDA-Messwert
1:50	118,6	62,1	3,5
1:25	116,3	48,5	3,8
1:12,5	166,7	2,7	19,8
1:6,25	178,8	28,2	19,8
unverdünnt	392,6	7,5	62,8



**Abbildung 5.6 – Der sFIDA-Assay mit AK gegen  $\alpha$ -Syn detektiert spezifisch  $\alpha$ -Syn-Aggregate und  $\alpha$ -Syn-SiNaPs, aber keine  $\alpha$ -Syn-Monomere, A $\beta$ -Aggregate oder A $\beta$ -SiNaPs. Logarithmische Darstellung der Ergebnisse.**

(A) Wenn entweder der Fänger-AK (Fänger-AK-Kontrolle (CC)) oder der Detektions-AK (Detektions-AK-Kontrolle (DC)) weggelassen wurden war der sFIDA-Messwert der CC um 97 % für  $\alpha$ -Syn-Aggregate bzw. 96 % für  $\alpha$ -Syn-SiNaPs im Vergleich zum sFIDA-Messwert mit Fänger-AK reduziert. Für die DC war der sFIDA-Messwert vollständig (100 %) für  $\alpha$ -Syn-Aggregate reduziert, wobei das Signal nicht mehr von der generell niedrigen BC unterscheidbar war und um 98 % für  $\alpha$ -Syn-SiNaPs reduziert. (B) Der sFIDA-Messwert von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten und  $\alpha$ -Syn-SiNaPs, wenn sie mit dem NAB228-AK gegen A $\beta$  gebunden wurden, war um 98 % für  $\alpha$ -Syn-Aggregate und um fast 100 % für  $\alpha$ -Syn-SiNaPs reduziert verglichen mit dem Signal mit dem Syn211-AK als Fänger-AK. Der sFIDA-Messwert für  $\alpha$ -Syn-Monomere (Mono) war im Vergleich zu der gleichen Konzentration an Monomeren in aggregiertem  $\alpha$ -Syn auf das Level der BC reduziert. (C) Zusätzlich wurden A $\beta$ -Aggregate und A $\beta$ -SiNaPs mit dem Syn211-AK gegen  $\alpha$ -Syn als Fänger-AK und Detektions-AK gemessen. Als Positivkontrolle wurden dieselben A $\beta$ -Aggregate und A $\beta$ -SiNaPs mit AK spezifisch gegen A $\beta$  (Fänger-AK: NAB228-AK, Detektions-AK: 6E10-CF633/IC16-CF488A) gemessen. Der Graph zeigt, dass der Syn211-AK die A $\beta$ -Aggregate und A $\beta$ -SiNaPs nicht erkannte. Logarithmische Darstellung der X-Achse. Gemessen wurde am IN Cell Analyzer 6500HS Mikroskop bei 40x Vergrößerung. Grenzwert: 0,001 %.



**Tabelle 5.12 – Der Variationskoeffizient (CV %) jedes Experiments für  $\alpha$ -Syn-SiNaPs und Stuhlproben**

Experiment	CV %-Wert	
	$\alpha$ -Syn-SiNaPs	Stuhlproben
1	27,22	40,53
2	16,74	25,32
3	17,41	19,34
4	37,19	27,92
5	33,25	22,12
6	25,32	22,11
7	33,05	28,82
8	28,50	25,50
9	36,98	25,31
Mittelwert	28,41	26,33

### 5.2.5 sFIDA-Messungen von $\alpha$ -Syn-Aggregaten sind sehr selektiv

### 5.2.6 sFIDA-Messungen von $\alpha$ -Synuclein SiNaPs und Stuhlproben zeigen eine geringe *Intra-Assay* Varianz

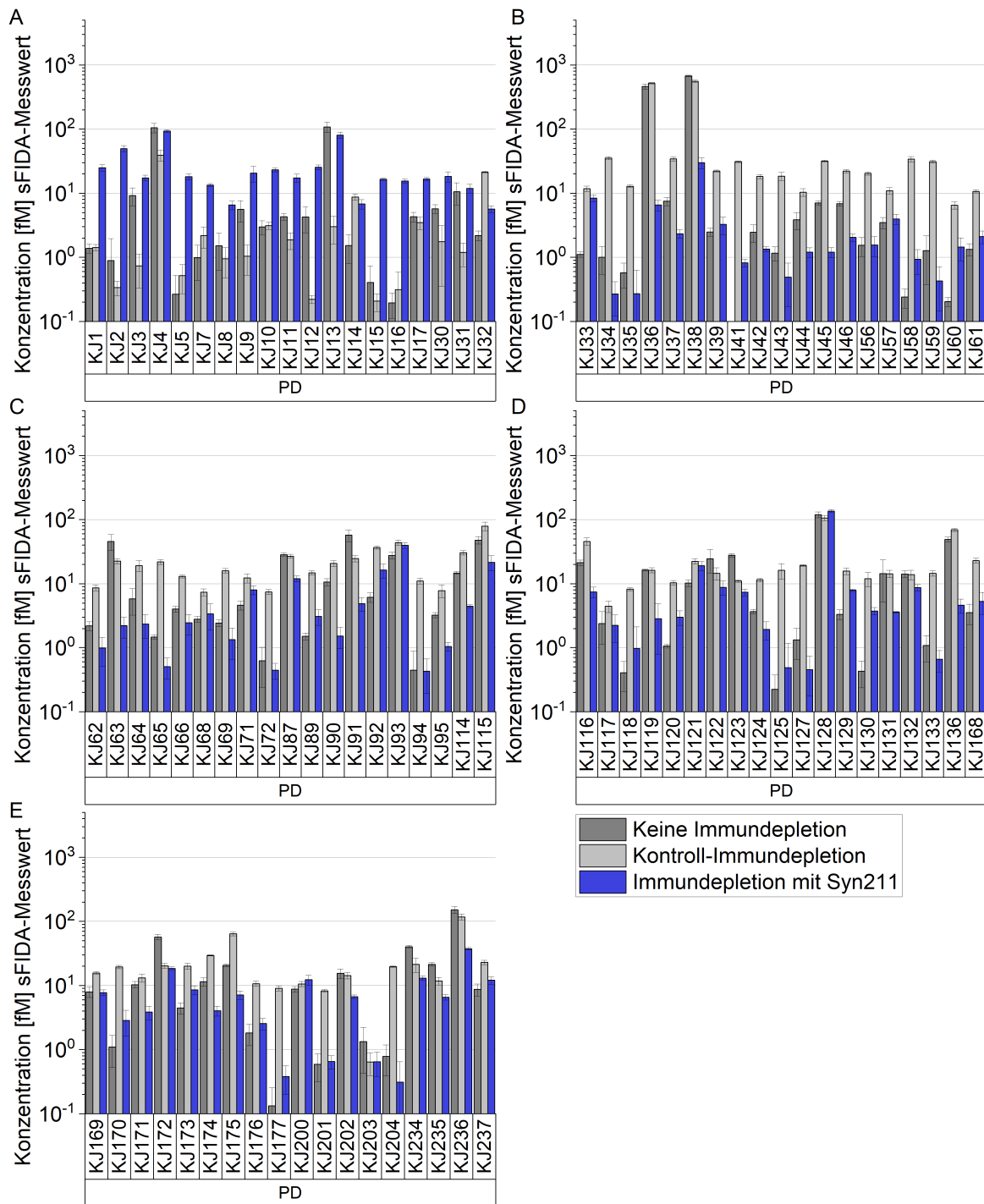
### 5.2.7 Immundepletion entfernt $\alpha$ -Syn-Aggregate aus Stuhlproben

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Immundepletion für alle PD- und iRBD-Patienten und HC dargestellt, wobei diese auf mehrere Graphen aufgeteilt wurden, sodass die Ergebnisse für die einzelnen Proben besser zu erkennen sind (siehe Abbildung 5.7, Abbildung 5.8 und Abbildung 5.9).

Es fiel auf, dass für manche Proben in allen Kohorten der sFIDA-Messwert nach der Immundepletion höher als ohne war. Dieser Anstieg könnte durch unspezifische Signale begründet sein, die durch die Inkubation bei RT entstehen konnten. Wurden diese Stuhlproben aus der Berechnung ausgelassen, so ergab sich eine durchschnittliche Reduktion des Signals nach Immundepletion für PD-Patienten von 59,1 % und nach der Kontroll-Immundepletion von 46,2 %. Für iRBD-Patienten betrug die mittlere Reduktion 61,2 % nach der Immundepletion und 44,7 % nach der Kontroll-Immundepletion sowie 54,9 % nach der Immundepletion und 34,9 % nach der Kontroll-Immundepletion für die HC.

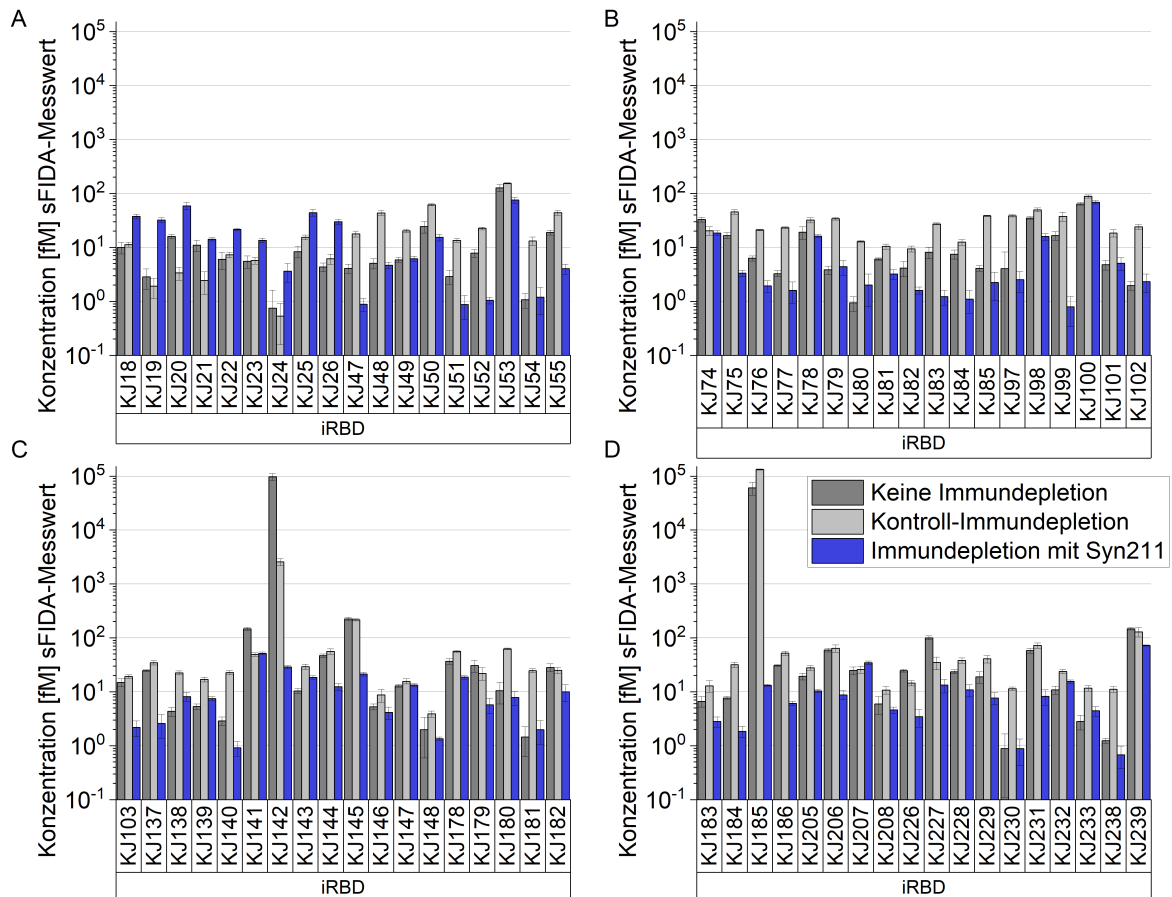
### 5.2.8 Deskriptive Analyse der Patienten- und Kontroll-Kohorten

Die Auflistung aller Informationen zu den demografischen und klinischen Informationen der Patienten- und Kontroll-Kohorten inklusive der  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentration  $\pm$  SD [fM] ist in Tabelle 5.13 aufgeführt. Die sechs HC mit einem zu hohen RBDSQ-Wert sind in dieser Tabelle mit enthalten, wurden allerdings bei den Auswertungen ausgeschlossen. Der Ausschluss hat zu keinen



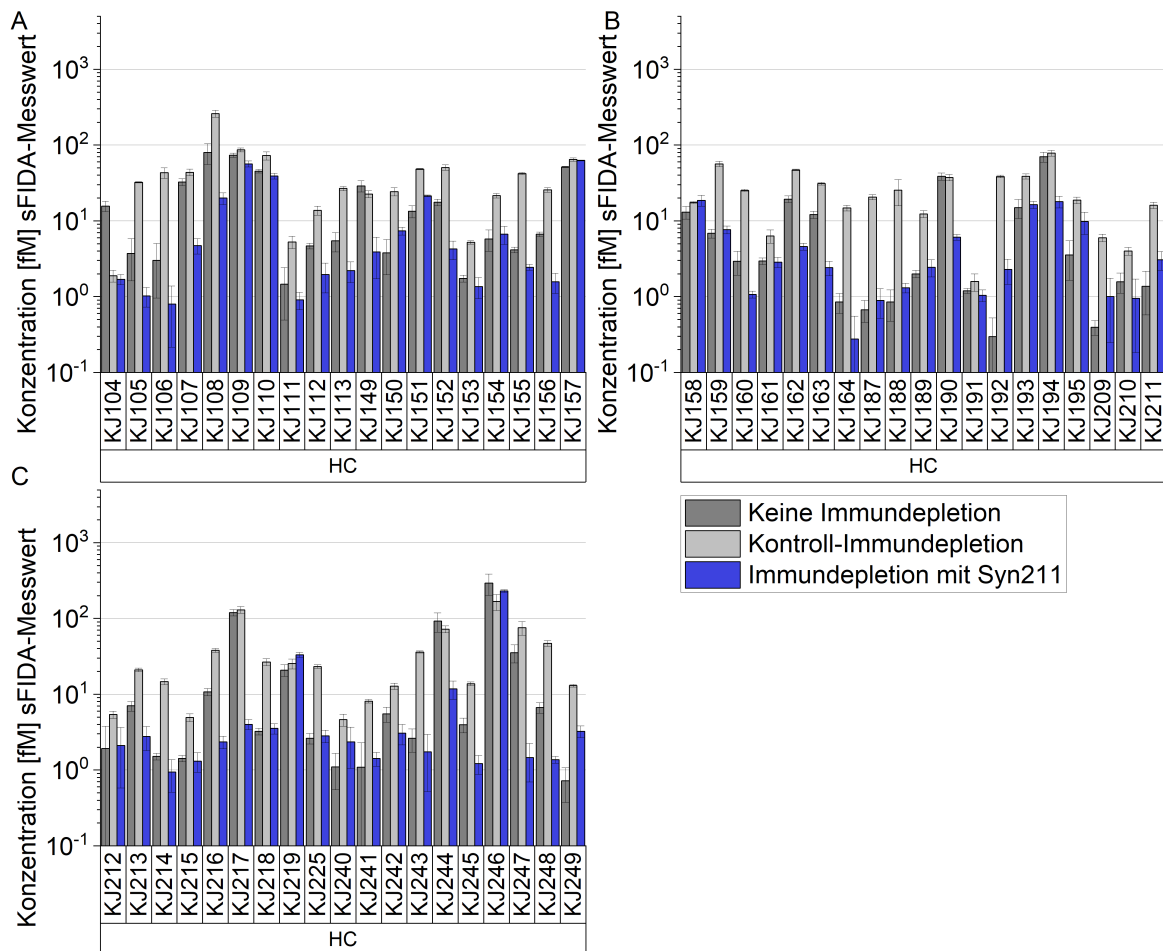
**Abbildung 5.7 – Ergebnisse der Immundepletion für alle PD-Patienten aufgeteilt in mehrere Graphen zur besseren Übersicht.**

Die Ergebnisse der Messung aller Stuhlproben ohne Immundepletion, mit Kontroll-Immundepletion und mit Immundepletion mit Syn211 für die PD-Patienten wurden von KJ1–KJ32 (A), von KJ33–KJ61 (B), von KJ62–KJ115 (C), von KJ116–KJ168 (D) und von KJ169–KJ237 (E) aufgeteilt. Zusätzlich wurden zur besseren Übersicht die Daten der anderen Kohorten in mehrere Graphen aufgeteilt (siehe Abbildung 5.8 für die Graphen der iRBD-Patienten und Abbildung 5.9 für die Graphen der HC). Die Messung erfolgte am IN Cell bei 40x Vergrößerung. Grenzwert: 0,0003 %.



**Abbildung 5.8 – Ergebnisse der Immundepletion für alle iRBD-Patienten aufgeteilt in mehrere Graphen zur besseren Übersicht.**

Die Ergebnisse der Messung aller Stuhlproben ohne Immundepletion, mit Kontroll-Immundepletion und mit Immundepletion mit Syn211 für die iRBD-Patienten wurden von KJ18–KJ55 (A), von KJ74–KJ102 (B), von KJ103–KJ182 (C) und von KJ183–KJ239 (D) aufgeteilt. Zusätzlich wurden zur besseren Übersicht die Daten der anderen Kohorten in mehrere Graphen aufgeteilt (siehe Abbildung 5.7 für die Graphen der PD-Patienten und Abbildung 5.9 für die Graphen der HC). Die Messung erfolgte am IN Cell bei 40x Vergrößerung. Grenzwert: 0,0003%.



