sFIDA-basierte Detektion peripherer Aβ-, Tau- und α-Synuclein-Aggregate bei neurodegenerativen Erkrankungen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Pelin Özdüzenciler
aus Viersen

Köln, August 2026

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

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

Berichterstatter:

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

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2026

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig 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.

Köln, 04.08.2026

Pelin Özdüzenciler

Danksagung

Eine Dissertation entsteht selten allein am Schreibtisch, sie wächst aus unzähligen Gesprächen, aus geteilter Mühe und aus dem Rückhalt vieler Menschen, die diesen Weg mit mir gegangen sind. Ihnen allen möchte ich an dieser Stelle danken.

Prof. Dr. Gültekin Tamgüney danke ich dafür, dass er mir die Tür zu seiner Arbeitsgruppe geöffnet und mir während der gesamten Promotionszeit mit wissenschaftlichem Rat und Vertrauen zur Seite gestanden hat.

Prof. Dr. Dieter Willbold gilt mein Dank für die Aufnahme in sein Institut am Forschungszentrum in Jülich und an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und dafür, dass er den wissenschaftlichen Rahmen geschaffen hat, in dem diese Arbeit überhaupt wachsen konnte.

Ein ganz besonderer Dank gehört Dr. Marlene Pils. Sie hat mir nicht nur unzählige fachliche Handgriffe beigebracht, sondern mir auch in den leiseren, schwierigeren Momenten dieser Promotion Halt gegeben, fachlich wie menschlich eine unschätzbare Begleiterin.

Dem gesamten Institut für Strukturbiochemie am Forschungszentrum Jülich danke ich für die vielen helfenden Hände im Labor, in der Verwaltung und im technischen Bereich, ohne die diese Arbeit nie ihre Form gefunden hätte.

Aus Kolleginnen und Kollegen sind im Laufe dieser Jahre gute Freunde geworden; Dr. Sara Reithofer, Dr. Mohammadamin Mastalipour, Dr. Verena Pesch, Yannick Busch, Olivia Rudtke, Ian Gering und Dounia Rastani haben mich durch Tiefen begleitet, aber auch jeden Erfolg mit mir gefeiert, als wäre es ihr eigener. Friederike Neuheuser und Veronika Kaczmarek danke ich von Herzen dafür, dass sie mich durch die intensive Phase des Schreibens getragen haben.

Meiner Partnerin Sandra Glasmacher verdanke ich mehr, als Worte fassen können, ihre Liebe, ihre Geduld und einen Glauben an mich, der manchmal größer war als mein eigener. Unser Fellnase Tilda darf hier nicht fehlen. Sie war der Grund, dass ich ab und zu mal frische Luft schnappen und durchatmen konnte.

Meiner Familie gilt mein tiefster Dank. Ihr wart das stille Fundament unter all dem, mit Geduld, mit Vertrauen, mit einer Liebe, die keine Fragen stellt. Wenn ich gestolpert bin, habt ihr mich aufgefangen; wenn ich gefeiert habe, wart ihr da trotz tausender Kilometer Entfernung. Diese Arbeit trägt meinen Namen, aber sie trägt auch ein Stück von euch allen.

Herzlichen Dank an euch alle!

Vorwort

In der vorliegenden Arbeit wurden einzelne Abbildungen mit der wissenschaftlichen Bild- und Illustrationssoftware BioRender.com unter Einhaltung von akademischen Lizenzbedingungen erstellt bzw. modifiziert. Betroffene Abbildungen sind durch den Vermerk „erstellt mit BioRender.com“ kenntlich gemacht.

Aus Gründen des ungestörten Leseflusses wird in der vorliegenden Arbeit die Sprachform des generischen Maskulinums angewandt. Es wird an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die verwendete Schreibweise in allen Fällen geschlechtsunabhängig zu verstehen ist.

Kurzzusammenfassung

Das Spektrum neurodegenerativer Erkrankungen umfasst eine Vielzahl pathologischer Entitäten, allen voran die Alzheimer-Erkrankung (AD) sowie die Parkinson-Erkrankung (PD). Diese sind primär durch die Akkumulation pathologischer, amyloidogener Proteine wie Amyloid-β (Aβ), Tau und α-Synuclein (α-Syn) sowie die daraus resultierende progressive neuronale Degeneration charakterisiert. Angesichts der weltweit ansteigenden Prävalenz stellen das Fehlen krankheitsmodifizierender Therapien sowie die oft unzureichende Sensitivität und Spezifität aktueller diagnostischer Verfahren eine der größten medizinischen Herausforderungen dar.

Ein zentraler Ansatzpunkt für die Frühdiagnostik sind lösliche Oligomere, die als neurotoxische Intermediate im Aggregationsprozess zu unlöslichen Proteinablagerungen fungieren. Da diese Oligomere bereits in Frühstadien dieser Erkrankungen auftreten, bietet ihre Quantifizierung eine Möglichkeit für eine frühzeitige Diagnose. Dies stellt eine essenzielle Voraussetzung für den Einsatz künftiger krankheitsmodifizierender Therapien dar, um frühzeitig in den Krankheitsverlauf zu intervenieren, die Lebensqualität der Betroffenen zu verbessern und möglicherweise ihre gesunde Lebensspanne zu verlängern. Daher ist eine Diagnostik mithilfe hochsensitiver und spezifischer molekularbiologischer Assays erforderlich, die eine frühzeitige Detektion anhand minimal- oder nicht-invasiv gewonnener Proben ermöglichen.

Die sFIDA-Technologie (*surface-based fluorescence intensity distribution analysis*) ermöglicht den hochsensitiven, quantitativen Nachweis löslicher Oligomere in verschiedenen Körperflüssigkeiten bis in den subfemtomolaren Bereich. Ein wesentlicher Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation lag auf der Validierung der sFIDA-Technologie anhand nicht-invasiv gewonnener klinischer Stuhlproben zur Quantifizierung fäkaler Aβ- und Tau-Oligomere. In Kooperation mit der Klinik für Neurologie der Uniklinik Köln wurden hierzu Proben von 101 Patienten sowie 105 Kontrollprobanden analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass diese neurotoxischen Aggregate in nicht-invasiv gewonnenen Proben nicht nur zuverlässig detektiert werden können, sondern auch eine signifikante Differenzierung zwischen kognitiv beeinträchtigten Personen und kognitiv gesunden Personen ermöglichen. Darüber hinaus unterstützten diese Ergebnisse das zunehmend an Bedeutung gewinnende Konzept, dass die für die AD charakteristische Proteinopathie nicht ausschließlich im zentralen Nervensystem, sondern auch in der Peripherie nachweisbar ist. Zusammenfassend validiert diese Arbeit die sFIDA-basierte Stuhlanalyse als einen vielversprechenden, nicht-invasiven Ansatz für die AD-Diagnostik und eröffnet zugleich neue Einblicke in die periphere Pathophysiologie der Erkrankung.