**Abbildung 5.9 – Ergebnisse der Immundepletion für alle HC aufgeteilt in mehrere Graphen zur besseren Übersicht.**

Die Ergebnisse der Messung aller Stuhlproben ohne Immundepletion, mit Kontroll-Immundepletion und mit Immundepletion mit Syn211 für die HC wurden von KJ104–KJ157 (A), von KJ158–KJ211 (B) und von KJ212–KJ249 (C) aufgeteilt. Zusätzlich wurden zur besseren Übersicht die Daten der anderen Kohorten in mehrere Graphen aufgeteilt (siehe Abbildung 5.7 für die Graphen der PD-Patienten und Abbildung 5.8 für die Graphen der iRBD-Patienten). Die Messung erfolgte am IN Cell bei 40x Vergrößerung. Grenzwert: 0,0003 %.

Veränderungen der Signifikanzen geführt.

Tabelle 5.13 – Demografische und klinische Informationen und Konzentrationen von  $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhl von individuellen Personen

Proben Nr.	Diagnose	Geschlecht	Alter bei Probennahme [Jahre]	Alter bei Beginn [Jahre]	Krankheitsdauer [Jahre]	Bildung [Jahre]	CCCSS-Wert	DemTect-Wert	NMSS-Wert	MDS-UDPRS III-Wert	Geruchswert	Hoehn-und-Yahr-Wert	Levodopa-Herausforderungstest [% Änderung]	DaTSCAN-Wert	PD-Screening-Fragebogen-Wert	RBDSQ-Wert	$\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentration $\pm$ SD [fM]
1	PD	männlich	73	60	13	18	9	13	37	22	4	4	0,692	+	5	7	1,38 $\pm$ 0,22
2	PD	männlich	68	54	14	10	10	13	17	27	6	3	0,333	N/A	6	10	0,88 $\pm$ 1,07
3	PD	männlich	56	45	11	12	3	17	51	35	7	4	0,529	+	5	8	9,20 $\pm$ 2,85
4	PD	männlich	71	61	10	17	1	11	67	65	8	5	0,239	+	9	6	104,73 $\pm$ 17,43
5	PD	männlich	46	41	5	12	0	14	103	21	3	3	0,438	N/A	6	2	0,26 $\pm$ 0,25
6	PD	männlich	72	57	15	19	6	14	54	28	5	5	0,469	N/A	4	5	0,98 $\pm$ 0,55
7	PD	männlich	54	50	4	16	0	18	20	19	2	2	0,467	+	7	0	1,51 $\pm$ 0,88
8	PD	weiblich	71	49	22	12	4	9	67	20	9	3	0,481	N/A	9	4	5,58 $\pm$ 2,07
9	PD	männlich	56	52	4	16	2	15	9	33	7	5	0,320	N/A	7	5	2,97 $\pm$ 0,73
10	PD	männlich	62	50	12	20	0	18	9	10	2	2	0,462	+	8	3	4,28 $\pm$ 0,51
11	PD	männlich	80	78	2	8	3	14	4	17	3	2	N/A	N/A	1	0	4,28 $\pm$ 1,87
12	PD	weiblich	78	63	15	11	18	17	48	76	2	5	0,431	N/A	6	4	108,40 $\pm$ 20,31
13	PD	männlich	68	58	10	18	9	16	4	17	3	4	0,632	N/A	5	2	1,53 $\pm$ 0,73
14	PD	weiblich	80	66	14	13	11	13	34	25	7	4	0,528	+	7	1	0,40 $\pm$ 0,33

15	PD	weiblich	52	35	17	19	1	12	27	23	4	4	0,577	N/A	5	7	0,19 ± 0,08
16	PD	weiblich	74	60	14	17	9	10	21	50	2	5	0,323	N/A	9	6	4,28 ± 0,75
17	PD	männlich	63	54	9	13	1	12	12	15	4	2	0,639	+	7	4	5,72 ± 0,89
18	PD	männlich	74	62	12	12	3	11	21	8	0	2	0,320	N/A	2	3	10,52 ± 3,99
19	PD	männlich	82	73	9	12	0	9	46	23	8	4	0,378	N/A	7	5	2,22 ± 0,39
20	PD	weiblich	50	39	11	14	2	11	16	22	7	2	0,459	+	5	2	1,14 ± 0,11
21	PD	weiblich	56	51	5	12	0	15	4	30	9	3	0,321	+	7	5	1,04 ± 0,48
22	PD	weiblich	60	51	9	17	3	17	16	16	7	2	0,423	+	7	2	0,60 ± 0,25
23	PD	männlich	60	40	20	12	7	18	15	30	3	3	0,474	N/A	5	3	462,07 ± 46,48
24	PD	männlich	57	39	18	15	7	12	42	41	6	3	0,400	+	5	8	7,56 ± 1,15
25	PD	männlich	59	56	3	17	13	18	46	7	4	2	0,483	N/A	7	9	673,25 ± 19,52
26	PD	weiblich	58	58	0	20	2	18	52	16	1	2	N/A	+	0	11	2,52 ± 0,37
27	PD	männlich	68	62	6	20	1	17	10	5	6	2	N/A	+	4	2	0,07 ± 0,06
28	PD	männlich	76	74	2	13	1	11	21	35	6	3	N/A	N/A	6	8	2,49 ± 0,76
29	PD	männlich	60	51	9	21	4	14	56	22	1	3	0,486	N/A	8	5	1,19 ± 0,30
30	PD	männlich	59	54	5	19	4	18	28	33	6	3	N/A	+	7	12	3,87 ± 1,14
31	PD	männlich	65	63	2	15	6	12	28	42	5	4	0,431	N/A	9	8	7,09 ± 0,54
32	PD	männlich	41	40	1	22	2	18	7	11	10	2	N/A	+	2	3	6,89 ± 0,60
33	PD	männlich	66	45	21	15	5	18	14	11	6	2	0,000	+	4	4	1,57 ± 0,52
34	PD	weiblich	60	50	10	13	12	13	27	19	6	3	0,429	+	8	7	3,51 ± 0,72
35	PD	männlich	71	66	5	12	2	8	30	42	9	4	0,250	+	4	1	0,27 ± 0,09
36	PD	männlich	58	54	4	15	2	11	42	10	8	3	0,692	N/A	7	6	1,30 ± 0,92
37	PD	weiblich	70	57	13	8	11	11	25	22	8	3	0,441	N/A	6	4	0,19 ± 0,03
38	PD	männlich	55	41	14	9	12	7	30	50	6	4	0,447	N/A	8	6	1,32 ± 0,29
39	PD	männlich	68	64	4	13	6	9	65	21	3	3	N/A	+	9	6	2,19 ± 0,35

40	PD	männlich	78	71	7	18	7	10	10	19	7	3	N/A	+	8	12	45,51 ± 12,8
41	PD	männlich	55	50	5	16	1	14	1	5	8	2	0,538	N/A	3	5	5,79 ± 2,57
42	PD	weiblich	49	44	5	15	5	18	13	9	8	3	0,000	N/A	7	3	1,47 ± 0,11
43	PD	weiblich	65	50	15	25	4	17	22	N/A	5	4	0,219	N/A	5	11	4,01 ± 0,43
44	PD	männlich	41	37	4	20	3	14	17	18	6	3	N/A	+	6	1	2,78 ± 0,30
45	PD	männlich	69	58	11	16	3	10	20	21	6	3	0,517	N/A	5	5	2,42 ± 0,28
46	PD	männlich	63	53	10	13	8	14	21	13	10	2	0,313	+	7	8	4,61 ± 0,73
47	PD	männlich	71	65	6	12	3	10	26	48	4	3	0,163	+	7	1	0,61 ± 0,38
48	PD	weiblich	78	64	14	20	6	18	23	30	4	3	0,286	N/A	7	2	28,42 ± 1,67
49	PD	männlich	76	60	16	12	11	13	90	31	6	4	0,300	N/A	6	9	1,72 ± 0,22
50	PD	männlich	55	55	0	30	0	17	2	5	7	2	N/A	+	1	3	10,82 ± 1,36
51	PD	männlich	77	65	12	18	3	13	26	26	7	3	-0,023	N/A	4	8	57,33 ± 12,05
52	PD	männlich	64	52	12	22	9	16	20	25	7	2	0,933	N/A	8	4	6,72 ± 1,13
53	PD	männlich	83	73	10	22	8	18	36	54	5	4	N/A	N/A	6	7	28,19 ± 3,40
54	PD	männlich	62	53	9	18	3	15	44	6	2	2	0,333	+	5	6	1,03 ± 1,01
55	PD	weiblich	70	63	7	14	0	12	18	13	6	3	0,368	N/A	8	4	3,82 ± 0,35
56	PD	weiblich	74	61	13	8	3	12	19	63	4	5	N/A	N/A	7	7	15,3 ± 0,73
57	PD	weiblich	77	50	27	13	1	18	67	30	2	4	0,567	N/A	9	7	48,39 ± 6,44
58	PD	weiblich	62	48	14	23	7	18	11	40	7	5	0,093	+	6	4	21,84 ± 2,24
59	PD	weiblich	75	49	26	16	2	9	36	25	2	3	N/A	N/A	5	4	2,97 ± 1,59
60	PD	männlich	59	57	2	14	1	14	29	41	9	3	N/A	N/A	4	3	0,98 ± 0,48
61	PD	männlich	68	58	10	14	0	18	24	24	0	2	0,609	N/A	7	4	16,89 ± 0,56
62	PD	männlich	73	68	5	18	0	18	14	22	7	3	N/A	+	3	4	1,07 ± 0,07
63	PD	männlich	57	49	8	15	1	14	13	10	9	2	0,545	N/A	3	2	10,23 ± 1,20
64	PD	weiblich	54	45	9	16	2	18	15	9	10	3	0,686	+	7	3	24,45 ± 9,80



65	PD	weiblich	57	45	12	12	2	18	122	26	7	2	0,720	N/A	8	7	27,74 ± 1,61
66	PD	weiblich	68	51	17	12	0	17	19	19	8	4	0,318	N/A	2	8	3,70 ± 0,30
67	PD	weiblich	64	57	7	20	8	13	59	21	8	3	0,629	N/A	8	11	0,23 ± 0,15
68	PD	männlich	56	48	8	13	10	12	39	22	4	3	0,310	+	6	6	1,34 ± 0,68
69	PD	weiblich	74	73	1	17	2	15	15	16	8	3	N/A	+	6	9	119,51 ± 12,54
70	PD	männlich	46	36	10	24	1	15	22	16	9	2	0,667	+	6	3	3,34 ± 0,58
71	PD	weiblich	69	56	13	11	7	15	51	28	4	3	0,415	N/A	7	6	0,43 ± 0,19
72	PD	männlich	55	53	2	18	12	14	50	17	3	2	N/A	N/A	8	6	14,38 ± 9,20
73	PD	männlich	78	60	18	17	2	12	36	59	3	5	N/A	N/A	7	5	14,16 ± 1,74
74	PD	männlich	52	45	7	16	7	9	51	21	8	3	0,346	+	6	2	1,09 ± 0,48
75	PD	weiblich	57	55	2	15	2	18	12	6	6	3	0,733	+	1	1	49,21 ± 4,31
76	PD	männlich	55	45	10	N/A	N/A	7	79	22	7	3	0,478	+	N/A	N/A	3,56 ± 1,25
77	PD	männlich	60	57	3	10	0	12	55	36	2	3	N/A	+	1	1	7,97 ± 1,47
78	PD	männlich	52	46	6	18	6	13	0	5	6	2	0,000	N/A	3	1	1,10 ± 0,57
79	PD	männlich	51	40	11	14	7	8	10	31	4	4	0,485	+	5	5	10,30 ± 1,23
80	PD	männlich	73	72	1	14	15	15	62	23	1	3	N/A	N/A	5	1	57,08 ± 5,86
81	PD	männlich	66	55	11	12	0	14	51	13	7	2	N/A	+	4	2	4,46 ± 0,90
82	PD	weiblich	67	53	14	12	3	15	57	31	8	4	0,341	N/A	9	10	11,45 ± 1,64
83	PD	männlich	72	66	6	13	1	15	13	12	5	3	N/A	N/A	7	9	20,57 ± 0,95
84	PD	männlich	59	49	10	13	3	14	29	13	3	2	0,474	N/A	7	2	1,81 ± 0,66
85	PD	männlich	74	68	6	8	2	9	6	42	6	N/A	0,543	N/A	4	1	0,13 ± 0,12
86	PD	weiblich	62	56	6	16	0	13	13	10	2	2	N/A	N/A	2	6	8,78 ± 0,89
87	PD	männlich	71	64	7	19	0	18	18	29	3	3	N/A	N/A	5	1	0,60 ± 0,28
88	PD	männlich	51	51	0	13	1	17	12	11	3	2	N/A	+	4	11	15,51 ± 2,65
89	PD	weiblich	57	56	1	14	3	13	24	6	8	2	N/A	+	5	4	1,34 ± 0,91

<b>90</b>	PD	männlich	78	72	6	13	0	17	11	14	6	3	0,444	+	2	1	0,80 ± 0,41
<b>91</b>	PD	männlich	62	59	3	22	1	14	13	7	7	2	N/A	+	2	3	40,25 ± 2,04
<b>92</b>	PD	männlich	81	69	12	13	4	2	64	55	1	5	N/A	N/A	7	4	21,44 ± 1,33
<b>93</b>	PD	männlich	64	63	1	18	0	13	12	4	2	2	N/A	+	3	3	151,19 ± 19,38
<b>94</b>	PD	männlich	80	77	3	10	1	13	31	17	1	2	0,143	+	4	3	8,73 ± 1,92
<b>95</b>	iRBD	männlich	56	N/A	N/A	21	2	17	6	1	11	N/A	N/A	N/A	0	6	10,01 ± 2,42
<b>96</b>	iRBD	männlich	72	60	12	3	N/A	16	1	4	11	N/A	N/A	N/A	2	6	2,83 ± 1,15
<b>97</b>	iRBD	männlich	61	N/A	N/A	16	N/A	14	4	5	11	N/A	N/A	N/A	0	6	10,99 ± 2,60
<b>98</b>	iRBD	weiblich	59	55	4	20	4	17	14	0	6	N/A	N/A	N/A	0	10	15,96 ± 1,49
<b>99</b>	iRBD	männlich	78	N/A	N/A	14	N/A	17	15	4	8	N/A	N/A	N/A	0	10	6,04 ± 2,12
<b>100</b>	iRBD	weiblich	67	50	17	12	3	13	N/A	8	5	N/A	N/A	N/A	0	9	5,54 ± 1,44
<b>101</b>	iRBD	männlich	63	63	0	16	2	17	3	5	10	N/A	N/A	N/A	0	8	0,74 ± 0,86
<b>102</b>	iRBD	männlich	58	54	4	16	0	13	N/A	6	9	N/A	N/A	N/A	0	10	8,37 ± 1,95
<b>103</b>	iRBD	weiblich	64	61	3	21	0	15	N/A	3	3	N/A	N/A	N/A	0	7	4,34 ± 0,80
<b>104</b>	iRBD	männlich	64	63	1	15	4	11	N/A	2	7	N/A	N/A	+	0	8	4,12 ± 0,80
<b>105</b>	iRBD	männlich	70	60	10	N/A	0	14	12	5	10	N/A	N/A	N/A	0	12	5,11 ± 1,11
<b>106</b>	iRBD	männlich	66	52	14	17	0	12	4	5	7	N/A	N/A	+	0	11	5,9 ± 0,68
<b>107</b>	iRBD	männlich	73	71	2	N/A	N/A	12	2	4	6	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	24,42 ± 5,82
<b>108</b>	iRBD	weiblich	65	60	5	16	1	17	6	3	5	N/A	N/A	+	0	9	2,90 ± 0,83
<b>109</b>	iRBD	männlich	72	62	10	11	2	14	N/A	5	9	N/A	N/A	+	0	N/A	7,87 ± 1,34
<b>110</b>	iRBD	männlich	75	72	3	18	2	14	8	7	3	N/A	N/A	N/A	0	7	126,81 ± 19,12
<b>111</b>	iRBD	männlich	69	64	5	14	0	17	9	4	8	N/A	N/A	+	0	12	1,10 ± 0,33
<b>112</b>	iRBD	weiblich	66	62	4	15	5	18	2	3	9	N/A	N/A	N/A	0	5	18,92 ± 2,02
<b>113</b>	iRBD	männlich	59	56	3	19	3	9	22	5	7	N/A	N/A	+	0	9	32,97 ± 3,34
<b>114</b>	iRBD	männlich	75	66	9	18	0	17	1	5	7	N/A	N/A	N/A	0	11	16,64 ± 2,23

115	iRBD	männlich	55	40	15	21	0	11	0	8	12	N/A	N/A	N/A	0	5	6,29 ± 0,68
116	iRBD	männlich	69	66	3	15	8	12	N/A	13	7	N/A	N/A	+	0	11	3,26 ± 0,44
117	iRBD	männlich	54	49	5	12	5	12	48	3	8	N/A	N/A	+	5	13	19,17 ± 4,96
118	iRBD	männlich	74	72	2	16	0	15	N/A	6	7	N/A	N/A	N/A	0	10	3,82 ± 0,69
119	iRBD	männlich	66	61	5	15	3	18	21	7	6	N/A	N/A	N/A	0	10	0,93 ± 0,28
120	iRBD	männlich	70	63	7	20	2	13	31	8	1	N/A	N/A	N/A	1	5	6,08 ± 0,29
121	iRBD	männlich	67	50	17	13	0	17	2	10	7	N/A	N/A	N/A	0	10	4,15 ± 1,32
122	iRBD	männlich	67	56	11	17	0	17	3	4	9	N/A	N/A	+	0	10	8,14 ± 1,95
123	iRBD	männlich	62	47	15	31	4	14	N/A	5	9	N/A	N/A	+	1	9	7,49 ± 1,43
124	iRBD	männlich	70	N/A	N/A	15	0	18	1	4	7	N/A	N/A	N/A	0	5	4,10 ± 0,48
125	iRBD	weiblich	63	62	1	19	12	14	N/A	0	4	N/A	N/A	N/A	0	8	4,64 ± 4,76
126	iRBD	männlich	75	55	20	15	6	13	N/A	4	8	N/A	N/A	+	1	8	35,60 ± 2,14
127	iRBD	männlich	67	61	6	16	5	13	23	1	3	N/A	N/A	N/A	0	11	17,04 ± 3,11
128	iRBD	männlich	70	67	3	22	3	14	N/A	3	3	N/A	N/A	+	1	10	64,72 ± 3,37
129	iRBD	männlich	74	72	2	12	2	11	N/A	5	5	N/A	N/A	N/A	0	7	5,35 ± 1,06
130	iRBD	männlich	58	53	5	13	9	14	N/A	7	5	N/A	N/A	+	3	11	2,55 ± 0,47
131	iRBD	weiblich	77	66	11	16	1	15	4	5	10	N/A	N/A	N/A	0	12	15,40 ± 2,58
132	iRBD	weiblich	59	55	4	16	1	15	N/A	4	10	N/A	N/A	N/A	0	7	24,68 ± 1,03
133	iRBD	männlich	68	60	8	18	2	18	N/A	4	7	N/A	N/A	N/A	0	9	4,34 ± 0,84
134	iRBD	männlich	63	N/A	N/A	N/A	N/A	18	N/A	2	7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	5,34 ± 0,62
135	iRBD	männlich	64	62	2	12	5	14	102	5	10	N/A	N/A	N/A	0	13	2,89 ± 0,53
136	iRBD	männlich	61	50	11	16	6	18	76	5	9	N/A	N/A	+	0	12	147,61 ± 8,84
137	iRBD	männlich	64	60	4	N/A	N/A	11	9	2	5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	96912,87 ± 14905,2
138	iRBD	männlich	66	63	3	12	3	13	2	5	7	N/A	N/A	N/A	0	4	10,42 ± 1,18
139	iRBD	männlich	63	62	1	15	2	14	9	0	3	N/A	N/A	N/A	0	5	46,81 ± 3,15

140	iRBD	männlich	61	51	10	25	1	15	6	3	5	N/A	N/A	+	1	12	223,93 ± 16,15
141	iRBD	männlich	58	54	4	15	2	17	6	1	6	N/A	N/A	+	0	3	5,30 ± 0,66
142	iRBD	männlich	63	55	8	13	9	11	8	3	0	N/A	N/A	N/A	0	11	12,89 ± 0,74
143	iRBD	männlich	59	47	12	22	2	14	5	2	9	N/A	N/A	N/A	0	11	1,99 ± 1,39
144	iRBD	männlich	73	63	10	17	0	12	1	1	8	N/A	N/A	N/A	0	8	36,79 ± 4,54
145	iRBD	männlich	69	54	15	18	8	18	14	0	6	N/A	N/A	+	0	10	30,49 ± 7,58
146	iRBD	männlich	60	N/A	N/A	N/A	N/A	12	15	3	7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	10,48 ± 4,54
147	iRBD	männlich	63	53	10	17	0	18	25	3	2	N/A	N/A	N/A	0	7	1,46 ± 0,83
148	iRBD	männlich	60	50	10	15	2	17	7	2	7	N/A	N/A	+	0	2	28,32 ± 4,72
149	iRBD	männlich	74	71	3	19	1	18	18	9	9	N/A	N/A	+	0	12	6,67 ± 1,46
150	iRBD	männlich	56	53	3	N/A	N/A	14	17	2	10	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	7,65 ± 0,55
151	iRBD	männlich	72	58	14	8	1	17	12	1	5	N/A	N/A	N/A	0	12	59941,25 ± 16328
152	iRBD	männlich	65	61	4	13	1	18	6	3	4	N/A	N/A	N/A	0	7	30,55 ± 1,42
153	iRBD	männlich	74	68	6	12	6	15	13	2	6	N/A	N/A	N/A	0	10	19,34 ± 2,84
154	iRBD	männlich	72	57	15	17	0	14	19	5	5	N/A	N/A	N/A	0	10	59,57 ± 4,69
155	iRBD	männlich	67	65	2	11	4	12	11	1	3	N/A	N/A	+	0	6	24,92 ± 4,06
156	iRBD	männlich	80	60	20	19	0	14	15	7	6	N/A	N/A	N/A	0	7	5,98 ± 2,15
157	iRBD	männlich	68	63	5	18	6	15	40	2	4	N/A	N/A	+	0	12	18,98 ± 4,67
158	iRBD	weiblich	77	70	7	13	6	14	24	4	6	N/A	N/A	+	1	7	24,75 ± 1,54
159	iRBD	männlich	74	69	5	17	1	14	16	2	0	N/A	N/A	N/A	0	11	100,09 ± 8,34
160	iRBD	männlich	69	64	5	13	4	15	21	7	4	N/A	N/A	N/A	0	10	23,66 ± 1,97
161	iRBD	männlich	60	59	1	11	3	16	29	1	4	N/A	N/A	N/A	1	13	0,94 ± 0,82
162	iRBD	männlich	61	59	2	N/A	N/A	18	15	2	8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	58,18 ± 5,88
163	iRBD	männlich	57	38	19	17	0	15	38	3	7	N/A	N/A	N/A	0	12	10,91 ± 1,89
164	iRBD	weiblich	56	50	6	13	4	17	27	2	9	N/A	N/A	N/A	1	12	2,87 ± 0,87

<b>165</b>	iRBD	männlich	68	48	20	N/A	N/A	11	40	N/A	7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1,29 ± 0,14
<b>166</b>	iRBD	männlich	76	70	6	15	3	15	18	12	10	N/A	N/A	N/A	1	11	146,32 ± 6,96
<b>167</b>	HC	männlich	21	N/A	N/A	15	9	15	N/A	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	7	16,24 ± 2,56
<b>168</b>	HC	männlich	18	N/A	N/A	12	3	15	N/A	N/A	10	N/A	N/A	N/A	0	2	4,29 ± 2,43
<b>169</b>	HC	männlich	62	N/A	N/A	18	0	14	N/A	N/A	10	N/A	N/A	N/A	0	3	3,57 ± 2,43
<b>170</b>	HC	männlich	70	N/A	N/A	16	7	10	N/A	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	0	33,19 ± 3,44
<b>171</b>	HC	weiblich	58	N/A	N/A	16	0	17	N/A	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	0	80,06 ± 24,21
<b>172</b>	HC	weiblich	74	N/A	N/A	11	4	12	N/A	N/A	10	N/A	N/A	N/A	1	1	73,96 ± 4,57
<b>173</b>	HC	männlich	70	N/A	N/A	12	0	12	N/A	N/A	10	N/A	N/A	N/A	0	1	45,82 ± 2,48
<b>174</b>	HC	weiblich	55	N/A	N/A	15	1	18	N/A	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	1	2,03 ± 1,35
<b>175</b>	HC	weiblich	20	N/A	N/A	14	4	15	N/A	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	1	5,24 ± 0,46
<b>176</b>	HC	weiblich	20	N/A	N/A	14	5	16	N/A	N/A	10	N/A	N/A	N/A	0	3	6,01 ± 1,70
<b>177</b>	HC	weiblich	78	N/A	N/A	12	4	18	N/A	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	3	28,93 ± 4,84
<b>178</b>	HC	männlich	47	N/A	N/A	12	1	18	N/A	N/A	12	N/A	N/A	N/A	0	7	3,79 ± 1,85
<b>179</b>	HC	weiblich	66	N/A	N/A	14	0	17	N/A	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	3	13,36 ± 2,41
<b>180</b>	HC	männlich	75	N/A	N/A	18	0	14	27	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	0	17,56 ± 1,81
<b>181</b>	HC	männlich	74	N/A	N/A	10	2	13	8	N/A	10	N/A	N/A	N/A	0	0	1,74 ± 0,19
<b>182</b>	HC	weiblich	70	N/A	N/A	11	0	18	9	N/A	11	N/A	N/A	N/A	3	2	5,78 ± 1,81
<b>183</b>	HC	weiblich	63	N/A	N/A	20	4	18	1	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	2	4,15 ± 0,37
<b>184</b>	HC	weiblich	66	N/A	N/A	18	7	18	10	N/A	12	N/A	N/A	N/A	0	2	6,66 ± 0,43
<b>185</b>	HC	männlich	34	N/A	N/A	16	7	17	1	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	1	51,35 ± 0,81
<b>186</b>	HC	weiblich	72	N/A	N/A	18	1	18	10	N/A	10	N/A	N/A	N/A	1	0	13,00 ± 2,49
<b>187</b>	HC	männlich	77	N/A	N/A	23	5	15	0	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	2	6,84 ± 0,90
<b>188</b>	HC	weiblich	60	N/A	N/A	16	0	18	18	N/A	12	N/A	N/A	N/A	0	4	2,93 ± 1,01
<b>189</b>	HC	weiblich	49	N/A	N/A	12	1	17	N/A	N/A	10	N/A	N/A	N/A	0	6	2,94 ± 0,30

<b>190</b>	HC	weiblich	64	N/A	N/A	13	2	18	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1	2	19,37 ± 1,97
<b>191</b>	HC	weiblich	61	N/A	N/A	14	2	17	3	N/A	8	N/A	N/A	N/A	0	1	12,08 ± 1,34
<b>192</b>	HC	männlich	36	N/A	N/A	20	0	18	4	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	1	0,84 ± 0,25
<b>193</b>	HC	männlich	62	N/A	N/A	13	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	2	2	0,68 ± 0,22
<b>194</b>	HC	weiblich	60	N/A	N/A	20	0	18	18	N/A	2	N/A	N/A	N/A	0	0	0,86 ± 0,38
<b>195</b>	HC	männlich	52	N/A	N/A	15	0	14	4	N/A	10	N/A	N/A	N/A	0	0	2,01 ± 0,23
<b>196</b>	HC	weiblich	66	N/A	N/A	19	2	15	1	N/A	10	N/A	N/A	N/A	0	0	38,59 ± 4,2
<b>197</b>	HC	weiblich	63	N/A	N/A	12	4	17	34	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	0	1,20 ± 0,10
<b>198</b>	HC	männlich	59	N/A	N/A	16	1	N/A	11	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	2	0,30 ± 0,24
<b>199</b>	HC	weiblich	71	N/A	N/A	16	11	18	15	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	4	14,93 ± 4,15
<b>200</b>	HC	weiblich	70	N/A	N/A	12	0	17	16	N/A	6	N/A	N/A	N/A	0	4	70,07 ± 10,59
<b>201</b>	HC	weiblich	48	N/A	N/A	17	1	18	1	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	0	3,55 ± 1,91
<b>202</b>	HC	männlich	65	N/A	N/A	18	2	18	4	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	2	0,40 ± 0,09
<b>203</b>	HC	männlich	72	N/A	N/A	22	1	13	14	N/A	7	N/A	N/A	N/A	0	3	1,58 ± 0,47
<b>204</b>	HC	weiblich	50	N/A	N/A	15	2	18	18	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	5	1,42 ± 0,82
<b>205</b>	HC	männlich	62	N/A	N/A	16	2	13	11	N/A	9	N/A	N/A	N/A	0	9	1,97 ± 1,89
<b>206</b>	HC	männlich	43	N/A	N/A	21	0	14	0	N/A	10	N/A	N/A	N/A	0	0	7,07 ± 1,02
<b>207</b>	HC	männlich	57	N/A	N/A	22	0	15	3	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	1	1,56 ± 0,16
<b>208</b>	HC	weiblich	69	N/A	N/A	21	0	16	2	N/A	7	N/A	N/A	N/A	0	0	1,47 ± 0,14
<b>209</b>	HC	weiblich	48	N/A	N/A	13	3	17	3	N/A	12	N/A	N/A	N/A	0	0	10,77 ± 1,16
<b>210</b>	HC	weiblich	39	N/A	N/A	18	4	15	3	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	0	119,64 ± 11,56
<b>211</b>	HC	weiblich	42	N/A	N/A	17	3	18	21	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	0	3,28 ± 0,34
<b>212</b>	HC	weiblich	26	N/A	N/A	18	6	18	4	N/A	10	N/A	N/A	N/A	0	7	20,87 ± 3,72
<b>213</b>	HC	weiblich	53	N/A	N/A	15	1	17	2	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	3	2,67 ± 0,43
<b>214</b>	HC	weiblich	24	N/A	N/A	18	6	17	18	N/A	11	N/A	N/A	N/A	2	1	1,15 ± 0,58

<b>215</b>	HC	weiblich	52	N/A	N/A	15	4	13	46	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	4	1,14 ± 1,24
<b>216</b>	HC	weiblich	20	N/A	N/A	14	8	18	10	N/A	12	N/A	N/A	N/A	0	5	5,54 ± 1,23
<b>217</b>	HC	männlich	78	N/A	N/A	12	0	13	32	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1	5	2,82 ± 0,96
<b>218</b>	HC	weiblich	54	N/A	N/A	13	4	16	119	N/A	6	N/A	N/A	N/A	3	7	92,11 ± 26,32
<b>219</b>	HC	männlich	26	N/A	N/A	13	0	18	2	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	0	4,18 ± 0,92
<b>220</b>	HC	männlich	38	N/A	N/A	17	3	17	0	N/A	12	N/A	N/A	N/A	0	3	292,79 ± 91,38
<b>221</b>	HC	weiblich	81	N/A	N/A	13	4	10	71	N/A	12	N/A	N/A	N/A	4	5	35,53 ± 9,47
<b>222</b>	HC	weiblich	61	N/A	N/A	23	5	18	16	N/A	9	N/A	N/A	N/A	1	1	6,87 ± 1,11
<b>223</b>	HC	männlich	64	N/A	N/A	18	3	13	20	N/A	11	N/A	N/A	N/A	0	2	0,93 ± 0,45

PD: Parkinson Krankheit; iRBD: isolierte REM-Schlaf-Verhaltensstörung; HC: gesunde Kontrolle; CCCSS: Cleveland-Clinics-Obstipations Punktesystem; NMSS: Skala zur Erfassung nicht-motorischer Symptome; MDS-UPDRS III: Skala zur Verlaufsbeobachtung bei PD Teil III; RBDSQ: iRBD-Screening-Fragebogen; SD: Standard-Abweichung; N/A: nicht vorhanden

**Tabelle 5.14 – P-Werte der Tests auf Normalverteilung für  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen in Stuhlproben**

	PD-Patienten	iRBD-Patienten	HC
<b>Shapiro-Wilk</b>	0	0	$2,0 \cdot 10^{-12}$
<b>Lilliefors</b>	$3,5 \cdot 10^{-39}$	$5,4 \cdot 10^{-59}$	$5,1 \cdot 10^{-15}$
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	$6,0 \cdot 10^{-13}$	$1,7 \cdot 10^{-19}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
<b>Anderson-Darling</b>	$3,7 \cdot 10^{-54}$	$9,7 \cdot 10^{-61}$	$1,2 \cdot 10^{-21}$

PD: Parkinson-Krankheit; iRBD: isolierte REM-Schlaf-Verhaltensstörung; HC: gesunde Kontrolle

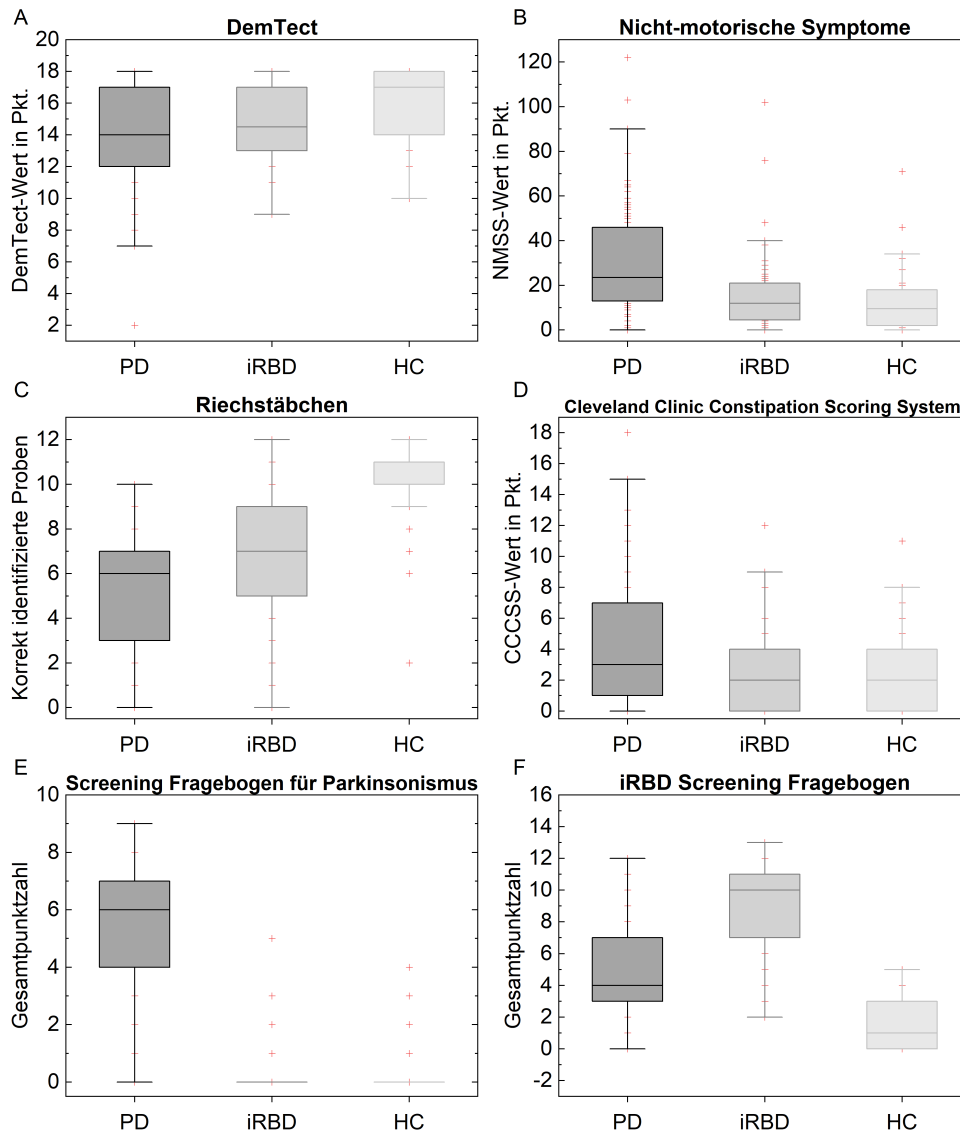
### 5.2.9 $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen sind in Stuhl von iRBD-Patienten erhöht

Ergebnisse der Tests auf Normalverteilung für die  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen der drei Kohorten ergaben, dass die Daten nicht normalverteilt waren (p-Werte < 0,05, s. Tabelle 5.14).