Ergänzend zur AD-Diagnostik wurden im Rahmen dieser Arbeit zudem die periphere Biomarker-Analytik bei der PD mittels sFIDA-Technologie sowie die Entwicklung neuer Impfstoffkandidaten adressiert. Mittels sFIDA-Analytik konnte nachgewiesen werden, dass

Patienten mit iRBD (*Idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder*), einem relevanten prodromalen Symptom der PD, bereits erhöhte Konzentrationen von α-Syn-Aggregaten in Stuhl- sowie Urinproben aufweisen. Diese Befunde unterstützen die *Gut-first*-Hypothese und unterstreichen die Eignung peripherer Biomarker für die Diagnostik prodromaler Erkrankungsphasen. Zudem wurde das wissenschaftliche Spektrum dieser Dissertation durch Projekte zur chemisch-synthetischen Entwicklung biotinylierter Sonden zur Aggregatdetektion erweitert. Parallel dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit innovative therapeutische Ansätze evaluiert, wobei aktive Immunisierungsstrategien gegen PD signifikante protektive Effekte zeigten.

Der Nachweis krankheitsassoziierter Proteinaggregate bildet die gemeinsame Grundlage aller in dieser Dissertation zusammengeführten wissenschaftlichen Arbeiten. Zusammenfassend betont die vorliegende Arbeit die Notwendigkeit einer präzisen molekularen Frühdiagnostik mithilfe nicht-invasiv gewonnener Proben sowie deren Kombination mit gezielten krankheitsmodifizierenden Therapien zur Bekämpfung neurodegenerativer Erkrankungen.

Abstract

The spectrum of neurodegenerative diseases encompasses a wide range of pathological entities, foremost among them Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD). These diseases are primarily characterized by the accumulation of pathological, amyloidogenic proteins such as amyloid-β (Aβ), tau, and α-synuclein (α-Syn), as well as the resulting progressive neuronal degeneration. Given their increasing prevalence worldwide, the lack of disease-modifying therapies and the often insufficient sensitivity and specificity of current diagnostic methods represent one of the greatest medical challenges.

A central focus for early diagnosis is soluble oligomers, which act as neurotoxic intermediates in the aggregation process leading to insoluble protein deposits. Since these oligomers are already present at early stages of these diseases, their quantification offers the potential for early diagnosis. This represents an essential prerequisite for the application of future disease-modifying therapies, enabling early intervention in the disease course and thereby substantially improving the quality of life and life expectancy of affected individuals. Therefore, diagnostic approaches based on highly sensitive and specific molecular biological assays are required to enable early detection using minimally or non-invasive obtained samples.

The sFIDA technology (*surface-based fluorescence intensity distribution analysis*) enables the highly sensitive, quantitative detection of soluble oligomers in various body fluids down to the subfemtomolar range. A major focus of the present dissertation was the validation of the sFIDA technology using non-invasively obtained clinical stool samples for the quantification of fecal Aβ and tau oligomers. In cooperation with the Department of Neurology at the University Hospital of Cologne, samples from 101 patients and 105 control subjects were analyzed. The results demonstrated that these neurotoxic aggregates are not only detectable in non-invasively obtained stool samples but also enable significant differentiation between cognitively impaired individuals and cognitively healthy individuals. Furthermore, these findings support the increasingly relevant concept that the proteinopathy characteristic of Alzheimer's disease is detectable not exclusively in the central nervous system, but also in the periphery.

In summary, this work validates sFIDA-based stool analysis as a promising, non-invasive approach for AD diagnostic, providing new insights into the peripheral pathophysiology of the disease.

In addition to AD diagnostics, this work also addressed peripheral biomarker analysis in PD using sFIDA technology, as well as the development of novel vaccine candidates. Using sFIDA analysis, it was demonstrated that patients with iRBD (*idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder*), a relevant prodromal symptom of PD, already exhibit elevated concentrations of α-syn aggregates in stool and urine samples. These findings support the "*gut-first*" hypothesis and underline the suitability of peripheral biomarkers for diagnosis of prodromal disease stages. Moreover, the scientific scope of this dissertation was expanded by

projects involving the chemical-synthetic development of biotinylated probes for aggregate detection. In parallel, innovative therapeutic approaches were evaluated within the scope of this work, with active immunization strategies against PD showing significant protective effects. The detection of disease-associated protein aggregates forms the common basis for all the scientific studies compiled in this dissertation. In summary, this work emphasizes the need for precise molecular early diagnosis using non-invasively obtained samples, combined with targeted disease-modifying therapies against neurodegenerative diseases.

Abkürzungsverzeichnis

Aβ	Amyloid Beta
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym (*angiotensin-converting enzyme*)
AD	Alzheimer-Erkrankung, Alzheimer-Demenz
ADE	Aβ-abbauende Enzyme
ADL	Aktivitäten des täglichen Lebens (*Activities of Daily Living*)
AICD	Intrazelluläre APP-Domäne (engl.: *APP intracellular domain*)
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Vorläuferprotein
ARIA	Amyloidbedingte Bildgebungsanamolie (*amyloid-related imaging abnormalities*)
α-Syn	Alpha Synuclein
BC	Pufferkontrolle
BDII-II	Beck-Depressions-Inventars II
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
CBD	Kortikobasale Degeneration
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CSF	Liquor (*cerebrospinal fluid*)
CTF	C-terminales Fragment
DAT	Dopamintransporter
DLB	Demenz mit Lewy-Körperchen (*dementia with Lewy-Bodies*)
DM	Dichroitischer Spiegel (*dichroic mirror*)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*)
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionsassay (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
ENS	Enterisches Nervensystem
FAQ	Fragebogen zu Alltagsaktivitäten (*Functional Activities Questionnaire*)
FDG	^{18}F-Fluordesoxyglukose
F-Dopa	Fluorodopa
FTD	Frontotemporale Demenz
GBD	*Global Burden of Diseases, Injuries and Risk Factors Study*
GCI	Gliale zytoplasmatische Inklusionen (*glial cytoplasmic inclusions*)
GI	Gastrointestinaltrakt
HC	Gesunde Kontrollprobanden (*healthy controls*)
IDE	Insulin-abbauendes Enzym (*insulin-degrading enzyme*)

iRBD	idiopathische REM-Schlafverhaltensstörung (*idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder*)
LB	Lewy-Körper (*Lewy bodies*)
LLOQ	Untere Quantifizierungsgrenze (*lower limit of quantification*)
LOD	Detektionsgrenze (*limit of detection*)
MAC-Q	Gedächtnis-Beurteilungs-Fragebogen (*Memory Assessment Clinic Questionnaire)*
MAO	Monoaminoxidase
MAPT	Mikrotubuli-assoziertes Protein Tau (*microtubule-associated protein tau*)
MCI	Leichte kognitive Beeinträchtigung (*mild cognitive impairment*)
MDS	*Movement Disorder Society*
MRT	Magnetresonanztomographie
MSA	Multiple Systematrophie
NAC	Nicht-Amyloid-β-Komponente (*non-amyloid-β-component*)
NFT	Neurofibrilläre Bündel (*neurofibrillary tangles*)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PD	Parkinson-Erkrankung
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PHF	Gepaarte helikale Filamente (*paired helical filaments*)
PiB	Pittsburgh Compound B
PMCA	*Protein Misfolding Cyclic Amplification*
PMT	Photomultiplier (*photomultiplier tube*)
PSG	Polysomnographie
PSP	Progressive supranukleäre Blickparese
RBDSQ	RBD-Screening-Fragebogen (*REM sleep behavior disorder screening questionnaire*)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*)
RT-QuIC	*Real-Time Quaking Induced Conversion*
SCD	Subjektive kognitive Beeinträchtigung (*subjective cognitive decline*)
SF	Gerade Filamente (*straight filaments)*
sFIDA	*Surface based fluorescence intensity distribution analysis*
SiNaP	Silikananopartikel
SNpc	*Substantia nigra pars compacta*
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (*single-photon emission computed tomography*)