Alle erfassten demografischen und klinischen Daten wurden auf Korrelationen mit der  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentration mittels Spearman-Korrelationskoeffizienten getestet und sind beispielhaft für einige Daten in Tabelle 5.15 aufgeführt, da kaum Korrelationen festgestellt werden konnten.

Ein Sternchen (\*) markiert dabei eine signifikante Korrelation ( $p < 0,05$ )





**Abbildung 5.10 – Ergebnisse der klinischen Analysen für PD und iRBD-Patienten sowie HC.**

Die Ergebnisse basieren auf der mittels DemTect ermittelten kognitiven Leistung, dem NMSS-Fragebogen zur Erfassung nicht-motorischer Symptome, des Grads der Verstopfung basierend auf dem Cleveland Clinic Constipation Scoring System (CCCSS), der mittels von Riechstäbchen ermittelten Leistung des Geruchssinns, dem Screening-Fragebogen für Parkinsonismus und dem iRBD-Screening-Fragebogen (RBDSQ). (A) Die DemTect-Werte zeigten, dass die kognitive Leistung der HC ( $15,9 \pm 2,3$ ) signifikant höher war als die von PD-Patienten ( $13,8 \pm 3,3$ ,  $p < 0,001$ ) und von iRBD-Patienten ( $14,8 \pm 2,3$ ,  $p = 0,020$ ). (B) Basierend auf dem NMSS war die motorische Leistung von PD-Patienten signifikant schlechter als die von iRBD-Patienten ( $30,6 \pm 23,1$  vs.  $16,2 \pm 18,0$ ,  $p < 0,001$ ) und HC ( $12,5 \pm 14,4$ ,  $p < 0,001$ ). (C) Basierend auf dem CCCSS waren PD-Patienten ( $4,1 \pm 4,0$ ) signifikant häufiger ( $p < 0,05$ ) verstopft als iRBD-Patienten ( $2,8 \pm 2,7$ ) und HC ( $2,5 \pm 2,5$ ). (D) Auch die Riechleistung von PD-Patienten ( $5,3 \pm 2,6$ ) war signifikant schlechter ( $p < 0,01$ ) als die von iRBD-Patienten ( $6,6 \pm 2,7$ ) und HC ( $10,4 \pm 1,7$ ), basierend auf korrekt identifizierten Riechstäbchen. (E) PD-Patienten ( $5,6 \pm 2,2$ ) erzielten signifikant höhere Werte ( $p < 0,001$ ) als iRBD-Patienten ( $0,3 \pm 0,8$ ) und HC ( $0,3 \pm 0,8$ ) im Screening-Fragebogen für Parkinsonismus. (F) Der RBDSQ ergab signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) zwischen iRBD-Patienten ( $9,0 \pm 2,7$ ) und PD-Patienten ( $4,9 \pm 3,0$ ) oder HC ( $1,7 \pm 1,6$ ) sowie zwischen PD-Patienten und HC.

**Tabelle 5.15 – Spearman-Korrelationskoeffizienten für  $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen in Stuhlproben korreliert mit Alter, Bildung, Geschlecht, DemTect, Krankheitsdauer, MDS-UPDRS III oder Fragebögen für PD und iRBD**

	Alle Kohorten	PD-Patienten	iRBD-Patienten	HC
<b>Alter</b>	0.183 <sup>*</sup>	0.125	0.155	0.195
<b>Bildung</b>	0.041	0.088	0.124	-0.187
<b>Geschlecht</b>	0.008	0.007	-0.074	0.202
<b>DemTect</b>	0.074	0.221 <sup>*</sup>	-0.166	-0.140
<b>Krankheitsdauer</b>	-0.050	-0.003	0.069	N/A
<b>MDS-UPDRS III</b>	-0.282 <sup>*</sup>	-0.0004	-0.210	N/A
<b>Screening-Fragebogen für PD</b>	-0.154 <sup>*</sup>	0.057	0.031	0.066
<b>RBDSQ</b>	0.188 <sup>*</sup>	0.223 <sup>*</sup>	-0.020	-0.054

PD: Parkinson-Krankheit; iRBD: isolierte REM-Schlaf-Verhaltensstörung; HC: gesunde Kontrolle; MDS-UPDRS III: Skala zur Verlaufsbeobachtung bei PD Teil III; RBDSQ: iRBD-Screening-Fragebogen; N/A: nicht vorhanden; <sup>\*</sup>:  $p < 0,05$

## Manuskript

Das folgende Manuskript wurde für die Veröffentlichung nach Revision ein zweites Mal eingereicht, wurde allerdings noch nicht akzeptiert oder veröffentlicht.

### „Patients with isolated REM-sleep behavior disorder have elevated levels of alpha-synuclein aggregates in stool”

Autoren: Anja Schaffrath, Sophia Schleyken, Aline Seger, Hannah Jergas, Pelin Özdüzenciler, Marlene Pils, Lara Blömeke, Anneliese Cousin, Johannes Willbold, Tuyen Bujnicki, Oliver Banach, Gereon R. Fink, Dieter Willbold, Michael Sommerauer, Michael T. Barbe, Gültekin Tamgüney

Journal: npj Parkinson's disease

Eingereicht am 13.12.2022

DOI:

Impact Factor: 9,3 (2021)

Beitrag:

Entwicklung der sFIDA-Assay Parameter spezifisch für Stuhlproben

Durchführung und Auswertung der sFIDA Experimente für Stuhlproben

Hauptverfassung und Prüfung des Manuskriptes

## Danksagung

Als Erstes bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Gültekin Erdem Tamgüney der mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem tollen und vielseitigen Thema zu arbeiten. Während meiner gesamten Promotion haben mir unsere fachlichen Diskussionen sowie deine konstruktive und wissenschaftliche Unterstützung sehr geholfen. Du hast dir immer die Zeit genommen, meine Ergebnisse und Ideen zu besprechen. Auch für all meine Fragen hattest du immer ein offenes Ohr.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Dieter Willbold für die Übernahme der Zweitkorrektur sowie für die sehr hilfreichen Denkanstöße und Diskussionen zu meinem Projekt bedanken und die Möglichkeit am IBI-7 zu arbeiten.

Ganz besonders möchte ich mich bei der sFIDA-Gruppe bei Marlene Pils, Lara Blömeke, Victoria Kraemer-Schulien, Anneliese Cousin, Sandra Kienast und Karolina Korostov für die tolle Zusammenarbeit, Einarbeitung, Unterstützung und die anregenden fachlichen und privaten Gespräche bedanken. Ich konnte an euch alle meine Fragen richten und bei Problemen konnte ich mich auf eure Hilfe verlassen. Bei Dr. Oliver Bannach, Dr. Tuyen Bujnicki, Dr. Andreas Kulawik und Johannes Willbold aus der sFIDA-Gruppe möchte ich mich auch für die Unterstützung und konstruktiven Vorschläge zu meinem Manuskript bedanken. Ein besonderer Dank gilt Marlene Pils für die tolle Zusammenarbeit auch während schwieriger Phasen und das Korrekturlesen meiner Dissertation. Deine Ratschläge und die Gespräche mit dir haben mir immer sehr weitergeholfen.

Einen großen Dank möchte ich auch an das Team vom Kölner Uniklinikum, insbesondere an Gereon Fink, Michael Sommerauer, Michael Barbe, Sophia Schleyken, Aline Seger und Hannah Jergas für die Unterstützung meines Projektes und die geduldige Beantwortung all meiner Fragen sowie die Vervollständigung und Korrekturen des Manuskripts ausrichten.

Danke an meine Bürokollegen und Freunde Verena Pesch, Sara Reithofer und Liang Ma für die sehr lustige und fröhliche Zeit, die wir oft auch beim gemeinsamen Mittagessen oder anderen Unternehmungen verbracht haben.

Auch die vielen interessanten Gespräche während Mittags- und Kaffeepausen mit Julia Post-Schulz, Pelin Özdüzenciler, Katja Jansen, Lena Mangels, Mohammadamin Mastalipour (alias Amin), Sarah Schemmert, Dominik Honold, Benedikt Frieg, Lisa Jungbluth, Michael Schöneck, Karina Balduin, Nicole Niemetz und mit vielen weiteren tollen Menschen haben mir viel Freude bereitet.

Allen Mitarbeitern des IBI-7 bin ich sehr dankbar für das angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die spannenden Unterhaltungen und anregenden Diskussionen.

Last, but not least danke ich im Besonderen meinen Eltern Beate und Günter und meinem Bruder Jan, die mich in all meinen Bestrebungen stets unterstützt haben und mir Rückhalt und Sicherheit verliehen haben. Bei allen meinen Freunden bedanke ich mich auch für eure unerschütterliche Unterstützung, insbesondere bei den „Bingo Bunnies“ für unvergessliche spaßige und kulinarische Erlebnisse. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Ich danke euch allen für eure Motivation, Vertrauen und Geduld.

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Motorische Symptome von Patienten mit PD. . . . .	2
1.2	Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten sind Hauptmerkmale der $\alpha$ -Syn-Pathologie bei der PD. . . . .	7
1.3	Unterteilung der PD in sechs neuropathologische Krankheitsstufen nach Braak und Kollegen. . . . .	8
1.4	Illustration der hypothetischen Phänotypen, gemäß denen LB sich im Körper ausbreiten. . . . .	9
1.5	Schematische Darstellung der $\alpha$ -Syn-Domänen (a) sowie der membrangebundenen Struktur (b). . . . .	11
1.6	Mögliche posttranslationale Modifikationen (PTMs) an $\alpha$ -Syn in LB (obere PTMs) oder <i>in vitro</i> (untere PTMs). . . . .	12
1.7	Aggregation von $\alpha$ -Syn über Oligomere, Protofibrillen, Fibrillen und schließlich die Ablagerung in Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten. . . . .	13
1.8	Schematische Abbildung des sFIDA-Assay-Prinzips. . . . .	15
1.9	Schematische Darstellungen der TIRFM und Konfokal-Fluoreszenzmikroskopie zum Nachweis einzelner Partikel. . . . .	17
1.10	Mögliche Fehlerquellen in einem Immunoassay. . . . .	20
2.1	Schema der Probenvorbereitung für die Messung der Reproduzierbarkeit der Stuhllextraktion mit frischen oder gefrorenen Proben. . . . .	50
3.1	Titration des Fänger-AK und Test einer neuen Detektions-AK-Kombination. . . . .	61
3.2	Vergleich des Syn211-AK und EP1536Y-AK als Detektions-AK für die Detektion von $\alpha$ -Syn in Stuhlproben. . . . .	62
3.3	Darstellung der CV%-Werte im Vergleich für die Inkubation der fünf Replikate bei 4 °C ü. N., bei RT für 1 h oder bei 37 °C für 1 h. . . . .	64
3.4	Inkubation von fünf Replikaten einer Stuhlprobe bei 4 °C ü. N., bei RT für 1 h oder bei 37 °C für 1 h. . . . .	66
3.5	Test des EP1536Y-AK gegen phosphoryliertes S129 in $\alpha$ -Syn als Fänger-AK im Vergleich zum Syn211-AK. . . . .	68
3.6	Vergleich des EliA-Diluenten und 1 % BSA in TBS-PC als Verdünnungspuffer für Stuhlproben. . . . .	70
3.7	Vergleich von MP und BSA als blockierende Reagenzien jeweils für eine 1:400 und 1:600 Verdünnung der Stuhlproben. . . . .	74

3.8	Vergleich des SRV nach Blockieren bei 4 °C ü. N. (A–C) und nach Blockieren bei RT für 3 h (D–F) mit jeweils 0,5 % MP, welches in den Puffern TBS-PC, PBS-PC oder NaHCO <sub>3</sub> -PC gelöst wurde. . . . .	77
3.9	Die Antikörper EP1536Y, 4B12, 5G4, 4D6 und Syn211 wurden als Fänger-AK mit und ohne Detektions-AK getestet. . . . .	79
3.10	Vergleich des EliA-Extraktionspuffers mit 1 % BSA in TBS-PC als Stuhlextraktionspuffer jeweils mit und ohne Detektions-AK. . . . .	81
3.11	Es wurden jeweils drei Extrakte von drei Kontrollstuhlproben und von diesen jeweils drei Aliquots hergestellt und die frischen Stuhlproben im sFIDA-Assay gemessen. . . . .	83
3.12	Messung der gleichen Extrakte wie in Abbildung 21, allerdings waren die Aliquots für eine Woche bei -80 °C eingefroren. . . . .	84
3.13	Vergleich von unverdünnten, 1:2,5 und 1:5 mit 0,1 % BSA in TBS-PC und 0,05 % Tween20 verdünnten Stuhlproben. . . . .	87
3.14	Vergleich der AF mit dem Signal unverdünnter, 1:2,5 und 1:5 verdünnter Stuhlproben. . . . .	89
3.15	Vergleich der Konzentrationen von 0,313 µg/mL, 0,625 µg/mL und 1,25 µg/mL für die Detektionssonden Syn211-CF405S und Syn211-CF488A. . . . .	91
3.16	Histogramme der unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen für die Detektions-AK. . . . .	92
3.17	Aggregatkonzentrationen von 0 pM bis 8000 pM wurden entweder in Puffer oder in 1:50, 1:25, 1:12,5, 1:6,25 verdünnte oder unverdünnte Stuhlprobe einer Kontrolle <i>gespiked</i> . . . . .	94
3.18	Wiederfindungsrate von Aggregaten, die entweder in Puffer (Referenz) oder in 1:50, 1:25, 1:12,5, 1:6,25 verdünnte oder unverdünnte Stuhlprobe einer Kontrolle <i>gespiked</i> wurden. . . . .	95
3.19	Vergleich des Signals und der AF mit und ohne PTA-Fällung. . . . .	98
3.20	Vergleich der Syn211-, 4B12- und Syn1-AK als Fänger-AK. . . . .	99
3.21	Vergleich verschiedener Detektions-AK aus dem Syn211- und 4B12-AK. . . . .	100
3.22	Vergleich des 4B12- und Syn211-AK als Detektions-AK für die Detektion von α-Syn-Aggregaten und α-Syn-Monomeren. . . . .	104
3.23	sFIDA-Assay mit AK gegen α-Syn detektiert spezifisch α-Syn-Aggregate und α-Syn-SiNaPs, aber keine α-Syn-Monomere, Aβ-Aggregate oder Aβ-SiNaPs. . . . .	106
3.24	Repräsentative Fluoreszenzbilder von α-Syn-SiNaPs, synthetischen α-Syn-Aggregaten, α-Syn-Monomeren und einer PD-Stuhlprobe. . . . .	107
3.25	Wiederholte Messungen von α-Syn-Aggregaten in Stuhlproben und von α-Syn-SiNaPs zeigten höchst reproduzierbare Ergebnisse. . . . .	108
3.26	Beispielhafte Ergebnisse der Immundepletion für α-Syn-SiNaPs und synthetische α-Syn-Aggregate (Agg) sowie für fünf Stuhlproben. . . . .	110

3.27 Beispiel-Fluoreszenzaufnahmen von $\alpha$ -Syn-SiNaPs, $\alpha$ -Syn-Aggregaten und einer PD-Patientenstuhlprobe jeweils ohne Immundepletion, nach Kontroll-Immundepletion und nach Immundepletion mit Syn211. . . . .	111
3.28 Kalibrierte sFIDA-Ergebnisse und ROC-Kurven der Messung von $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhlproben. . . . .	114
5.1 Vergleich der blockierenden Reagenzien BSA, MP, BS und SB für 1:400 verdünnte Stuhlproben. . . . .	VII
5.2 Vergleich der blockierenden Reagenzien BSA, MP, BS und SB für 1:600 verdünnte Stuhlproben. . . . .	VIII
5.3 Vergleich der AF der blockierenden Reagenzien BSA, Milchpulver (MP), The Blocking Solution (BS) und Smart Block (SB) für die 1:600 Verdünnung einer Patientenstuhlprobe. . . . .	IX
5.4 Logarithmische Darstellung zur besseren Vergleichbarkeit der Extrakte und Aliquots der gefrorenen Stuhlproben. . . . .	X
5.5 Messung der AF der 1:50, 1:25, 1:12,5, 1:6,25 verdünnten oder unverdünnten Stuhlprobe. . . . .	XI
5.6 Der sFIDA-Assay mit AK gegen $\alpha$ -Syn detektiert spezifisch $\alpha$ -Syn-Aggregate und $\alpha$ -Syn-SiNaPs, aber keine $\alpha$ -Syn-Monomere, A $\beta$ -Aggregate oder A $\beta$ -SiNaPs. Logarithmische Darstellung der Ergebnisse. . . . .	XII
5.7 Ergebnisse der Immundepletion für alle PD-Patienten aufgeteilt in mehrere Graphen zur besseren Übersicht. . . . .	XIV
5.8 Ergebnisse der Immundepletion für alle iRBD-Patienten aufgeteilt in mehrere Graphen zur besseren Übersicht. . . . .	XV
5.9 Ergebnisse der Immundepletion für alle HC aufgeteilt in mehrere Graphen zur besseren Übersicht. . . . .	XVI
5.10 Ergebnisse der klinischen Analysen für PD und iRBD-Patienten sowie HC. . . . .	XXIX

# Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Puffer . . . . .	24
2.2	Verwendete Lösungen, Waschpuffer und Kit-Puffer . . . . .	25
2.3	Für den sFIDA-Assay verwendete AK . . . . .	27
2.4	Für die AK-Konjugation verwendete Fluorophore . . . . .	28
2.5	Für den sFIDA-Assay markierte AK und deren Bindestellen . . . . .	30
2.6	Physikalische Eigenschaften der verwendeten Fluorophore CF405S, CF488A und CF633 . . . . .	30
2.7	End-Konzentrationen und eingesetzte Mengen der Lösungen des PTA-Mastermix für 1 mL End-Volumen . . . . .	34
2.8	Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Assayentwicklung und die jeweiligen Assaybedingungen . . . . .	37
2.9	Getestete Blockierungspuffer mit der jeweiligen Konzentration und pH-Wert . . . . .	48
2.10	Getestete Fänger-AK gegen $\alpha$ -Syn mit dem jeweilige Epitop . . . . .	49
2.11	Übersicht über die getesteten Konzentrationen des Syn211-Detektions-AK mit verschiedenen Fluorophor-Kombinationen . . . . .	51
2.12	Kombination der Fänger- und Detektions-AK-Varianten . . . . .	52
2.13	Kombination der Fänger- und Detektions-AK Varianten . . . . .	53
2.14	Anregungs- und Emissionswellenlänge der einzelnen Mikroskope . . . . .	56
2.15	Belichtungszeiten für die zwei Kanäle und eingestellter Gain für den CD7, das TIRFM und den IN Cell Analyzer 6500HS für die Experimente . . . . .	56
3.1	PKV im Vergleich für die alte und die neue Detektions-AK-Kombination bei einer Fänger-Konzentration von 10 $\mu$ g/mL . . . . .	61
3.2	PKV für den Syn211-AK und EP1536Y-AK als Detektions-AK . . . . .	63
3.3	Vergleich der Mittelwerte der Pixel-Werte und der sFIDA-Messwerte für alle Probeninkubationsbedingungen und der Extraktion mit und ohne PI . . . . .	65
3.4	PKV für den Syn211-AK und den EP1536Y-AK als Fänger-AK . . . . .	67
3.5	Differenz zwischen Signal und AF für den EliA-Diluenten oder 1 % BSA in TBS-PC als Verdünnungspuffer . . . . .	71
3.6	Vergleich des PKV für eine 1:400 und 1:600 Verdünnung der Stuhlproben mit BSA oder MP als blockierendes Reagenz . . . . .	75
3.7	SRV der AF von drei Stuhlproben für die verschiedenen Blockierungspuffer und Inkubationszeiten für das Blockieren mit 0,5 % MP . . . . .	78
3.8	PKV für die eingesetzten Fänger-AK . . . . .	79
3.9	Differenz zwischen Signal und AF für den EliA-Extraktionspuffer und 1 % BSA in TBS-PC . . . . .	82



---

3.10	Differenz zwischen Signal und AF für ein Aliquot der Extrakte . . . . .	85
3.11	Vergleich des PKV für alle Varianten mit unverdünnten, 1:2,5 und 1:5 verdünnten Stuhlproben . . . . .	88
3.12	Vergleich des SRV für die Detektions-AK-Kombinationen . . . . .	93
3.13	PKV für den 211- und 4B12-AK als Fänger-AK mit verschiedenen Detektions-AK .	102
3.14	Verdünnungslinearität für eine 1:5 Verdünnungsreihe der $\alpha$ -Syn-Aggregate mit dem Syn211- oder 4B12-AK als Detektions-AK . . . . .	103
3.15	LOD-Werte für jedes Experiment . . . . .	109
3.16	Demografische und klinische Informationen zu Patienten und HC, die Stuhlproben abgegeben haben. . . . .	112
3.17	Ergebnisse der ROC-Analyse auf Spezifität, Sensitivität und Fläche unter der Kurve (AUC) mit dem entsprechenden p-Wert für $\alpha$ -Syn-Aggregate in Stuhlproben . .	114
5.1	Verwendete Chemikalien . . . . .	I
5.3	Verwendete Verbrauchsmaterialien . . . . .	II
5.2	Verwendete Peptide . . . . .	II
5.4	Verwendete Geräte . . . . .	III
5.5	Verwendete Software . . . . .	V
5.6	Übersicht der Grenzwerte für die einzelnen Versuche . . . . .	V
5.7	Differenz zwischen Signal und AF für eine Patientenstuhlprobe für die 1:600 Verdünnung für das jeweilige blockierende Reagenz . . . . .	VI
5.8	SRV der AF für den EliA-Extraktionspuffer und 1 % BSA in TBS-PC . . . . .	VII
5.9	p-Werte des Vergleichs von frischen Extrakten der drei Kontrollstuhlproben, berechnet mittels <i>Two-Way</i> -ANOVA mit Holm-Sidak-Test . . . . .	IX
5.10	p-Werte des Vergleichs von gefrorenen Extrakten der drei Kontrollstuhlproben, berechnet mittels <i>Two-Way</i> -ANOVA mit Holm-Sidak-Test . . . . .	X
5.11	Differenz zwischen Signal und AF für die Stuhlverdünnungen 1:50 bis 1:6,25 verdünnt und unverdünnter Probe . . . . .	XI
5.12	Der Variationskoeffizient (CV %) jedes Experimentes für $\alpha$ -Syn-SiNaPs und Stuhlproben . . . . .	XIII
5.13	Demografische und klinische Informationen und Konzentrationen von $\alpha$ -Syn-Aggregaten in Stuhl von individuellen Personen . . . . .	XVIII
5.14	P-Werte der Tests auf Normalverteilung für $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen in Stuhlproben . . . . .	XXVIII
5.15	Spearman-Korrelationskoeffizienten für $\alpha$ -Syn-Aggregatkonzentrationen in Stuhlproben korreliert mit demographischen und klinischen Daten . . . . .	XXX

## Literatur

- [1] **Jellinger, K. A.** „Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update“. *Journal of cellular and molecular medicine* 14.3 (2010), S. 457–487.
- [2] **Dugger, B. N., Dickson, D. W.** „Pathology of Neurodegenerative Diseases“. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9.7 (2017).
- [3] **Nussbaum, R. L., Ellis, C. E.** „Alzheimer’s disease and Parkinson’s disease“. *The New England journal of medicine* 348.14 (2003), S. 1356–1364.
- [4] **Galvin, J. E., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q.** „Synucleinopathies: clinical and pathological implications“. *Archives of neurology* 58.2 (2001), S. 186–190.
- [5] **Lau, L. M. L. de, Breteler, M. M. B.** „Epidemiology of Parkinson’s disease“. *The Lancet Neurology* 5.6 (2006), S. 525–535.
- [6] **Lau, L. M. L. de, Giesbergen, P. C. L. M., Rijk, M. C. de, Hofman, A., Koudstaal, P. J., Breteler, M. M. B.** „Incidence of parkinsonism and Parkinson disease in a general population: the Rotterdam Study“. *Neurology* 63.7 (2004), S. 1240–1244.
- [7] **Sveinbjornsdottir, S.** „The clinical symptoms of Parkinson’s disease“. *Journal of neurochemistry* 139 Suppl 1 (2016), S. 318–324.
- [8] **James Parkinson.** *An Essay on the Shaking Palsy*, London: Sherwood, Neely, and Jones, 1817.
- [9] **Braak, H., Bohl, J. R., Müller, C. M., Rüb, U., Vos, R. A. I. de, Del Tredici, K.** „Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson’s disease reconsidered“. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 21.12 (2006), S. 2042–2051.
- [10] **EHRINGER, H., HORNYKIEWICZ, O.** „Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system“. *Klinische Wochenschrift* 38 (1960), S. 1236–1239.
- [11] **Lanciego, J. L., Luquin, N., Obeso, J. A.** „Functional neuroanatomy of the basal ganglia“. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2.12 (2012), a009621.
- [12] **Smith, J.** *Parkinson’s Disease Gene Therapy Clinical Trial Launched in UK*. 2018. URL: <https://www.labiotech.eu/trends-news/axovant-parkinsons-disease-gene/> (besucht am ).
- [13] **Heinzel, S., Berg, D., Gasser, T., Chen, H., Yao, C., Postuma, R. B.** „Update of the MDS research criteria for prodromal Parkinson’s disease“. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 34.10 (2019), S. 1464–1470.

- 
- [14] **Verstraeten, A., Theuns, J., van Broeckhoven, C.** „Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era“. *Trends in genetics : TIG* 31.3 (2015), S. 140–149.
- [15] **Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., Nussbaum, R. L.** „Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson’s disease“. *Science (New York, N.Y.)* 276.5321 (1997), S. 2045–2047.
- [16] **Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Eppelen, J. T., Schöls, L., Riess, O.** „Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson’s disease“. *Nature genetics* 18.2 (1998), S. 106–108.
- [17] **Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. W., Poewe, W.** „Challenges in the diagnosis of Parkinson’s disease“. *The Lancet. Neurology* 20.5 (2021), S. 385–397.
- [18] **Lees, A. J., Hardy, J., Revesz, T.** „Parkinson’s disease“. *The Lancet* 373.9680 (2009), S. 2055–2066.
- [19] **Cacabelos, R.** „Parkinson’s Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics“. *International journal of molecular sciences* 18.3 (2017).
- [20] **Kalia, L. V., Lang, A. E.** „Parkinson’s disease“. *The Lancet* 386.9996 (2015), S. 896–912.
- [21] **Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M., Kawaguchi, T., Tsunoda, T., Watanabe, M., Takeda, A., Tomiyama, H., Nakashima, K., Hasegawa, K., Obata, F., Yoshikawa, T., Kawakami, H., Sakoda, S., Yamamoto, M., Hattori, N., Murata, M., Nakamura, Y., Toda, T.** „Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson’s disease“. *Nature genetics* 41.12 (2009), S. 1303–1307.
- [22] **Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Bras, J. M., Sharma, M., Gibbs, J. R., Berg, D., Paisan-Ruiz, C., Lichtner, P., Scholz, S. W., Hernandez, D. G., Krüger, R., Federoff, M., Klein, C., Goate, A., Perlmutter, J., Bonin, M., Nalls, M. A., Illig, T., Gieger, C., Houlden, H., Steffens, M., Okun, M. S., Racette, B. A., Cookson, M. R., Foote, K. D., Fernandez, H. H., Traynor, B. J., Schreiber, S., Arepalli, S., Zonozi, R., Gwinn, K., van der Brug, M., Lopez, G., Chanock, S. J., Schatzkin, A., Park, Y., Hollenbeck, A., Gao, J., Huang, X., Wood, N. W., Lorenz, D., Deuschl, G., Chen, H., Riess, O., Hardy, J. A., Singleton, A. B., Gasser, T.** „Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson’s disease“. *Nature genetics* 41.12 (2009), S. 1308–1312.
-

- [23] **Magalhães, P., Lashuel, H. A.** „Opportunities and challenges of alpha-synuclein as a potential biomarker for Parkinson’s disease and other synucleinopathies“. *NPJ Parkinson’s disease* 8.1 (2022), S. 93.
- [24] **Tolosa, E., Gaig, C., Santamaría, J., Compta, Y.** „Diagnosis and the premotor phase of Parkinson disease“. *Neurology* 72.7 Suppl (2009), S12–20.
- [25] **Clairembault, T., Kamphuis, W., Leclair-Visonneau, L., Rolli-Derkinderen, M., Coron, E., Neunlist, M., Hol, E. M., Derkinderen, P.** „Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson’s disease“. *Journal of neurochemistry* 130.6 (2014), S. 805–815.
- [26] **Lionnet, A., Leclair-Visonneau, L., Neunlist, M., Murayama, S., Takao, M., Adler, C. H., Derkinderen, P., Beach, T. G.** „Does Parkinson’s disease start in the gut?“ *Acta Neuropathologica* 135.1 (2018), S. 1–12.
- [27] **Harapan, B. N., Frydrychowicz, C., Classen, J., Wittekind, C., Gradistanac, T., Rumpf, J.-J., Mueller, W.** „No enhanced (p-)  $\alpha$ -synuclein deposition in gastrointestinal tissue of Parkinson’s disease patients“. *Parkinsonism & Related Disorders* 80 (2020), S. 82–88.
- [28] **Gries, M., Christmann, A., Schulte, S., Weyland, M., Rommel, S., Martin, M., Baller, M., Röth, R., Schmitteckert, S., Unger, M., Liu, Y., Sommer, F., Mühlhaus, T., Schroda, M., Timmermans, J.-P., Pintelon, I., Rappold, G. A., Britschgi, M., Lashuel, H., Menger, M. D., Laschke, M. W., Niesler, B., Schäfer, K.-H.** „Parkinson mice show functional and molecular changes in the gut long before motoric disease onset“. *Molecular neurodegeneration* 16.1 (2021), S. 34.
- [29] **Schapira, A. H., Chaudhuri, K. R., Jenner, P.** „Non-motor features of Parkinson disease“. *Nature reviews. Neuroscience* 18.7 (2017). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28592904/>.
- [30] **Postuma, R. B., Iranzo, A., Hu, M., Högl, B., Boeve, B. F., Manni, R., Oertel, W. H., Arnulf, I., Ferini-Strambi, L., Puligheddu, M., Antelmi, E., Cochen De Cock, V., Arnaldi, D., Mollenhauer, B., Videnovic, A., Sonka, K., Jung, K.-Y., Kunz, D., Dauvilliers, Y., Provini, F., Lewis, S. J., Buskova, J., Pavlova, M., Heidebreder, A., Montplaisir, J. Y., Santamaria, J., Barber, T. R., Stefani, A., St Louis, E. K., Terzaghi, M., Janzen, A., Leu-Semenescu, S., Plazzi, G., Nobili, F., Sixel-Doering, F., Dusek, P., Bes, F., Cortelli, P., Ehgoetz Martens, K., Gagnon, J.-F., Gaig, C., Zucconi, M., Trenkwalder, C., Gan-Or, Z., Lo, C., Rolinski, M., Mahlknecht, P., Holzkecht, E., Boeve, A. R., Teigen, L. N., Toscano, G., Mayer, G., Morbelli, S., Dawson, B., Pelletier, A.** „Risk and predictors of dementia and parkinsonism in idiopathic REM sleep behaviour disorder: a multicentre study“. *Brain : a journal of neurology* 142.3 (2019), S. 744–759.

- 
- [31] **Schenck, C. H., Bundlie, S. R., Mahowald, M. W.** „Delayed emergence of a parkinsonian disorder in 38% of 29 older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder“. *Neurology* 46.2 (1996), S. 388–393.
- [32] **Fedorova, T. D., Knudsen, K., Andersen, K. B., Horsager, J., Skjærbæk, C., Beier, C. P., Sommerauer, M., Svendsen, K. B., Otto, M., Borghammer, P.** „Imaging progressive peripheral and central dysfunction in isolated REM sleep behaviour disorder after 3 years of follow-up“. *Parkinsonism & Related Disorders* 101 (2022), S. 99–104.
- [33] **Iranzo, A., Tolosa, E., Gelpi, E., Molinuevo, J. L., Valldeoriola, F., Serradell, M., Sanchez-Valle, R., Vilaseca, I., Lomeña, F., Vilas, D., LLadó, A., Gaig, C., Santamaria, J.** „Neurodegenerative disease status and post-mortem pathology in idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: an observational cohort study“. *The Lancet Neurology* 12.5 (2013), S. 443–453.
- [34] **Miglis, M. G., Adler, C. H., Antelmi, E., Arnaldi, D., Baldelli, L., Boeve, B. F., Cesari, M., Dall’Antonia, I., Diederich, N. J., Doppler, K., Dušek, P., Ferri, R., Gagnon, J.-F., Gan-Or, Z., Hermann, W., Högl, B., Hu, M. T., Iranzo, A., Janzen, A., Kuzkina, A., Lee, J.-Y., Leenders, K. L., Lewis, S. J. G., Liguori, C., Liu, J., Lo, C., Ehgoetz Martens, K. A., Nepozitek, J., Plazzi, G., Provini, F., Puligheddu, M., Rolinski, M., Rusz, J., Stefani, A., Summers, R. L. S., Yoo, D., Zitser, J., Oertel, W. H.** „Biomarkers of conversion to  $\alpha$ -synucleinopathy in isolated rapid-eye-movement sleep behaviour disorder“. *The Lancet Neurology* 20.8 (2021), S. 671–684.
- [35] **Jankovic, J.** „Parkinson’s disease: clinical features and diagnosis“. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 79.4 (2008), S. 368–376.
- [36] **Hughes, A. J., Daniel, S. E., Ben-Shlomo, Y., Lees, A. J.** „The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service“. *Brain : a journal of neurology* 125.Pt 4 (2002), S. 861–870.
- [37] **Davie, C. A.** „A review of Parkinson’s disease“. *British medical bulletin* 86 (2008), S. 109–127.
- [38] **Berg, D., Lang, A. E., Postuma, R. B., Maetzler, W., Deuschl, G., Gasser, T., Siderowf, A., Schapira, A. H., Oertel, W., Obeso, J. A., Olanow, C. W., Poewe, W., Stern, M.** „Changing the research criteria for the diagnosis of Parkinson’s disease: obstacles and opportunities“. *The Lancet Neurology* 12.5 (2013), S. 514–524.
- [39] **Doppler, C. E. J., Smit, J. A. M., Hommelsen, M., Seger, A., Horsager, J., Kinnerup, M. B., Hansen, A. K., Fedorova, T. D., Knudsen, K., Otto, M., Nahimi, A., Borghammer, P., Sommerauer, M.** „Microsleep disturbances are associated with noradrenergic dysfunction in Parkinson’s disease“. *Sleep* 44.8 (2021).
-