TIRF	Totalreflektionsfluoreszenzmikroskopie (*total internal reflection fluorescence microscopy*)
TNT	*Tunneling Nanotubes*
ZNS	Zentrales Nervensystem

Liste der Publikationen

- **Özdüzenciler P.**, Müller L., Kara E., Weber M.C., Pils M., Rehn F., Bannach O., Fink G.R., Willbold D., Barbe M.T., Onur O.A., Tamgüney G. Detection of fecal Aβ and tau aggregates reveals a peripheral dimension of Alzheimer's disease proteinopathy. Eingereicht bei Alzheimer's Research & Therapy (Juli 2026)
- Pils, M., Dybala, A., Schaffrath, A., Rehn, F., Kutzsche, J., Blömeke, L., Tusche, M., **Özdüzenciler, P.**, Bujnicki, T., Kraemer-Schulien, V., Gramespacher, H., Schmieschek, M. H. T., Barbe, M. T., Onur, O. A., Fink, G. R., Tamgüney, G., Bannach, O., & Willbold, D. (2024). Elevated Aβ aggregates in feces from Alzheimer's disease patients: A proof-of-concept study. Alzheimer's Research & Therapy, 16(1), 223. https://doi.org/10.1186/s13195-024-01597-3
- Schaffrath, A., Schleyken, S., Seger, A., Jergas, H., **Özdüzenciler, P.**, Pils, M., Blömeke, L., Cousin, A., Willbold, J., Bujnicki, T., Bannach, O., Fink, G. R., Willbold, D., Sommerauer, M., Barbe, M. T., & Tamgüney, G. (2023). Patients with isolated REM-sleep behavior disorder have elevated levels of alpha-synuclein aggregates in stool. Npj Parkinson's Disease, 9(1), 14. https://doi.org/10.1038/s41531-023-00458-4
- Müller, L., **Özdüzenciler, P.,** Schedlich-Teufer, C., Seger, A., Jergas, H., Fink, G. R., Willbold, D., Sommerauer, M., Barbe, M. T., & Tamgüney, G. (2025). Elevated α-Synuclein Aggregate Levels in the Urine of Patients with Isolated REM Sleep Behavior Disorder and Parkinson's Disease. Annals of Neurology, 98(1), 147–151. https://doi.org/10.1002/ana.27250
- Müller, L., **Özdüzenciler, P.**, Schedlich-Teufer, C., Seger, A., Jergas, H., Fink, G. R., Willbold, D., Sommerauer, M., Barbe, M. T., & Tamgüney, G. (2025). Reply to "Urinary α-Synuclein for Parkinson's Detection: Key Limitations and Future Directions". Annals of Neurology, 98(3), 639–640. https://doi.org/10.1002/ana.70023
- Weber, T. M., **Özdüzenciler, P.**, Tamgüney, G., & Pietruszka, J. (2024). Utilization of a Branched Late-Stage Clickable Biotinylated Chassis on the Example of a Pittsburgh B Analogue. Organic Letters, 26(31), 6771–6775. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.4c02527
- Pesch, V., Flores-Fernandez, J. M., Reithofer, S., Ma, L., **Özdüzenciler, P.**, Busch, Y., Sriraman, A., Wang, Y., Amidian, S., Kroepel, C. V. M., Müller, L., Lien, Y., Rudtke, O., Frieg, B., Schröder, G. F., Wille, H., & Tamgüney, G. (2024). Vaccination with structurally adapted fungal protein fibrils induces immunity to Parkinson's disease. Brain, 147(5), 1644–1652. https://doi.org/10.1093/brain/awae061

- Ma, L., Reithofer, S., Pesch, V., Flores-Fernandez, J.M., Sriraman, A., Duckering, C., Amidian, S., **Özdüzenciler, P.**, Müller, L., Werner, K., Wille, H., Tamgüney, G. (2026). Vaccines mimicking conformational epitopes on α-synuclein fibrils provide immunity to Parkinson's disease. Brain, awag010. https://doi.org/10.1093/brain/awag010

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung ..... **i**
Danksagung ..... **ii**
Vorwort ..... **iii**
Kurzzusammenfassung ..... **iv**
Abstract ..... **vi**
Abkürzungsverzeichnis ..... **viii**
Liste der Publikationen ..... **xi**
Inhaltsverzeichnis ..... **xiii**
1 Einleitung **1**
1.1 Neurodegenerative Erkrankungen 1
1.1.1 Alzheimer-Erkrankung 2
1.1.2 Parkinson-Erkrankung 5
1.2 Proteinfehlfaltung in neurodegenerativen Erkrankungen 8
1.2.1 Amyloid β 11
1.2.2 Tau 14
1.2.3 α-Synuclein 17
1.3 Behandlungsstrategien für neurodegenerative Erkrankungen 20
1.3.1 Therapieansätze für AD 20
1.3.2 Therapieansätze für PD 21
1.4 Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen 23
1.4.1 AD Diagnose und Klassifizierung 23
1.4.2 PD Diagnose und Klassifizierung 29
1.5 Oberflächenbasierte Fluoreszenz-Intensität-Verteilungs-Analyse (sFIDA) 32
1.5.1 Molekularbiologische Grundlagen des sFIDA-Assays 33
1.5.2 Kalibration des sFIDA-Assays 35
1.5.3 Interne Totalreflektionsfluoreszenzmikroskope und konfokale Fluoreszenzmikroskopie 36
1.5.4 Datenaufnahme und -analyse 39
1.6 Zielsetzung 40
2 Manuskripte **41**
2.1 Quantifizierung fäkaler Aβ- und Tau-Aggregate in humanen Stuhlproben 41
2.2 Quantifizierung fäkaler Aβ-Aggregate in humanen Stuhlproben 66

2.3 Quantifizierung fäkaler α-Syn-Aggregate in humanen Stuhlproben 82
2.4 Urinbasierte Quantifizierung von α-Syn-Aggregaten 94
2.5 Urinbasierte Quantifizierung von α-Syn-Aggregaten: Zukunftsperspektiven und Limitationen 100
2.6 Entwicklung eines innovativen Moleküls zur Detektion amyloidogener Proteinaggregate 103
2.7 Krankheitsmodifizierende PD-Immunisierung mittels HET-s-basierter Kombinationsvakzinierung 109
2.8 Krankheitsmodifizierende PD-Immunisierung durch monovalente HET-s-basierte Vakzination 119

3 Zusammenfassung und Diskussion 133

3.1 Methodische Innovationen zur Detektion peripherer Aβ- und Tau-Aggregate in humanen Stuhlproben zur Diagnostik der AD 133
3.1.1 Stuhl als diagnostische Matrix 133
3.1.2 Machbarkeitsstudie 135
3.1.3 Klinische Validierung 136
3.1.4 Analytische Leistungsbewertung des entwickelten Assays 138
3.2 Methodische Innovationen zur Detektion peripherer α-Syn-Aggregate in humanen Stuhl- und Urinproben zur Diagnostik von Synucleinopathien 143
3.2.1 Analytische Leistungsbewertung des entwickelten Assays 143
3.2.2 Periphere α-Syn-Oligomere aus Stuhl und Urin als mögliche Biomarker für frühe Synucleinopathien 144
3.3 Entwicklung eines innovativen Moleküls zur Detektion pathologischer amyloidogener Proteinaggregate 146
3.4 Innovative therapeutische Ansätze zur gezielten Modulation proteinopathischer Prozesse bei PD 148