- [40] **Stiasny-Kolster, K., Mayer, G., Schäfer, S., Möller, J. C., Heinzl-Gutenbrunner, M., Oertel, W. H.** „The REM sleep behavior disorder screening questionnaire—a new diagnostic instrument“. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 22.16 (2007), S. 2386–2393.
- [41] **Berry, R. B., Brooks, R. & Gamaldo, C. E.** „The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: rules, terminology and technical specifications, version 2.6.0.“ Darien, Illinois, American Academy of Sleep Medicine (2020).
- [42] **Hoehn, M. M., Yahr, M. D.** „Parkinsonism: onset, progression and mortality“. *Neurology* 17.5 (1967), S. 427–442.
- [43] **Goetz, C. G., Fahn, S., Martinez-Martin, P., Poewe, W., Sampaio, C., Stebbins, G. T., Stern, M. B., Tilley, B. C., Dodel, R., Dubois, B., Holloway, R., Jankovic, J., Kulisevsky, J., Lang, A. E., Lees, A., Leurgans, S., LeWitt, P. A., Nyenhuis, D., Olanow, C. W., Rascol, O., Schrag, A., Teresi, J. A., van Hilten, J. J., LaPelle, N.** „Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson’s Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Process, format, and clinimetric testing plan“. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 22.1 (2007), S. 41–47.
- [44] **Chaudhuri, K. R., Martinez-Martin, P., Brown, R. G., Sethi, K., Stocchi, F., Odin, P., Ondo, W., Abe, K., Macphee, G., Macmahon, D., Barone, P., Rabey, M., Forbes, A., Breen, K., Tluk, S., Naidu, Y., Olanow, W., Williams, A. J., Thomas, S., Rye, D., Tsuboi, Y., Hand, A., Schapira, A. H. V.** „The metric properties of a novel non-motor symptoms scale for Parkinson’s disease: Results from an international pilot study“. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 22.13 (2007), S. 1901–1911.
- [45] **Kalbe, E., Kessler, J., Calabrese, P., Smith, R., Passmore, A. P., Brand, M., Bullock, R.** „DemTect: a new, sensitive cognitive screening test to support the diagnosis of mild cognitive impairment and early dementia“. *International journal of geriatric psychiatry* 19.2 (2004), S. 136–143.
- [46] **Fox, S. H., Katzenschlager, R., Lim, S.-Y., Barton, B., Bie, R. M. A. de, Seppi, K., Coelho, M., Sampaio, C.** „International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: Update on treatments for the motor symptoms of Parkinson’s disease“. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 33.8 (2018), S. 1248–1266.
- [47] **Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., Goedert, M.** „Alpha-synuclein in Lewy bodies“. *Nature* 388.6645 (1997), S. 839–840.
- [48] **Lang, A. E., Lozano, A. M.** „Parkinson’s disease. Second of two parts“. *The New England journal of medicine* 339.16 (1998), S. 1130–1143.

- 
- [49] **Braak, H., Del Tredici, K.** „Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson’s disease“. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology* 201 (2009), S. 1–119.
- [50] **Braak, H., Rüb, U., Gai, W. P., Del, T. K.** „Idiopathic Parkinson’s disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen“. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 110.5 (2003). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12721813/>.
- [51] **Goedert, M.** „Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases“. *Nature Reviews Neuroscience* 2.7 (2001), S. 492–501. URL: <https://www.nature.com/articles/35081564.pdf>.
- [52] **Oliveira, L. M. A., Gasser, T., Edwards, R., Zweckstetter, M., Melki, R., Stefanis, L., Lashuel, H. A., Sulzer, D., Vekrellis, K., Halliday, G. M., Tomlinson, J. J., Schlossmacher, M., Jensen, P. H., Schulze-Hentrich, J., Riess, O., Hirst, W. D., El-Agnaf, O., Mollenhauer, B., Lansbury, P., Outeiro, T. F.** „Alpha-synuclein research: defining strategic moves in the battle against Parkinson’s disease“. *NPJ Parkinson’s disease* 7.1 (2021), S. 65.
- [53] **Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., Goedert, M.** „alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson’s disease and dementia with lewy bodies“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95.11 (1998), S. 6469–6473.
- [54] **Lippa, C. F., Fujiwara, H., Mann, D. M., Giasson, B., Baba, M., Schmidt, M. L., Nee, L. E., O’Connell, B., Pollen, D. A., St. George-Hyslop, P., Ghetti, B., Nochlin, D., Bird, T. D., Cairns, N. J., Lee, V. M.-Y., Iwatsubo, T., Trojanowski, J. Q.** „Lewy Bodies Contain Altered  $\alpha$ -Synuclein in Brains of Many Familial Alzheimer’s Disease Patients with Mutations in Presenilin and Amyloid Precursor Protein Genes“. *The American Journal of Pathology* 153.5 (1998), S. 1365–1370.
- [55] **Grazia Spillantini, M., Anthony Crowther, R., Jakes, R., Cairns, N. J., Lantos, P. L., Goedert, M.** „Filamentous  $\alpha$ -synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson’s disease and dementia with Lewy bodies“. *Neuroscience letters* 251.3 (1998), S. 205–208.
- [56] **Hawkes, C. H., Del Tredici, K., Braak, H.** „Parkinson’s disease: a dual-hit hypothesis“. *Neuropathology and applied neurobiology* 33.6 (2007), S. 599–614.
- [57] **Hawkes, C. H., Del Tredici, K., Braak, H.** „Parkinson’s disease: the dual hit theory revisited“. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1170 (2009), S. 615–622.
- [58] **Borghammer, P., van den Berge, N.** „Brain-First versus Gut-First Parkinson’s Disease: A Hypothesis“. *Journal of Parkinson’s disease* 9.s2 (2019), S281–S295.

- [59] **Clayton, D. F., George, J. M.** „The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease“. *Trends in Neurosciences* 21.6 (1998), S. 249–254.
- [60] **Maroteaux, L., Campanelli, J. T., Scheller, R. H.** „Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal“. *The Journal of Neuroscience* 8.8 (1988), S. 2804–2815.
- [61] **Uéda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D. A., Kondo, J., Ihara, Y., Saitoh, T.** „Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90.23 (1993), S. 11282–11286.
- [62] **Jakes, R., Spillantini, M. G., Goedert, M.** „Identification of two distinct synucleins from human brain“. *FEBS letters* 345.1 (1994), S. 27–32. URL: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00395-5](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(94)00395-5).
- [63] **Emamzadeh, F. N.** „Alpha-synuclein structure, functions, and interactions“. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* 21 (2016), S. 29.
- [64] **Fitzpatrick, A. W. P., Debelouchina, G. T., Bayro, M. J., Clare, D. K., Caporini, M. A., Bajaj, V. S., Jaroniec, C. P., Wang, L., Ladizhansky, V., Müller, S. A., MacPhee, C. E., Waudby, C. A., Mott, H. R., Simone, A. de, Knowles, T. P. J., Saibil, H. R., Vendruscolo, M., Orlova, E. V., Griffin, R. G., Dobson, C. M.** „Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- $\beta$ amyloid fibril“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110.14 (2013), S. 5468–5473.
- [65] **Marques, O., Outeiro, T. F.** „Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death“. *Cell Death & Disease* 3.7 (2012), e350–e350. URL: <https://www.nature.com/articles/cddis201294.pdf>.
- [66] **Török, N., Majláth, Z., Szalárdy, L., Vécsei, L.** „Investigational  $\alpha$ -synuclein aggregation inhibitors: hope for Parkinson’s disease“. *Expert opinion on investigational drugs* 25.11 (2016), S. 1281–1294.
- [67] **Zarranz, J. J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., Llorens, V., Gomez Tortosa, E., del Ser, T., Muñoz, D. G., Yébenes, J. G. de.** „The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia“. *Annals of Neurology* 55.2 (2004), S. 164–173.
- [68] **Proukakis, C., Dudzik, C. G., Brier, T., MacKay, D. S., Cooper, J. M., Millhauser, G. L., Houlden, H., Schapira, A. H.** „A novel  $\alpha$ -synuclein missense mutation in Parkinson disease“. *Neurology* 80.11 (2013), S. 1062–1064.



- 
- [69] **Hoffman-Zacharska, D., Kozirowski, D., Ross, O. A., Milewski, M., Poznanski, J. A., Jurek, M., Wszolek, Z. K., Soto-Ortolaza, A., Awek, J. A. S., Janik, P., Jamrozik, Z., Potulska-Chromik, A., Jasinska-Myga, B., Opala, G., Krygowska-Wajs, A., Czyzewski, K., Dickson, D. W., Bal, J., Friedman, A.** „Novel A18T and pA29S substitutions in  $\alpha$ -synuclein may be associated with sporadic Parkinson's disease“. *Parkinsonism & Related Disorders* 19.11 (2013), S. 1057–1060.
- [70] **Pasanen, P., Myllykangas, L., Siitonen, M., Raunio, A., Kaakkola, S., Lyytinen, J., Tieneri, P. J., Pöyhönen, M., Paetau, A.** „Novel  $\alpha$ -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology“. *Neurobiology of aging* 35.9 (2014), 2180.e1–5.
- [71] **Yoshino, H., Hirano, M., Stoessl, A. J., Imamichi, Y., Ikeda, A., Li, Y., Funayama, M., Yamada, I., Nakamura, Y., Sossi, V., Farrer, M. J., Nishioka, K., Hattori, N.** „Homozygous alpha-synuclein p.A53V in familial Parkinson's disease“. *Neurobiology of aging* 57 (2017), 248.e7–248.e12.
- [72] **Liu, H., Koros, C., Strohäker, T., Schulte, C., Bozi, M., Varvaresos, S., Ibáñez de Opakua, A., Simitsi, A. M., Bougea, A., Voumvourakis, K., Maniati, M., Papageorgiou, S. G., Hauser, A.-K., Becker, S., Zweckstetter, M., Stefanis, L., Gasser, T.** „A Novel SNCA A30G Mutation Causes Familial Parkinson's Disease“. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 36.7 (2021), S. 1624–1633.
- [73] **Kiely, A. P., Asi, Y. T., Kara, E., Limousin, P., Ling, H., Lewis, P., Proukakis, C., Quinn, N., Lees, A. J., Hardy, J., Revesz, T., Houlden, H., Holton, J. L.** „ $\alpha$ -Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy?“ *Acta Neuropathologica* 125.5 (2013), S. 753–769.
- [74] **Kapasi, A., Brosch, J. R., Nudelman, K. N., Agrawal, S., Foroud, T. M., Schneider, J. A.** „A novel SNCA E83Q mutation in a case of dementia with Lewy bodies and atypical frontotemporal lobar degeneration“. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 40.6 (2020), S. 620–626.
- [75] **Oueslati, A., Fournier, M., Lashuel, H. A.** „Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of  $\alpha$ -synuclein“. *Recent advances in Parkinson's disease*. Hrsg. von **A. Björlund, M. A. Cenci**. Bd. 183. *Progress in Brain Research*. Amsterdam: Elsevier, 2010, S. 115–145.
- [76] **Snead, D., Eliezer, D.** „Alpha-synuclein function and dysfunction on cellular membranes“. *Experimental neurobiology* 23.4 (2014), S. 292–313.
- [77] **Park, S. M., Jung, H. Y., Kim, T. D., Park, J. H., Yang, C.-H., Kim, J.** „Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal-solubilizing domain of alpha-synuclein, a molecular chaperone“. *Journal of Biological Chemistry* 277.32 (2002), S. 28512–28520.
-

- [78] **Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M. R., Südhof, T. C.** „Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro“. *Science (New York, N.Y.)* 329.5999 (2010), S. 1663–1667.
- [79] **Schmid, A. W., Fauvet, B., Moniatte, M., Lashuel, H. A.** „Alpha-synuclein post-translational modifications as potential biomarkers for Parkinson disease and other synucleinopathies“. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 12.12 (2013), S. 3543–3558.
- [80] **Schweighauser, M., Shi, Y., Tarutani, A., Kametani, F., Murzin, A. G., Ghetti, B., Matsubara, T., Tomita, T., Ando, T., Hasegawa, K., Murayama, S., Yoshida, M., Hasegawa, M., Scheres, S. H. W., Goedert, M.** „Structures of  $\alpha$ -synuclein filaments from multiple system atrophy“. *Nature* 585.7825 (2020), S. 464–469.
- [81] **Yang, Y., Shi, Y., Schweighauser, M., Zhang, X., Kotecha, A., Murzin, A. G., Garringer, H. J., Cullinane, P. W., Saito, Y., Foroud, T., Warner, T. T., Hasegawa, K., Vidal, R., Murayama, S., Revesz, T., Ghetti, B., Hasegawa, M., Lashley, T., Scheres, S. H., Goedert, M.** *Cryo-EM structures of  $\alpha$ -synuclein filaments from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies*. Bd. 9. 2022.
- [82] **Wakabayashi, K., Yoshimoto, M., Tsuji, S., Takahashi, H.** „ $\alpha$ -Synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy“. *Neuroscience letters* 249.2-3 (1998), S. 180–182.
- [83] **Fusco, G., Chen, S. W., Williamson, P. T. F., Cascella, R., Perni, M., Jarvis, J. A., Cecchi, C., Vendruscolo, M., Chiti, F., Cremades, N., Ying, L., Dobson, C. M., Simone, A. de.** „Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by  $\alpha$ -synuclein oligomers“. *Science (New York, N.Y.)* 358.6369 (2017), S. 1440–1443.
- [84] **Cremades, N., Cohen, S. I. A., Deas, E., Abramov, A. Y., Chen, A. Y., Orte, A., Sandal, M., Clarke, R. W., Dunne, P., Aprile, F. A., Bertocini, C. W., Wood, N. W., Knowles, T. P. J., Dobson, C. M., Klenerman, D.** „Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of  $\alpha$ -synuclein“. *Cell* 149.5 (2012), S. 1048–1059.
- [85] **Wong, Y. C., Krainc, D.** „ $\alpha$ -synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies“. *Nature medicine* 23.2 (2017), S. 1–13.
- [86] **Nam, D., Lee, J.-Y., Lee, M., Kim, J., Seol, W., Son, I., Ho, D. H.** „Detection and Assessment of  $\alpha$ -Synuclein Oligomers in the Urine of Parkinson's Disease Patients“. *Journal of Parkinson's disease* 10.3 (2020), S. 981–991.
- [87] **Vivacqua, G., Suppa, A., Mancinelli, R., Belvisi, D., Fabbrini, A., Costanzo, M., Formica, A., Onori, P., Fabbrini, G., Berardelli, A.** „Salivary alpha-synuclein in the diagnosis of Parkinson's disease and Progressive Supranuclear Palsy“. *Parkinsonism & Related Disorders* 63 (2019), S. 143–148.

- 
- [88] **Luan, M., Sun, Y., Chen, J., Jiang, Y., Li, F., Wei, L., Sun, W., Ma, J., Song, L., Liu, J., Liu, B., Pei, Y., Wang, Z., Zhu, L., Deng, J.** „Diagnostic Value of Salivary Real-Time Quaking-Induced Conversion in Parkinson’s Disease and Multiple System Atrophy“. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 37.5 (2022), S. 1059–1063.
- [89] **Hamm-Alvarez, S. F., Okamoto, C. T., Janga, S. R., Feigenbaum, D., Edman, M. C., Freire, D., Shah, M., Ghanshani, R., Mack, W. J., Lew, M. F.** „Oligomeric  $\alpha$ -synuclein is increased in basal tears of Parkinson’s patients“. *Biomarkers in medicine* 13.11 (2019), S. 941–952.
- [90] **Wang, Z., Becker, K., Donadio, V., Siedlak, S., Yuan, J., Rezaee, M., Incensi, A., Kuzkina, A., Orrú, C. D., Tatsuoka, C., Liguori, R., Gunzler, S. A., Caughey, B., Jimenez-Capdeville, M. E., Zhu, X., Doppler, K., Cui, L., Chen, S. G., Ma, J., Zou, W.-Q.** „Skin  $\alpha$ -Synuclein Aggregation Seeding Activity as a Novel Biomarker for Parkinson Disease“. *JAMA Neurology* 78.1 (2021), S. 30.
- [91] **Luca, C. M. G. de, Elia, A. E., Portaleone, S. M., Cazzaniga, F. A., Rossi, M., Bistaffa, E., Cecco, E. de, Narkiewicz, J., Salzano, G., Carletta, O., Romito, L., Devigili, G., Soliveri, P., Tiraboschi, P., Legname, G., Tagliavini, F., Eleopra, R., Giaccone, G., Moda, F.** „Efficient RT-QulC seeding activity for  $\alpha$ -synuclein in olfactory mucosa samples of patients with Parkinson’s disease and multiple system atrophy“. *Translational neurodegeneration* 8 (2019), S. 24.
- [92] **Tokuda, T., Qureshi, M. M., Ardah, M. T., Varghese, S., Shehab, S. A. S., Kasai, T., Ishigami, N., Tamaoka, A., Nakagawa, M., El-Agnaf, O. M. A.** „Detection of elevated levels of  $\alpha$ -synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease“. *Neurology* 75.20 (2010), S. 1766–1772.
- [93] **Kluge, A., Bunk, J., Schaeffer, E., Drobny, A., Xiang, W., Knacke, H., Bub, S., Lückstädt, W., Arnold, P., Lucius, R., Berg, D., Zunke, F.** „Detection of neuron-derived pathological  $\alpha$ -synuclein in blood“. *Brain : a journal of neurology* (2022).
- [94] **Bongianni, M., Catalan, M., Perra, D., Fontana, E., Janes, F., Bertolotti, C., Sacchetto, L., Capaldi, S., Tagliapietra, M., Polverino, P., Tommasini, V., Bellavita, G., Kachoiie, E. A., Baruca, R., Bernardini, A., Valente, M., Fiorini, M., Bronzato, E., Tamburin, S., Bertolasi, L., Brozzetti, L., Cecchini, M. P., Gigli, G., Monaco, S., Manganotti, P., Zanusso, G.** „Olfactory swab sampling optimization for  $\alpha$ -synuclein aggregate detection in patients with Parkinson’s disease“. *Translational neurodegeneration* 11.1 (2022), S. 37.
- [95] **Shannon, K. M., Keshavarzian, A., Mutlu, E., Dodiya, H. B., Daian, D., Jaglin, J. A., Kordower, J. H.** „Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson’s
-

- disease“. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 27.6 (2012), S. 709–715.
- [96] **Stokholm, M. G., Danielsen, E. H., Hamilton-Dutoit, S. J., Borghammer, P.** „Pathological  $\alpha$ -synuclein in gastrointestinal tissues from prodromal Parkinson disease patients“. *Annals of neurology* 79.6 (2016), S. 940–949.
- [97] **Woerman, A. L., Tamgüney, G.** „Body-first Parkinson’s disease and variant Creutzfeldt-Jakob disease - similar or different?“ *Neurobiology of Disease* 164 (2022), S. 105625.
- [98] **Tamgüney, G., Korczyn, A. D.** „A critical review of the prion hypothesis of human synucleinopathies“. *Cell and tissue research* 373.1 (2018), S. 213–220.
- [99] **van den Berge, N., Ferreira, N., Gram, H., Mikkelsen, T. W., Alstrup, A. K. O., Casadei, N., Tsung-Pin, P., Riess, O., Nyengaard, J. R., Tamgüney, G., Jensen, P. H., Borghammer, P.** „Evidence for bidirectional and trans-synaptic parasympathetic and sympathetic propagation of alpha-synuclein in rats“. *Acta Neuropathologica* 138.4 (2019), S. 535–550. URL: <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02040-w>.
- [100] **Arotcarena, M.-L., Dovero, S., Prigent, A., Bourdenx, M., Camus, S., Porras, G., Thioilat, M.-L., Tasselli, M., Aubert, P., Kruse, N., Mollenhauer, B., Trigo Damas, I., Estrada, C., Garcia-Carrillo, N., Vaikath, N. N., El-Agnaf, O. M. A., Herrero, M. T., Vila, M., Obeso, J. A., Derkinderen, P., Dehay, B., Bezard, E.** „Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of synucleinopathy in non-human primates“. *Brain* 143.5 (2020), S. 1462–1475.
- [101] **Willbold, D., Strodel, B., Schröder, G. F., Hoyer, W., Heise, H.** „Amyloid-type Protein Aggregation and Prion-like Properties of Amyloids“. *Chemical reviews* 121.13 (2021), S. 8285–8307.
- [102] **Lohmann, S., Bernis, M. E., Tachu, B. J., Ziemski, A., Grigoletto, J., Tamgüney, G.** „Oral and intravenous transmission of  $\alpha$ -synuclein fibrils to mice“. *Acta Neuropathologica* 138.4 (2019), S. 515–533.
- [103] **Wu, S., Hu, L., Lin, J., Li, K., Ye, S., Zhu, S., Liu, Z.** „Excretion of Amyloid- $\beta$  in the Gastrointestinal Tract and Regulation by the Gut Microbiota“. *Journal of Alzheimer’s disease : JAD* (2022).
- [104] **Kalia, L. V., Kalia, S. K., McLean, P. J., Lozano, A. M., Lang, A. E.** „ $\alpha$ -Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease“. *Annals of neurology* 73.2 (2013), S. 155–169.
- [105] **Weis, S., Meisner, A., Schwierz, A., Unger, M. M., Becker, A., Faßbender, K., Schnell, S., Schäfer, K.-H., Egert, M.** „Association between Parkinson’s disease and the faecal eukaryotic microbiota“. *NPJ Parkinson’s disease* 7.1 (2021), S. 101.

- 
- [106] **Tamgüney, G., Miller, M. W., Wolfe, L. L., Sirochman, T. M., Glidden, D. V., Palmer, C., Lemus, A., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B.** „Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces“. *Nature* 461.7263 (2009), S. 529–532.
- [107] **Terry, L. A., Howells, L., Bishop, K., Baker, C. A., Everest, S., Thorne, L., Maddison, B. C., Gough, K. C.** „Detection of prions in the faeces of sheep naturally infected with classical scrapie“. *Veterinary research* 42 (2011), S. 65.
- [108] **Kulenkampff, K., Wolf Perez, A.-M., Sormanni, P., Habchi, J., Vendruscolo, M.** „Quantifying misfolded protein oligomers as drug targets and biomarkers in Alzheimer and Parkinson diseases“. *Nature Reviews Chemistry* 5.4 (2021), S. 277–294.
- [109] **Schuster, J., Funke, S. A.** „Methods for the Specific Detection and Quantitation of Amyloid- $\beta$  Oligomers in Cerebrospinal Fluid“. *Journal of Alzheimer’s disease : JAD* 53.1 (2016), S. 53–67.
- [110] **Sierks, M. R., Chatterjee, G., McGraw, C., Kasturirangan, S., Schulz, P., Prasad, S.** „CSF levels of oligomeric alpha-synuclein and beta-amyloid as biomarkers for neurodegenerative disease“. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 3.12 (2011), S. 1188–1196.
- [111] **Knowles, T. P. J., Vendruscolo, M., Dobson, C. M.** „The amyloid state and its association with protein misfolding diseases“. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15.6 (2014), S. 384–396.
- [112] **Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., Glabe, C. G.** „Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis“. *Science (New York, N.Y.)* 300.5618 (2003), S. 486–489. URL: %5Curl%7Bhttps://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12702875/%7D.
- [113] **Kulawik, A., Heise, H., Zafiu, C., Willbold, D., Bannach, O.** „Advancements of the sFIDA method for oligomer-based diagnostics of neurodegenerative diseases“. *FEBS letters* 592.4 (2018), S. 516–534.
- [114] **Birkmann, E., Henke, F., Weinmann, N., Dumpitak, C., Groschup, M., Funke, A., Willbold, D., Riesner, D.** „Counting of single prion particles bound to a capture-antibody surface (surface-FIDA)“. *Veterinary microbiology* 123.4 (2007), S. 294–304.
- [115] **Birkmann, E., Schäfer, O., Weinmann, N., Dumpitak, C., Beekes, M., Jackman, R., Thorne, L., Riesner, D.** „Detection of prion particles in samples of BSE and scrapie by fluorescence correlation spectroscopy without proteinase K digestion“. *Biological chemistry* 387.1 (2006), S. 95–102.

- [116] **Wang-Dietrich, L., Funke, S. A., Kühbach, K., Wang, K., Besmehn, A., Willbold, S., Cinar, Y., Bannach, O., Birkmann, E., Willbold, D.** „The amyloid- $\beta$  oligomer count in cerebrospinal fluid is a biomarker for Alzheimer’s disease“. *Journal of Alzheimer’s disease* : JAD 34.4 (2013), S. 985–994.
- [117] **He, J.** „Practical Guide to ELISA Development“. *The immunoassay handbook*. Hrsg. von **D. Wild, R. John, C. Sheehan, S. Binder, J. He**. Bd. 21. Amsterdam: Elsevier, 2013, S. 381–393.
- [118] **Janissen, R., Oberbarnscheidt, L., Oesterhelt, F.** „Optimized straight forward procedure for covalent surface immobilization of different biomolecules for single molecule applications“. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 71.2 (2009), S. 200–207.
- [119] **Giasson, B. I., Jakes, R., Goedert, M., Duda, J. E., Leight, S., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M.** „A panel of epitope-specific antibodies detects protein domains distributed throughout human  $\tau$ -synuclein in lewy bodies of Parkinson’s disease“. *Journal of Neuroscience Research* 59.4 (2000), S. 528–533.
- [120] **Blömeke, L., Pils, M., Kraemer-Schulien, V., Dybala, A., Schaffrath, A., Kulawik, A., Rehn, F., Cousin, A., Nischwitz, V., Willbold, J., Zack, R., Tropea, T. F., Bujnicki, T., Tamgüney, G., Weintraub, D., Irwin, D., Grossman, M., Wolk, D. A., Trojanowski, J. Q., Bannach, O., Chen-Plotkin, A., Willbold, D.** „Quantitative detection of  $\alpha$ -Synuclein and Tau oligomers and other aggregates by digital single particle counting“. *NPJ Parkinson’s disease* 8.1 (2022), S. 68.
- [121] **Herrmann, Y., Bujnicki, T., Zafiu, C., Kulawik, A., Kühbach, K., Peters, L., Fabig, J., Willbold, J., Bannach, O., Willbold, D.** „Nanoparticle standards for immuno-based quantitation of  $\alpha$ -synuclein oligomers in diagnostics of Parkinson’s disease and other synucleinopathies“. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 466 (2017). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28088342/>.
- [122] **Herrmann, Y., Kulawik, A., Kühbach, K., Hülsemann, M., Peters, L., Bujnicki, T., Kravchenko, K., Linnartz, C., Willbold, J., Zafiu, C., Bannach, O., Willbold, D.** „sFIDA automation yields sub-femtomolar limit of detection for A $\beta$  aggregates in body fluids“. *Clinical biochemistry* 50.4-5 (2017). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27823959/>.
- [123] **Kravchenko, K., Kulawik, A., Hülsemann, M., Kühbach, K., Zafiu, C., Herrmann, Y., Linnartz, C., Peters, L., Bujnicki, T., Willbold, J., Bannach, O., Willbold, D.** „Analysis of anticoagulants for blood-based quantitation of amyloid  $\beta$  oligomers in the sFIDA assay“. *Biological chemistry* 398.4 (2017), S. 465–475.
- [124] **Hülsemann, M., Zafiu, C., Kühbach, K., Lühmann, N., Herrmann, Y., Peters, L., Linnartz, C., Willbold, J., Kravchenko, K., Kulawik, A., Willbold, S., Bannach, O., Willbold, D.** „Biofunctionalized Silica Nanoparticles: Standards in Amyloid- $\beta$ Oligomer-Based

- Diagnosis of Alzheimer's Disease". *Journal of Alzheimer's disease* : JAD 54.1 (2016), S. 79–88.
- [125] **Reck-Peterson, S. L., Derr, N. D., Stuurman, N.** „Imaging single molecules using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM)". *Cold Spring Harbor protocols* 2010.3 (2010), pdb.top73.
- [126] **Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I., Bootman, M. D.** „Fluorescence microscopy". *Cold Spring Harbor protocols* 2014.10 (2014), pdb.top071795.
- [127] **Davies, C.** „Immunoassay Performance Measures". *The immunoassay handbook*. Hrsg. von **D. Wild, R. John, C. Sheehan, S. Binder, J. He**. Bd. 11. Amsterdam: Elsevier, 2013, S. 11–26.
- [128] **Andreasson, U., Perret-Liaudet, A., van Waalwijk Doorn, L. J. C., Blennow, K., Chisserini, D., Engelborghs, S., Fladby, T., Genc, S., Kruse, N., Kuiperij, H. B., Kulic, L., Lewczuk, P., Mollenhauer, B., Mroczko, B., Parnetti, L., Vanmechelen, E., Verbeek, M. M., Winblad, B., Zetterberg, H., Koel-Simmelink, M., Teunissen, C. E.** „A Practical Guide to Immunoassay Method Validation". *Frontiers in neurology* 6 (2015), S. 179.
- [129] **Šimundić, A.-M.** „Measures of Diagnostic Accuracy: Basic Definitions". *EJIFCC* 19.4 (2009), S. 203–211.
- [130] **Walker, J. M., Crowther, J. R.** *The ELISA Guidebook*. Bd. 516. Totowa, NJ: Humana Press, 2009.
- [131] „Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry". FDA (<time datetime="2020-04-29T16:20:34Z">Wed, 04/29/2020 - 16:20</time>). URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry> (besucht am ).
- [132] **Glöggler, S., Rauch, P.** *Störeffekte bei Immunoassays*. Hrsg. von **Wiley Analytical Science**. <https://analyticalscience.wiley.com/do/10.1002/gitfach.15876>, 2017.
- [133] **Fichorova, R. N., Richardson-Harman, N., Alfano, M., Belec, L., Carbonneil, C., Chen, S., Cosentino, L., Curtis, K., Dezzutti, C. S., Donoval, B., Doncel, G. F., Donaghay, M., Grivel, J.-C., Guzman, E., Hayes, M., Herold, B., Hillier, S., Lackman-Smith, C., Landay, A., Margolis, L., Mayer, K. H., Pasicznyk, J.-M., Pallansch-Cokonis, M., Poli, G., Reichelderfer, P., Roberts, P., Rodriguez, I., Saidi, H., Sassi, R. R., Shattock, R., Cummins, J. E.** „Biological and technical variables affecting immunoassay recovery of cytokines from human serum and simulated vaginal fluid: a multicenter study". *Analytical chemistry* 80.12 (2008), S. 4741–4751.
- [134] *Reference man: anatomical, physiological and metabolic characteristics, ser. Report of Task Group on Reference Man-International Commission on radiological protection*. 1975. URL: <https://koha.mdc-berlin.de/contents/01-00419.pdf>.

- [135] **Nerius, M., Doblhammer, G., Tamgüney, G.** „GI infections are associated with an increased risk of Parkinson’s disease“. *Gut* 69.6 (2019), S. 1154–1156. URL: <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318822>.
- [136] **Brandt, D., Figard, S.** „Immunoassay Development in the In Vitro Diagnostic Industry“. *The immunoassay handbook*. Hrsg. von **D. Wild, R. John, C. Sheehan, S. Binder, J. He.** Amsterdam: Elsevier, 2013, S. 417–423.
- [137] **Grandke, J., Resch-Genger, U., Bremser, W., Garbe, L.-A., Schneider, R. J.** „Quality assurance in immunoassay performance-temperature effects“. *Analytical Methods* 4.4 (2012), S. 901.
- [138] **Kuwert, T., Bockisch, A., Eil, P. J.**, Hrsg. *Nuklearmedizin: 1.6 Immunoassays, Qualitätskontrolle*. 4., neu erstellte und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2008.
- [139] **Braak, H., de, V. R. A., Bohl, J., Del, T. K.** „Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner’s and Auerbach’s plexuses in cases staged for Parkinson’s disease-related brain pathology“. *Neuroscience letters* 396.1 (2006). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16330147/>.
- [140] **Pramstaller, P. P., Falk, M., Schoenhuber, R., Poewe, W.** „Validation of a mail questionnaire for parkinsonism in two languages (German and Italian)“. *Journal of neurology* 246.2 (1999), S. 79–86.
- [141] **Agachan, F., Chen, T., Pfeifer, J., Reissman, P., Wexner, S. D.** „A constipation scoring system to simplify evaluation and management of constipated patients“. *Diseases of the colon and rectum* 39.6 (1996), S. 681–685.
- [142] **Walt J, Rowe M, Stern K.** „Evaluating the functional impact of dry eye: the Ocular Surface Disease Index.“ *Drug Inf J* 31:b5 (1997).
- [143] **Beck AT, Steer RA, Ball R, Ranieri W.** „Comparison of Beck Depression Inventories -IA and -II in psychiatric outpatients.“ *J Pers Assess* 67 (1996), S. 588–597.
- [144] **Crook, T. H., Feher, E. P., Larrabee, G. J.** „Assessment of memory complaint in age-associated memory impairment: the MAC-Q“. *International psychogeriatrics* 4.4 (1992), S. 165–176.
- [145] **Pfeffer, R. I., Kurosaki, T. T., Harrah, C. H., Chance, J. M., Filos, S.** „Measurement of functional activities in older adults in the community“. *Journal of gerontology* 37.3 (1982), S. 323–329.
- [146] **Nomura, T., Inoue, Y., Kagimura, T., Uemura, Y., Nakashima, K.** „Utility of the REM sleep behavior disorder screening questionnaire (RBDSQ) in Parkinson’s disease patients“. *Sleep Medicine* 12.7 (2011), S. 711–713. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138994571100164X>.