4 Ausblick 152
Abbildungsverzeichnis xvi
Tabellenverzeichnis xvi
Literaturverzeichnis xvii
5 Anhang xxxiii

5.1 Anhang- Ergänzende Daten zum Kapitel 2.1 xxxiii
5.2 Anhang- Theoretische Anzahl an Analyten pro Bild liii
5.3 Anhang- Ergänzende Daten zu Kapitel 2.6 liv
5.4 Anhang- Ergänzende Daten zu Kapitel 2.7 lv

5.5 Anhang- Druckgenehmigung für Kapitel 2.2 lvi
5.6 Anhang- Druckgenehmigung für Kapitel 2.3 lviii
5.7 Anhang- Druckgenehmigung für Kapitel 2.4 lx
5.8 Anhang- Druckgenehmigung für Kapitel 2.5 lxi
5.9 Anhang- Druckgenehmigung für Kapitel 2.6 lxiii
5.10 Anhang- Druckgenehmigung für Kapitel 2.7 lxiii
5.11 Anhang- Druckgenehmigung für Kapitel 2.8 lxiv

1 Einleitung

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen zeichnen sich durch einen progressiven, irreversiblen Verlust neuronaler Funktionen aus. Beruht dieser Verlust auf Ablagerungen pathologischer Proteinaggregate, beispielsweise im zentralen Nervensystem (ZNS), wird dieser pathologische Zustand als Proteinopathie bezeichnet. Je nach betroffener Hirnregion und involvierten Proteinen treten neurodegenerative Erkrankungen in verschiedenen klinischen Erscheinungsformen auf [1, 2]. Zu den am weitesten verbreiteten neurodegenerativen Erkrankungen zählen Amyloidosen, Tauopathien und Synucleinopathien [3]. Die Klassifizierung neurodegenerativer Erkrankungen kann nach mehreren komplementären Kriterien erfolgen. Hierbei werden klinische Erscheinungsmerkmale berücksichtigt, beispielsweise Demenzformen wie die Alzheimer-Demenz, Parkinsonismus wie bei Morbus Parkinson und Motoneuronerkrankungen wie die amyotrophe Lateralsklerose. Zudem werden die anatomische und zelluläre Verteilung der Neurodegeneration sowie die zugrunde liegenden molekularen Veränderungen anhand der dominierenden Proteinopathie einbezogen [1, 4].

Neurodegenerative Erkrankungen treten überwiegend im höheren Lebensalter auf, weshalb der globale Anstieg ihrer Prävalenz auf die demografisch bedingte Alterung der Bevölkerung zurückzuführen ist [5]. Laut Angaben der *Global Burden of Diseases, Injuries and Risk Factors Study* (GBD) zählen neurodegenerative Erkrankungen sogar zu den Erkrankungen mit der weltweit am schnellsten steigenden Prävalenz [6]. Diese Erkrankungen beeinträchtigen sowohl die kognitiven als auch die motorischen Fähigkeiten der Betroffenen und führen damit zu einem schrittweisen Verlust der Autonomie sowie zu einer verminderten Lebensqualität [7]. Die wachsende Prävalenz dieser Erkrankungen sowie fehlende wirksame Behandlungsmöglichkeiten bringen erhebliche Herausforderungen für die erkrankten Individuen, deren Angehörige sowie das Gesundheitssystem mit sich [8].

Die in dieser Arbeit thematisierten Erkrankungen AD und PD werden im Folgenden aus verschiedenen Perspektiven betrachtet, darunter die historische Entdeckung der Erkrankungen, der klinische Verlauf und das Erscheinungsbild, die Pathophysiologie sowie Therapie- und Diagnostikansätze. Außerdem werden die an der jeweiligen Erkrankung beteiligten pathologischen Proteine näher erläutert und die sogenannte oberflächenbasierte Fluoreszenzintensitätsverteilungsanalyse sFIDA, welche zum quantitativen Nachweis dieser Proteine genutzt werden kann, vorgestellt.

1.1.1 Alzheimer-Erkrankung

Die AD ist die am besten erforschte neurodegenerative Erkrankung und zugleich mit 60-70% aller Fälle die häufigste Form der Demenz [5, 9, 10]. Mit steigender Lebenserwartung und fortschreitender demografischer Alterung wird die weltweite Prävalenz der AD voraussichtlich weiter steigen und damit zu einer erheblichen Zunahme der gesundheitlichen, sozialen und ökonomischen Belastungen beitragen [11]. Nach Schätzungen von *Alzheimer´s Disease International* lebten im Jahr 2019 weltweit mehr als 50 Millionen Menschen mit Alzheimer-Demenz sowie verschiedenen Formen von Demenz-Erkrankungen. Bis zum Jahr 2050 wird erwartet, dass diese Zahl auf 152 Millionen ansteigt [12, 13].

Die AD ist eine komplexe, irreversible neurodegenerative Erkrankung, die sich über Jahre hinweg im Zusammenspiel krankheitsbezogener pathologischer Veränderungen und klinischer Ausprägungen entwickelt. Ein charakteristisches neuropathologisches Merkmal der AD ist die extrazelluläre Ablagerung von Amyloid-β (Aβ) in Form von unlöslichen Plaques. Ein weiteres zentrales Kennzeichen ist die intrazelluläre Akkumulation von hyperphosphoryliertem Tau-Protein (p-Tau), welche zur Entstehung der neurofibrillären Bündel (engl.: *neurofibrillary tangles,* NFT) führt. Diese histopathologischen Merkmale der AD stehen im Zusammenhang mit der Progression der neuronalen Dysfunktion und Neurodegeneration [13].

Aufgrund des progressiven Krankheitsverlaufs und der zunehmenden Pflegebedürftigkeit im Verlauf der Erkrankung verursacht die AD nicht nur erhebliche persönliche Einschränkungen für die Betroffenen, sondern bringt auch für die Angehörigen und Pflegekräfte starke Belastungen mit sich und erzeugt eine erhebliche wirtschaftliche Last [14, 15].

1.1.1.1 Klinisches Erscheinungsbild und Pathophysiologie der AD

Die AD ist eine chronisch-progrediente, multifaktorielle neurodegenerative Erkrankung, die sich klinisch primär durch Gedächtnisstörungen, Veränderungen im Verhalten, fortschreitende motorische Einschränkungen und eine zunehmende Beeinträchtigung der kognitiven Funktionen manifestiert [1, 13]. Ein besonders auffälliges klinisches Symptom in den Frühstadien der Erkrankung ist die Beeinträchtigung des episodischen Gedächtnisses, insbesondere für kürzlich erlebte Ereignisse. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer erheblichen Einschränkung der Alltagskompetenzen sowie der sozialen Teilhabe der Betroffenen [16].

Die AD wurde im Jahr 1907 von dem deutschen Neurologen Alois Alzheimer erstmals beschrieben. Alzheimer präsentierte den klinischen und neuropathologischen Befund der sechsundfünfzigjährigen Patientin Auguste Deter, die an einer früh einsetzenden Demenz mit ausgeprägter fortschreitender kognitiver Störung, neurologischen Symptomen, Halluzinationen, Wahnvorstellungen sowie einer psychischen und sozialen Beeinträchtigung litt. In seinem postmortalen Bericht über die histopathologischen Veränderungen im Gehirn

seiner Patientin schilderte Alzheimer auffällige Ablagerungen, die später als Aβ-Plaques und Tau-assoziierte Neurofibrillen bekannt wurden. Diese Erstbeschreibung legte den Grundstein für die moderne Erforschung der Erkrankung. Im Jahr 1910 prägte Emil Kraepelin den Namen „Alzheimer-Erkrankung“ in seinem psychiatrischen Lehrbuch und definierte die Erkrankung als seltene Form der Demenz [17]. In den folgenden Jahrzehnten erweiterten neuropathologische und biochemische Studien das Verständnis der AD. Die Identifizierung von Aβ als Hauptbestandteil der Plaques [18] und von p-Tau in den NFTs [19] legte wichtige zentrale Bausteine für moderne pathophysiologische Modelle der AD.

Die Aβ- und Tau-Proteinablagerungen breiten sich je nach Krankheitsstadium unterschiedlich in verschiedenen Gehirnarealen aus. Die Aβ-Ablagerung ist eines der wichtigsten und frühesten Ereignisse in der AD-Pathologie und zeigt ein charakteristisches, stufenweises Ausbreitungsmuster. Die Aβ-Pathologie beginnt in neokortikalen Hirnarealen und dehnt sich im Laufe der Erkrankung auf limbische Strukturen sowie schließlich auf den Hirnstamm und das Kleinhirn aus. Das Ausmaß der Aβ-Ablagerung korreliert jedoch nur schwach oder nicht konsistent mit dem kognitiven Leistungsniveau der Betroffenen. Im Gegensatz zur Aβ-Pathologie entwickelt sich die Tau-Pathologie zeitlich verzögert und nimmt ihren Ursprung im entorhinalen Kortex, breitet sich anschließend auf den Hippocampus und weitere limbische Hirnareale aus und erfasst in späteren Stadien der Erkrankung großflächig neokortikale Areale. Die Intensität der Tau-Ablagerung steht dabei in engem Zusammenhang mit der klinischen Symptomatik und dem kognitiven Verfall [20–22].

Die Aβ-Plaques und die p-Tau-Ablagerungen sind die charakteristischen histopathologischen Veränderungen eines von AD betroffenen Gehirns. Jedoch deutet eine zunehmende Anzahl an Studien darauf hin, dass nicht diese fibrillären Aggregate bzw. Ablagerungen, sondern primär deren lösliche Vorstufen, die Aβ- und Tau-Oligomere, die neurotoxischen Wirkungen der AD-Pathologie auslösen. Es wurde gezeigt, dass die löslichen Aβ-Oligomere und nicht die Plaques mit hoher Affinität an Postsynapsen binden und dadurch deren Struktur und Funktion verändern. Dies beeinträchtigt die synaptische Plastizität der Betroffenen, wodurch sowohl das Erinnerungsvermögen als auch die Verarbeitung neuer Informationen eingeschränkt werden. Außerdem sind Aβ-Oligomere eng mit neuroinflammatorischen Prozessen im AD-Gehirn assoziiert. Diese Oligomere können sich in Gliazellen, insbesondere in reaktiven Astrozyten, anreichern und dadurch eine inflammatorische Aktivierung, die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren sowie funktionelle Veränderungen der Astrozyten verursachen. Darüber hinaus führt die Aktivierung der Mikrogliazellen durch Aβ-Oligomere zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species*, ROS) und stimuliert die Amyloidbildung, während der Abbau von Aβ gehemmt und dadurch eine Neurotoxizität verursacht wird. Die räumlich-zeitliche Beziehung zwischen der Aβ- und Tau-Pathophysiologie bei einem von AD betroffenen Gehirn ist sowohl auf molekularer als auch auf

histopathologischer Ebene von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der AD-Pathogenese und den pathophysiologischen Krankheitsverlauf. Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass die Tau-Pathologie stärker mit den kognitiven Beeinträchtigungen der AD korreliert als die Aβ-Pathologie. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Fehlfaltung und die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins durch die Aβ-Pathologie induziert werden. Dadurch werden die Tau-assoziierte Neurotoxizität, die Akkumulation von Tau-Oligomeren sowie deren progressive Ausbreitung initiiert, was zur kortikalen Neurodegeneration beiträgt. Sowohl Aβ- als auch Tau-Pathologien lösen eine Kaskade pathologischer Veränderungen in Neuronen, Mikroglia und Astrozyten aus, die zu neuronalen Funktionsstörungen, synaptischem Verlust, einer Aktivierung des Immunsystems, Neuroinflammation, einer Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke und Neurodegeneration führen [15, 21–26]. Diese pathologischen Veränderungen führen im Verlauf der Erkrankung zu einer progressiven neuronalen Dysfunktion und zum Untergang der Neuronen. Infolgedessen kommt es zu einem fortschreitenden Verlust kognitiver Funktionen, insbesondere des Gedächtnisses, sowie zu Veränderungen der Persönlichkeit, der Denkweise und des Verhaltens. Im Endstadium resultiert die AD in einem letalen Ausgang infolge eines weitreichenden Funktionsverlusts des Gehirns. Nach der Diagnosestellung beträgt die durchschnittliche Überlebenszeit der AD-Betroffenen 7 bis 10 Jahre, da die Diagnose erst in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung gestellt werden kann [27].

Seit der Entdeckung von Aβ- und Tau-Fibrillen konnten zahlreiche Studien wesentliche, detaillierte Erkenntnisse über ihre Struktur, Aggregationsmechanismen und Pathophysiologie liefern. Dennoch bleibt die Ursache der AD bis heute nicht gänzlich geklärt, weshalb kurative Therapieansätze weiterhin ausstehen [28]. Die AD ist eine multifaktorielle Erkrankung, die durch das Zusammenspiel genetischer Veranlagung und Umweltfaktoren im Laufe des Lebens bestimmt wird. Zu den häufigsten Risikofaktoren zählen ein höheres Lebensalter, genetische Prädispositionen wie das Trägersein des APOE-ε4 (Apolipoprotein E, Allel ε4) Allels sowie ein niedriger Bildungsgrad, kardiovaskuläre und metabolische Vorerkrankungen, Depressionen und traumatische Hirnverletzungen [29]. Zunehmend rücken auch periphere Risikofaktoren in den Fokus, insbesondere Veränderungen in der Zusammensetzung der Darmmikrobiota, die ebenfalls eine bedeutende Rolle in der AD-Pathologie spielen. Dysbiotische Veränderungen gehen mit einer erhöhten Permeabilität der Darmbarriere einher, wodurch bakterielle Metabolite wie bakterielle Amyloide, die eine Kreuzkeimung (engl.: *cross-seeding*) verursachen, und proinflammatorische Faktoren in den systemischen Kreislauf gelangen können. Dies führt zu einer Immunaktivierung sowie zu chronischen systemischen Entzündungsprozessen und resultiert in der Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke. Dieser Prozess verursacht eine Neuroinflammation im ZNS und führt zu neuronalem Schaden sowie zum Fortschreiten der AD-Pathologie [30].

Etwa 95% der AD-Fälle sind sporadisch und treten erst später, meist ab dem 65. Lebensjahr, auf. Die seltene, früheinsetzende und autosomal-dominant vererbte familiäre AD tritt in etwa 5% der Fälle auf und manifestiert sich vor dem 65. Lebensjahr [15, 27]. Bei der familiären AD begünstigen krankheitsassoziierte Mutationen eine verstärkte oder veränderte Bildung von Aβ-Peptiden und damit deren Ablagerung. Bei der sporadischen AD hingegen wird vor allem eine reduzierte Aβ-Clearance als zentrale Ursache der pathologischen Akkumulation angesehen [31].