- 
- [147] **Postuma, R. B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C. W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A. E., Halliday, G., Goetz, C. G., Gasser, T., Dubois, B., Chan, P., Bloem, B. R., Adler, C. H., Deuschl, G.** „MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson’s disease“. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 30.12 (2015), S. 1591–1601.
- [148] **Thompson, K.** *Deutsche Version der Bristol Stuhlformenskala*. URL: [https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Bristol\\_Stuhlformen\\_Skala.svg#filelinks](https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Bristol_Stuhlformen_Skala.svg#filelinks).
- [149] **Kühbach, K., Hülsemann, M., Herrmann, Y., Kravchenko, K., Kulawik, A., Linnartz, C., Peters, L., Wang, K., Willbold, J., Willbold, D., Bannach, O.** „Application of an Amyloid Beta Oligomer Standard in the sFIDA Assay“. *Frontiers in neuroscience* 10 (2016), S. 8.
- [150] **Peelaerts, W., Bousset, L., van der Perren, A., Moskalyuk, A., Pulizzi, R., Giugliano, M., van den Haute, C., Melki, R., Baekelandt, V.** „ $\alpha$ -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration“. *Nature* 522.7556 (2015), S. 340–344. URL: <https://www.nature.com/articles/nature14547.pdf>.
- [151] **El-Agnaf, O. M. A., Salem, S. A., Paleologou, K. E., Curran, M. D., Gibson, M. J., Court, J. A., Schlossmacher, M. G., Allsop, D.** „Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson’s disease“. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20.3 (2006), S. 419–425.
- [152] **Hamm-Alvarez, S. F., Janga, S. R., Edman, M. C., Feigenbaum, D., Freire, D., Mack, W. J., Okamoto, C. T., Lew, M. F.** „Levels of oligomeric  $\alpha$ -Synuclein in reflex tears distinguish Parkinson’s disease patients from healthy controls“. *Biomarkers in medicine* 13.17 (2019), S. 1447–1457.
- [153] **Encyclopedia Britannica, 13 Sep. 2022**, Hrsg. *Britannica, The Editors of Encyclopaedia*. „feces“. 2022. URL: <https://www.britannica.com/science/feces>.
- [154] *Chemical composition and formation of human feces—problems and solutions of large mergers demographics in developing countries*. 2012. URL: <http://ehr.cset.jsums.edu/10cd/oralpdf/oral%2039.pdf>.
- [155] **Rose, C., Parker, A., Jefferson, B., Cartmell, E.** „The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology“. *Critical reviews in environmental science and technology* 45.17 (2015), S. 1827–1879.
- [156] **Yang, L., Zhou, Y., Zhu, S., Huang, T., Wu, L., Yan, X.** „Detection and quantification of bacterial autofluorescence at the single-cell level by a laboratory-built high-sensitivity flow cytometer“. *Analytical chemistry* 84.3 (2012), S. 1526–1532.
-

- [157] **Inoue, Y., Izawa, K., Kiryu, S., Tojo, A., Ohtomo, K.** „Diet and Abdominal Autofluorescence Detected by in Vivo Fluorescence Imaging of Living Mice“. *Molecular Imaging* 7.1 (2008), S. 7290.2008.0003.
- [158] **Buschmann, C.** „Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves“. *Photosynthesis research* 92.2 (2007), S. 261–271.
- [159] **Denu, L., Lubin, J.-B., Douglas, B., Tuluc, F., Silverman, M. A.** „Diet-induced microbial autofluorescence confounds flow cytometry of ex vivo isolated fecal microbes“. *European journal of immunology* 49.12 (2019), S. 2252–2254.
- [160] **Ding, Q., Han, W., Li, X., Jiang, Y., Zhao, C.** „New insights into the autofluorescence properties of cellulose/nanocellulose“. *Scientific reports* 10.1 (2020), S. 21387.
- [161] **Croce, A. C., Bottioli, G.** „Lipids: Evergreen autofluorescent biomarkers for the liver functional profiling“. *European journal of histochemistry : EJH* 61.2 (2017), S. 2808.
- [162] **Bell, R., Vendruscolo, M.** „Modulation of the Interactions Between  $\alpha$ -Synuclein and Lipid Membranes by Post-translational Modifications“. *Frontiers in neurology* 12 (2021), S. 661117.
- [163] **Galvagnion, C.** „The Role of Lipids Interacting with  $\alpha$ -Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson’s Disease“. *Journal of Parkinson’s disease* 7.3 (2017), S. 433–450.
- [164] **Gilmozzi, V., Gentile, G., Castelo Rueda, M. P., Hicks, A. A., Pramstaller, P. P., Zanon, A., Lévesque, M., Pichler, I.** „Interaction of Alpha-Synuclein With Lipids: Mitochondrial Cardiolipin as a Critical Player in the Pathogenesis of Parkinson’s Disease“. *Frontiers in neuroscience* 14 (2020), S. 578993.
- [165] **Bae, W., Yoon, T.-Y., Jeong, C.** „Direct evaluation of self-quenching behavior of fluorophores at high concentrations using an evanescent field“. *PloS one* 16.2 (2021), e0247326.
- [166] **Mayilo, S., Kloster, M. A., Wunderlich, M., Lutich, A., Klar, T. A., Nichtl, A., Kürzinger, K., Stefani, F. D., Feldmann, J.** „Long-range fluorescence quenching by gold nanoparticles in a sandwich immunoassay for cardiac troponin T“. *Nano letters* 9.12 (2009), S. 4558–4563.
- [167] **Ou, X.-Y., Guo, T., Song, L., Liang, H.-Y., Zhang, Q.-Z., Liao, J.-Q., Li, J.-Y., Li, J., Yang, H.-H.** „Autofluorescence-Free Immunoassay Using X-ray Scintillating Nanotags“. *Analytical chemistry* 90.11 (2018), S. 6992–6997.
- [168] **Charbonneau, D. M., Tajmir-Riahi, H.-A.** „Study on the interaction of cationic lipids with bovine serum albumin“. *The journal of physical chemistry. B* 114.2 (2010), S. 1148–1155.
- [169] **Altay, M. F., Kumar, S. T., Burtscher, J., Jagannath, S., Strand, C., Miki, Y., Parkkinen, L., Holton, J. L., Lashuel, H. A.** *Development and validation of an expanded antibody toolset that captures alpha-synuclein pathological diversity in Lewy body diseases.* 2022.

- 
- [170] **Landeck, N., Hall, H., Ardah, M. T., Majbour, N. K., El-Agnaf, O. M. A., Halliday, G., Kirik, D.** „A novel multiplex assay for simultaneous quantification of total and S129 phosphorylated human alpha-synuclein“. *Molecular neurodegeneration* 11.1 (2016), S. 61.
- [171] **Schönheyder, H., Andersen, P.** „Effects of bovine serum albumin on antibody determination by the enzyme-linked immunosorbent assay“. *Journal of immunological methods* 72.1 (1984), S. 251–259.
- [172] **Antalis, T. M., Shea-Donohue, T., Vogel, S. N., Sears, C., Fasano, A.** „Mechanisms of disease: protease functions in intestinal mucosal pathobiology“. *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology* 4.7 (2007), S. 393–402.
- [173] **Carroll, I. M., Ringel-Kulka, T., Ferrier, L., Wu, M. C., Siddle, J. P., Bueno, L., Ringel, Y.** „Fecal protease activity is associated with compositional alterations in the intestinal microbiota“. *PloS one* 8.10 (2013), e78017.
- [174] **Bousset, L., Pieri, L., Ruiz-Arlandis, G., Gath, J., Jensen, P. H., Habenstein, B., Madiona, K., Olieric, V., Böckmann, A., Meier, B. H., Melki, R.** „Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains“. *Nature communications* 4 (2013), S. 2575.
- [175] **Almandoz-Gil, L., Lindström, V., Sigvardson, J., Kahle, P. J., Lannfelt, L., Ingelsson, M., Bergström, J.** „Mapping of Surface-Exposed Epitopes of In Vitro and In Vivo Aggregated Species of Alpha-Synuclein“. *Cellular and molecular neurobiology* 37.7 (2017), S. 1217–1226.
- [176] **Levine, D. J., Stöhr, J., Falese, L. E., Ollesch, J., Wille, H., Prusiner, S. B., Long, J. R.** „Mechanism of Scrapie Prion Precipitation with Phosphotungstate Anions“. *ACS Chemical Biology* 10.5 (2015), S. 1269–1277.
- [177] **Woerman, A. L., Stöhr, J., Aoyagi, A., Rampersaud, R., Krejciova, Z., Watts, J. C., Ohyama, T., Patel, S., Widjaja, K., Oehler, A., Sanders, D. W., Diamond, M. I., Seeley, W. W., Middleton, L. T., Gentleman, S. M., Mordes, D. A., Südhof, T. C., Giles, K., Prusiner, S. B.** „Propagation of prions causing synucleinopathies in cultured cells“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112.35 (2015), E4949–58.
- [178] **Zhang, L., Song, J., Cavigliolo, G., Ishida, B. Y., Zhang, S., Kane, J. P., Weisgraber, K. H., Oda, M. N., Rye, K.-A., Pownall, H. J., Ren, G.** „Morphology and structure of lipoproteins revealed by an optimized negative-staining protocol of electron microscopy“. *Journal of lipid research* 52.1 (2011), S. 175–184.
- [179] **KRÖGER, F. A.** „Fluorescence of Tungstates and Molybdates“. *Nature* 159.4046 (1947), S. 674–675.
-

- [180] **Rossi, M., Candelise, N., Baiardi, S., Capellari, S., Giannini, G., Orrù, C. D., Antelmi, E., Mammana, A., Hughson, A. G., Calandra-Buonaura, G., Ladogana, A., Plazzi, G., Cortelli, P., Caughey, B., Parchi, P.** „Ultrasensitive RT-QulC assay with high sensitivity and specificity for Lewy body-associated synucleinopathies“. *Acta Neuropathologica* 140.1 (2020), S. 49–62.
- [181] **Compta, Y., Valente, T., Saura, J., Segura, B., Iranzo, Á., Serradell, M., Junqué, C., Tolosa, E., Valldeoriola, F., Muñoz, E., Santamaria, J., Cámara, A., Fernández, M., Fortea, J., Buongiorno, M., Molinuevo, J. L., Bargalló, N., Martí, M. J.** „Correlates of cerebrospinal fluid levels of oligomeric- and total- $\alpha$ -synuclein in premotor, motor and dementia stages of Parkinson’s disease“. *Journal of neurology* 262.2 (2015), S. 294–306.
- [182] **Iranzo, A., Fairfoul, G., Ayudhaya, A. C. N., Serradell, M., Gelpi, E., Vilaseca, I., Sanchez-Valle, R., Gaig, C., Santamaria, J., Tolosa, E., Riha, R. L., Green, A. J. E.** „Detection of  $\alpha$ -synuclein in CSF by RT-QulC in patients with isolated rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a longitudinal observational study“. *The Lancet Neurology* 20.3 (2021), S. 203–212.
- [183] **Hall, S., Surova, Y., Öhrfelt, A., Blennow, K., Zetterberg, H., Hansson, O.** „Longitudinal Measurements of Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Parkinson’s Disease“. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 31.6 (2016), S. 898–905.
- [184] **Majbour, N. K., Vaikath, N. N., Eusebi, P., Chiasserini, D., Ardah, M., Varghese, S., Haque, M. E., Tokuda, T., Auinger, P., Calabresi, P., Parnetti, L., El-Agnaf, O. M. A.** „Longitudinal changes in CSF alpha-synuclein species reflect Parkinson’s disease progression“. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 31.10 (2016), S. 1535–1542.
- [185] **Horsager, J., Andersen, K. B., Knudsen, K., Skjærbæk, C., Fedorova, T. D., Okkels, N., Schaeffer, E., Bonkat, S. K., Geday, J., Otto, M., Sommerauer, M., Danielsen, E. H., Bech, E., Kraft, J., Munk, O. L., Hansen, S. D., Pavese, N., Göder, R., Brooks, D. J., Berg, D., Borghammer, P.** „Brain-first versus body-first Parkinson’s disease: a multimodal imaging case-control study“. *Brain : a journal of neurology* 143.10 (2020), S. 3077–3088.
- [186] **Berg, D., Borghammer, P., Fereshtehnejad, S.-M., Heinzel, S., Horsager, J., Schaeffer, E., Postuma, R. B.** „Prodromal Parkinson disease subtypes - key to understanding heterogeneity“. *Nature reviews. Neurology* 17.6 (2021), S. 349–361.
- [187] **Mattsson, N., Zetterberg, H., Hansson, O., Andreasen, N., Parnetti, L., Jonsson, M., Herukka, S.-K., van der Flier, W. M., Blankenstein, M. A., Ewers, M., Rich, K., Kaiser, E., Verbeek, M., Tsolaki, M., Mulugeta, E., Rosén, E., Aarsland, D., Visser, P. J., Schröder, J., Marcusson, J., Leon, M. de, Hampel, H., Scheltens, P., Pirttilä, T., Wallin, A., Jönhagen, M. E., Minthon, L., Winblad, B., Blennow, K.** „CSF biomarkers

- and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment". *JAMA* 302.4 (2009), S. 385–393.
- [188] **Doppler, K., Jentschke, H.-M., Schulmeyer, L., Vadasz, D., Janzen, A., Luster, M., Höffken, H., Mayer, G., Brumberg, J., Booij, J., Musacchio, T., Klebe, S., Sittig-Wiegand, E., Volkmann, J., Sommer, C., Oertel, W. H.** „Dermal phospho-alpha-synuclein deposits confirm REM sleep behaviour disorder as prodromal Parkinson's disease". *Acta Neuropathologica* 133.4 (2017), S. 535–545.
- [189] **Doppler, K., Antelmi, E., Kuzkina, A., Donadio, V., Incensi, A., Plazzi, G., Pizza, F., Marelli, S., Ferini-Strambi, L., Tinazzi, M., Mayer, G., Sittig, E., Booij, J., Sedghi, A., Oertel, W. H., Volkmann, J., Sommer, C., Janzen, A., Liguori, R.** „Consistent skin  $\alpha$ -synuclein positivity in REM sleep behavior disorder - A two center two-to-four-year follow-up study". *Parkinsonism & Related Disorders* 86 (2021), S. 108–113.
- [190] **Stefani, A., Iranzo, A., Holzkecht, E., Perra, D., Bongianni, M., Gaig, C., Heim, B., Serradell, M., Sacchetto, L., Garrido, A., Capaldi, S., Sánchez-Gómez, A., Cecchini, M. P., Mariotto, S., Ferrari, S., Fiorini, M., Schmutzhard, J., Cocchiara, P., Vilaseca, I., Brozzetti, L., Monaco, S., Jose Marti, M., Seppi, K., Tolosa, E., Santamaria, J., Högl, B., Poewe, W., Zanusso, G.** „Alpha-synuclein seeds in olfactory mucosa of patients with isolated REM sleep behaviour disorder". *Brain : a journal of neurology* 144.4 (2021), S. 1118–1126.
- [191] **Espinosa-Oliva, A. M., Ruiz, R., Soto, M. S., Boza-Serrano, A., Rodriguez-Perez, A. I., Roca-Ceballos, M. A., García-Revilla, J., Santiago, M., Serres, S., Economopoulos, V., Carvajal, A. E., Vázquez-Carretero, M. D., García-Miranda, P., Klementieva, O., Oliva-Martín, M. J., Deierborg, T., Rivas, E., Sibson, N. R., Labandeira-García, J. L., Machado, A., Peral, M. J., Herrera, A. J., Venero, J. L., Pablos, R. M. de.** *INFLAMMATORY BOWEL DISEASE INDUCES  $\alpha$ -SYNUCLEIN AGGREGATION IN GUT AND BRAIN.* 2022.
- [192] **Sampson, T. R., Challis, C., Jain, N., Moiseyenko, A., Ladinsky, M. S., Shastri, G. G., Thron, T., Needham, B. D., Horvath, I., Debelius, J. W., Janssen, S., Knight, R., Wittung-Stafshede, P., Gradinaru, V., Chapman, M., Mazmanian, S. K.** „A gut bacterial amyloid promotes  $\alpha$ -synuclein aggregation and motor impairment in mice". *eLife* 9 (2020).
- [193] **Bartels, T., Choi, J. G., Selkoe, D. J.** „ $\alpha$ -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation". *Nature* 477.7362 (2011), S. 107–110.
- [194] **Fauvet, B., Mbefo, M. K., Fares, M.-B., Desobry, C., Michael, S., Ardah, M. T., Tsika, E., Coune, P., Prudent, M., Lion, N., Eliezer, D., Moore, D. J., Schneider, B., Aebischer, P., El-Agnaf, O. M., Masliah, E., Lashuel, H. A.** „ $\alpha$ -Synuclein in central nervous

- system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer“. *Journal of Biological Chemistry* 287.19 (2012), S. 15345–15364.
- [195] **Burré, J., Vivona, S., Diao, J., Sharma, M., Brunger, A. T., Südhof, T. C.** „Properties of native brain  $\alpha$ -synuclein“. *Nature* 498.7453 (2013), E4–E6.
- [196] **Fayyad, M., Erskine, D., Majbour, N. K., Vaikath, N. N., Ghanem, S. S., Sudhakaran, I. P., Abdesselem, H., Lamprokostopoulou, A., Vekrellis, K., Morris, C. M., Attems, J., El-Agnaf, O. M. A.** „Investigating the presence of doubly phosphorylated  $\alpha$ -synuclein at tyrosine 125 and serine 129 in idiopathic Lewy body diseases“. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 30.4 (2020), S. 831–843.
- [197] **Winner, B., Jappelli, R., Maji, S. K., Desplats, P. A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., Tzitzilonis, C., Soragni, A., Jessberger, S., Mira, H., Consiglio, A., Pham, E., Masliah, E., Gage, F. H., Riek, R.** „In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108.10 (2011), S. 4194–4199.
- [198] **Conway, K. A., Lee, S. J., Rochet, J. C., Ding, T. T., Williamson, R. E., Lansbury, P. T.** „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“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97.2 (2000), S. 571–576.
- [199] **Lionnet, A., Wade, M. A., Corbillé, A.-G., Prigent, A., Paillusson, S., Tasselli, M., Gonzales, J., Durieu, E., Rolli-Derkinderen, M., Coron, E., Duchalais, E., Neunlist, M., Perkinson, M. S., Hanger, D. P., Noble, W., Derkinderen, P.** „Characterisation of tau in the human and rodent enteric nervous system under physiological conditions and in tauopathy“. *Acta neuropathologica communications* 6.1 (2018), S. 65.
- [200] **Wenyan Kang, Wei Chen, Qiong Yang, Lina Zhang, Linyuan Zhang, Xiaoying Wang, Fangyi Dong, Yang Zhao, Shuai Chen, Thomas J. Quinn, Jing Zhang, Shengdi Chen, Jun Liu.** „Salivary total  $\alpha$ -synuclein, oligomeric  $\alpha$ -synuclein and SNCA variants in Parkinson’s disease patients“. *Scientific Reports* 6.1 (2016), S. 1–8. URL: <https://www.nature.com/articles/srep28143>.