Die präklinische Aβ-Pathologie beginnt bereits 10 bis 20 Jahre vor dem Auftreten der ersten kognitiven Beeinträchtigungen, wobei die Akkumulationsrate um den Zeitpunkt des Auftretens klinischer Symptome herum abnimmt. Im Gegensatz dazu setzt die Tau-Pathologie deutlich näher am Auftreten kognitiver Defizite ein und schreitet anschließend parallel zum Krankheitsverlauf kontinuierlich fort [32]. Die Erkenntnis, dass die der AD zugrunde liegenden neuropathologischen Veränderungen bereits Jahrzehnte vor dem Auftreten der klinischen Symptome einsetzen, führte zu einer grundlegenden Veränderung der neuropathologischen Klassifikation der AD. In den vergangenen Jahren hat sich ein Paradigmenwechsel hin zu einer biologisch fundierten Definition der Erkrankung entwickelt. Dementsprechend erfordert die Diagnose der AD heute den Nachweis spezifischer Biomarker, insbesondere der Ablagerung von extrazellulären Aβ-Plaques sowie der intrazellulären Bildung von Tau-assoziierten NFTs. Das Ziel dieser biologischen Konzeptualisierung besteht darin, die AD als einen klar definierten, krankheitsspezifischen pathologischen Prozess zu charakterisieren, dessen Ausprägungen bereits in präklinischen oder prodromalen Stadien der Erkrankung zuverlässig detektierbar sind. Diese genannten pathologischen Marker gelten als die zentralen histopathologischen Merkmale der Erkrankung und führen zu fortschreitenden neurodegenerativen Veränderungen, einschließlich des Verlusts von Nervenzellen und strukturellen Schädigungen des Hirngewebes [33].

1.1.2 Parkinson-Erkrankung

Synucleinopathien sind neurodegenerative Erkrankungen, die durch die intraneuronale Aggregation des präsynaptischen Proteins α-Syn und die daraus resultierende Degeneration von Nervenzellen gekennzeichnet sind [3]. Die PD zählt zu den Synucleinopathien und ist nach der AD die am häufigsten vorkommende neurodegenerative Erkrankung [34]. Aktuelle Daten der GBD-Studien verdeutlichen eine rapide zunehmende globale Prävalenz der PD. Prognosen zufolge wird die Zahl der an PD erkrankten Individuen bis zum Jahr 2050 auf etwa 25,2 Millionen ansteigen. Dies entspricht einem Anstieg von 112% im Vergleich zu 2021 [35]. Der weltweit drastisch zunehmende Inzidenztrend der komplexen und multifaktoriell bedingten PD wird maßgeblich durch die demografische Alterung der Bevölkerung, die steigende Lebenserwartung, zunehmende Umweltbelastungen infolge der Industrialisierung,

metabolische Erkrankungen sowie genetische Prädispositionen begünstigt [35, 36]. Obwohl zahlreiche bekannte Risikofaktoren mit der PD-Pathogenese in Verbindung gebracht werden, konnte bislang kein eindeutig ursächlicher Auslöser identifiziert werden [37].

1.1.2.1 Klinisches Erscheinungsbild und Pathophysiologie der PD

PD wurde im Jahr 1817 von James Parkinson erstmals in seinem Werk *„An essay of the shaking palsy“* beschrieben. Darin stellte er typische Symptome der PD dar, darunter Muskelzittern in Ruhe (Tremor), Muskelsteifigkeit (Rigor), verlangsamte Bewegungen (Bradykinesie) und die Instabilität der Körperhaltung [38]. Friedrich H. Lewy postulierte im Jahr 1912 im Rahmen postmortaler Untersuchungen an PD erkrankten Individuen erstmals das Vorhandensein rundlicher intrazellulärer Proteinablagerungen, die später nach ihm benannten Lewy-Körper (engl.: *Lewy bodies*, LB), welche im Hirnstamm mit der PD-Pathophysiologie in Zusammenhang stehen. Einige Jahre später berichtete Constantin Trétiakoff erstmals, dass bei PD-Patienten neuropathologische Veränderungen in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) zu beobachten sind, wobei ein Rückgang dopaminerger Neuronen mit dem Vorhandensein von LB einhergeht [39, 40]. Die Proteinzusammensetzung der LBs blieb bis zum Jahr 1997 unbekannt. In diesem Jahr wiesen Maria Grazia Spillantini und ihre Kollegen nach, dass LBs zum Großteil aus fehlgefalteten α-Syn-Proteinen bestehen [41].

Im Jahr 2003 konstruierten Heiko Braak und seine Kollegen aufbauend auf dieser grundlegenden Entdeckung ein allgemein anerkanntes *Staging*-System zur Beurteilung der PD-Pathologie. Dabei analysierten Braak und seine Kollegen das regionale neuropathologische Fortschreiten von α-Syn-immunreaktiven Strukturen sowie die Neurodegeneration in verschiedenen Gehirnregionen [42]. Dieses *Staging*-System teilt den Krankheitsverlauf in insgesamt sechs Stadien ein. In den ersten zwei Stadien breitet sich die neuropathologische Veränderung vor allem in der Medulla oblongata, im Rückenmarksfortsatz und im Riechkolben aus. In diesen Stadien zeigen Betroffene bereits prodromale Symptome der Erkrankung wie eine idiopathische REM-Schlafverhaltensstörungen (engl.: *idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder*, iRBD), gastrointestinale Dysfunktionen oder eine verminderte Geruchswahrnehmung. Im dritten und vierten Stadium breitet sich die Pathophysiologie auf die Substantia nigra, mesenzephale Kerngebiete sowie das basale Vorderhirn aus. Die daraus resultierenden nigrostriatalen Dysfunktionen manifestieren sich in diesen Krankheitsphasen durch die für die PD typischen motorischen Symptome wie Tremor, Bradykinesie und Rigor. Erst durch das Auftreten dieser motorischen Dysfunktionen ist eine klinische Diagnosestellung möglich. In den fortgeschrittenen Krankheitsstadien fünf und sechs der PD, in denen die neuropathologischen Veränderungen die nervenzellreiche Großhirnrinde erreichen, entwickeln die Betroffenen zunehmend kognitive Dysfunktionen wie Gedächtnis- und Denkstörungen bis hin zur Demenz sowie Halluzinationen. Mit der Ausbreitung der

intrazellulären Ablagerungen vom Hirnstamm zum Großhirn nehmen sowohl das Ausmaß der Läsionen in den betroffenen Hirnarealen als auch die klinischen Manifestationen der PD zu [42–45]. Neben den motorischen Symptomen treten bei der PD in allen Krankheitsstadien häufig auch verschiedene prämotorische bzw. prodromale Symptome auf. Dazu werden unter anderem die iRBD, autonome, olfaktorische und gastrointestinale Dysfunktionen sowie Angststörungen, Depressionen und chronische Schmerzen gezählt. Diese prodromalen Symptome beeinträchtigen die Lebensqualität der Betroffenen erheblich. Insbesondere spielen dabei gastrointestinale Motilitätsstörungen eine Rolle, die Beschwerden wie Dysphagie (Schluckstörungen), eine verzögerte Magenentleerung und chronische Verstopfung beinhalten [46, 47].

Neben dem Verlust der dopaminergen Neuronen ist die weit verbreitete Bildung von LBs, die größtenteils aus pathologisch fehlgefaltetem und aggregiertem α-Syn sowie zahlreichen weiteren Proteinen und Organellen bestehen, ein weiteres zentrales neuropathologisches Merkmal der PD. Charakteristisch ist die intraneuronale Ablagerung pathologisch gefalteter α-Syn-Aggregate, die sowohl unlöslich sind als auch zytotoxisch wirken. Die α-Syn-Aggregate treten jedoch nicht ausschließlich bei der PD auf. Auch bei der multiplen Systematrophie (MSA) finden sich pathologische α-Syn-Ablagerungen, die sich in ihrer zellulären Lokalisation und morphologischen Form deutlich von denen der PD unterscheiden. Typischerweise befinden sich diese Ablagerungen bei der MSA vor allem in Oligodendrozyten in Form von glialen zytoplasmatischen Inklusionen (engl.: *glial cytoplasmic inclusions*, GCIs) und nicht primär in Neuronen wie bei der PD. Neben der PD und der MSA zählt auch die Demenz mit Lewy-Körperchen (engl.: *dementia with Lewy-Bodies*, DLB) zu den Synucleinopathien. Wie bei der PD finden sich bei der DLB intraneuronale LBs. Im Gegensatz zur PD sind diese bei der DLB jedoch frühzeitig im Kortex ausgeprägt. Aufgrund dessen ist der klinische Verlauf der DLB überwiegend durch kognitive Beeinträchtigungen und Demenzsymptome geprägt [48]. Obwohl weder der Verlust dopaminerger Neuronen im Gehirn noch die Ablagerung von α-Syn-Aggregaten isoliert spezifisch für die PD ist, sind beide neuropathologischen Merkmale in Kombination für eine definitive Diagnose der PD essenziell [49, 50].

Die PD wird als eine Multisystemerkrankung beschrieben, die sowohl das ZNS als auch periphere Strukturen wie das enterische Nervensystem (ENS) und den Gastrointestinaltrakt (GI) betrifft und zudem mit immunologischen Veränderungen sowie entzündlichen Prozessen assoziiert ist [37, 51]. Etwa 80-90% der PD-Fälle gelten ohne familiäre Vorgeschichte als sporadische PD, während nur etwa 10-20% der PD-Fälle als genetisch bedingt eingestuft werden und auf Mutationen oder erbliche Faktoren zurückzuführen sind [52]. Die große interindividuelle Variabilität im klinischen Verlauf und die variable Ausbreitung der PD-Pathologie erschweren eine eindeutige Identifikation des initial betroffenen Organs. Diese Heterogenität führte zur Formulierung verschiedener Ursprungshypothesen, die sich vor allem

darin unterscheiden, ob die PD-Pathologie primär im zentralen Nervensystem (*Brain-first*) oder im peripheren Nervensystem (*Gut-first*) beginnt [53]. Die *Brain-First*-Hypothese postuliert, dass die initiale Proteinopathie im Gehirn beginnt und sich im Laufe der Erkrankung über den Hirnstamm in das periphere autonome Nervensystem ausbreitet. Im Gegensatz dazu nimmt die *Gut-First*-Hypothese an, dass die Pathologie primär im enterischen bzw. peripheren Nervensystem entsteht und über den Vagusnerv in das ZNS fortschreitet [53]. Die häufig in diesem Kontext eingeordnete Dual-Hit-Hypothese von Braak und Kollegen, die auf umfangreichen Autopsiestudien basiert, postuliert, dass ein bislang nicht identifizierter exogener Auslöser entweder nasal den Riechkolben betrifft oder oral in den Organismus gelangt, den GI erreicht und dort initial eine neuropathologische Veränderung induziert. Diese Veränderungen umfassen die Fehlfaltung und Aggregation von α-Syn im ENS. Gemäß dieser Hypothese breiten sich die entstehenden pathologischen α-Syn-Aggregate anschließend über axonale und transneuronale Transportmechanismen über den Vagusnerv in Richtung ZNS aus. Hierbei ist zunächst der dorsale motorische Nukleus des Vagus im Hirnstamm betroffen [53–56].

Diese Hypothese wurde durch verschiedene *in-vivo*-Tiermodellen bestätigt. So führte die Injektion unterschiedlicher α-Syn-Formen, darunter rekombinante Monomere, Oligomere, Fibrillen sowie PD-Gehirnlysat, in die Wand des Magendarmtrakts von Ratten zu einem retrograden axonalen Transport über den Vagusnerv bis in den Hirnstamm [57]. Darüber hinaus induzierte die Inokulation von α-Syn-Fibrillen in die Magenwand von Mäusen die Bildung phosphorylierter α-Syn-Aggregate mit LB-ähnlicher Morphologie, was durch eine Vagotomie verhindert werden konnte [58]. Zudem korrespondiert ein peripherer Krankheitsursprung mit der klinischen Beobachtung, dass nicht-motorische Symptome häufig bereits etwa zehn Jahre vor dem Beginn der typischen motorischen Beschwerden einsetzen. Dazu zählen unter anderem eine Obstipation, eine verzögerte Magenentleerung, vermehrter Speichelfluss, Schluckbeschwerden sowie Übelkeit [47].

1.2 Proteinfehlfaltung in neurodegenerativen Erkrankungen

Unter physiologischen Bedingungen werden fehlgefaltete Proteine durch zelluläre Kontrollmechanismen wie Chaperone, das Ubiquitin-Proteasom-System oder Autophagie-Wege identifiziert und entweder neugefaltet oder degradiert. Verschiedene Ursachen, darunter vererbte oder erworbene Mutationen, Überexpression, posttranslationale Modifikationen, ein beeinträchtigter enzymatischer Abbau, oxidativer Stress, Umweltfaktoren oder der Alterungsprozess, können diese zellulären Kontrollmechanismen stören, wodurch es zu einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine kommen kann. Diese Proteinfehlfaltungen führen bei neurodegenerativen Erkrankungen zu neuronalen Dysfunktionen und letztendlich zum Zelltod. Obwohl neurodegenerative Erkrankungen sich in ihren klinischen Verläufen und den jeweils

involvierten amyloidogenen Proteinen unterscheiden, weisen sie charakteristische gemeinsame Merkmale auf. Dazu zählen insbesondere die Fehlfaltung, Aggregation und Akkumulation spezifischer Proteine, die zu einem progressiven Verlust von Neuronen führen [9, 59, 60].

Amyloide sind unlösliche, hochgeordnete, fibrilläre Proteinaggregate, die durch charakteristische β-faltblattreiche Strukturen gekennzeichnet sind. Amyloide wie die Aβ- und Tau-Proteine bei der AD sowie α-Syn bei Synucleinopathien weisen bei neurodegenerativen Erkrankungen unabhängig von ihrer Primärsequenz, Struktur und ihren physiologischen Funktionen ähnliche pathologische Aggregationsmechanismen auf [9, 61]. Amyloidogenese, die Entstehung unlöslicher Amyloid-Aggregate, erfolgt über einen mehrstufigen Prozess (s. Abbildung 1). Die erste, geschwindigkeitsbestimmende Phase ist die langsame, thermodynamisch ungünstige Nukleationsphase (engl.: *nucleation phase*), in der sich nativ gefaltete oder partiell entfaltete Proteine zunächst zu Oligomeren zusammenlagern. Diese hochdynamischen, löslichen Oligomere, die primär für die neurotoxischen Wirkungen bei neurodegenerativen Erkrankungen verantwortlich sind, stellen die Vorstufen der fibrillären Strukturen dar und wirken als Keime (engl.: *seeds*) für die darauffolgenden Fibrillierungsprozesse. Die Oligomere stellen eine heterogene und schwer zu definierende Gruppe dar, die aus einer Vielzahl unterschiedlich großer und löslicher Polymerstrukturen besteht und je nach amyloidogenem Protein variiert. Obwohl eine solche Oligomerisierung in der Regel reversibel ist, können verschiedene Ursachen, wie oben beschrieben, die Stabilisierung und somit die Entstehung der unlöslichen Aggregate ermöglichen. Nach der Entstehung von nicht-keimungsfähigen (engl.: *Off-Pathway oligomers*) und keimungsfähigen Oligomeren (engl.: *On-Pathway oligomers*) beginnt eine exponentielle Elongationsphase, in der monomere Proteine durch vorgebildete, keimungsfähige Oligomere rekrutiert werden, wodurch ein schnelles Wachstum der Polymerstruktur stattfindet. Die Elongationsphase resultiert in großen, unlöslichen Strukturen wie Protofibrillen und Fibrillen. Wenn sich Monomere an den Enden der bereits gebildeten Fibrillen anlagern, nehmen sie eine charakteristische Cross-β-Konformation an, die der Konformation der Fibrillen entspricht und als ein Muster für die Umstrukturierung der Monomere fungiert. In dieser Konformation ordnen sich die einzelnen β-Stränge senkrecht zur langen Achse der Fibrillen an. Diese Stränge sind durch Wasserstoffbrückenbindungen in regelmäßigen Abständen verbunden und bilden gemeinsam β-Faltblätter. Mehrere β-Faltblätter können sich anschließend entlang der Fibrillenachse übereinander anordnen. Die Fibrillen sind zudem in der Lage, untereinander wechselzuwirken und zu größeren unlöslichen Aggregaten zu akkumulieren. Darüber hinaus können bereits vorhandene Fibrillen einen sekundären Nukleationsprozess starten. Hierbei können diese Fibrillen an ihrer Oberfläche die Entstehung neuer Oligomere begünstigen oder

durch die weitere Anlagerung von Monomeren elongieren, fragmentieren und dadurch neue keimungsfähige Oligomere generieren [59, 61–66].

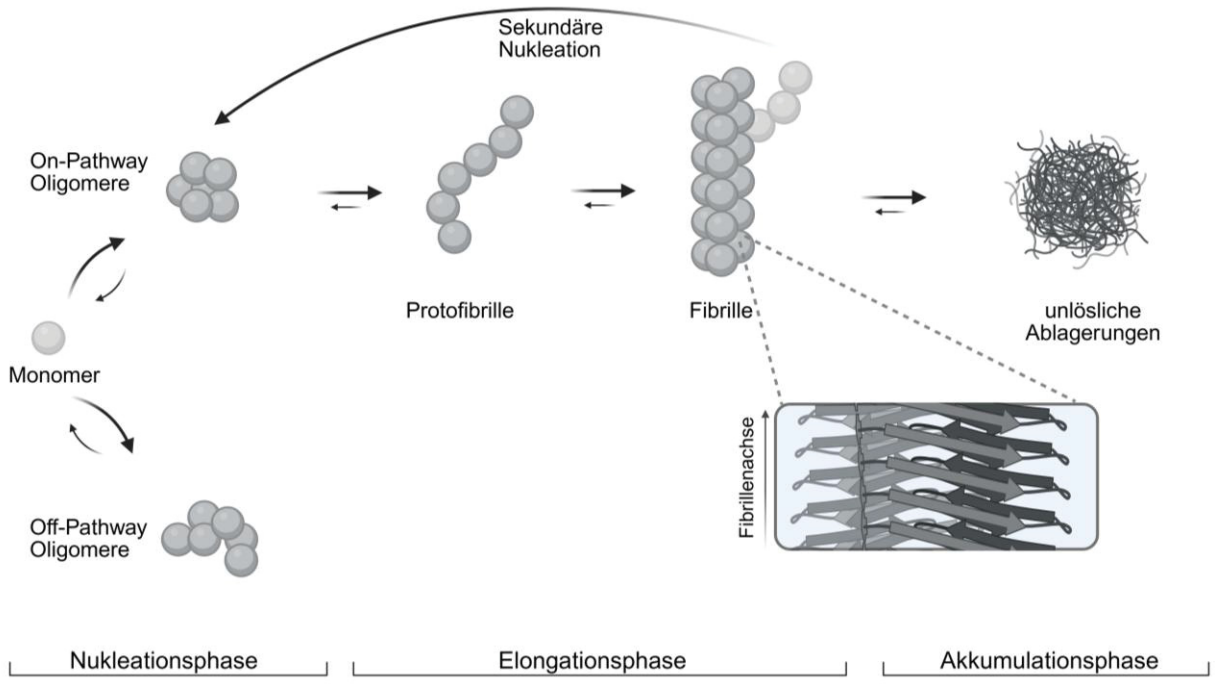


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aggregation amyloidogener Proteine
In der Nukleationsphase lagern sich nativ gefaltete Monomere zu keimungsfähigen (*On-Pathway*) oder nicht-keimungsfähigen (*Off-Pathway*)-Oligomeren zusammen. Die On-Pathway-Oligomere dienen als Keime für weitere Aggregationsprozesse, während Off-Pathway-Oligomere nicht in die Fibrillenbildung übergehen. In der anschließenden Elongationsphase wachsen durch die kontinuierliche keimabhängige Rekrutierung weiterer Monomere zunächst Protofibrillen und schließlich reife Amyloidfibrillen heran. Der vergrößerte Ausschnitt verdeutlicht die charakteristische Cross-β-Struktur, bei der sich die einzelnen β-Stränge (Pfeile) senkrecht zur vertikalen Fibrillenachse anordnen. In der Akkumulationsphase lagern sich bereits bestehende Oligomere, Protofibrillen und Fibrillen zu größeren, unlöslichen fibrillären Ablagerungen zusammen. Gleichzeitig können bestehende Fibrillen die weitere Aggregation sowohl durch sekundäre Nukleation, die oberflächenkatalysierte Neubildung oligomerer Keime, als auch durch Fragmentierung fördern. *Erstellt mit BioRender.com.*

Dieser Aggregationsmechanismus wurde erstmals für das der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) zugrundeliegenden Protein, das sogenannte Prion-Protein, nachgewiesen. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass die mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziierten amyloidogenen Proteine sich ebenfalls prionenähnlich aggregieren und ausbreiten. Hierbei können pathologische Oligomere sowie Fibrillen durch Exozytose oder durch Lyse der beschädigten Neuronen aus der Zelle freigesetzt und vom extrazellulären Raum durch Endozytose von benachbarten Neuronen aufgenommen werden. Darüber hinaus können die Oligomere durch direkten synaptischen Kontakt oder durch dünne Membrankanäle zwischen Zellen (engl.: *tunneling nanotubes,* TNT), die einen intrazellulären Transport ermöglichen, übertragen werden [44, 63].

1.2.1 Amyloid β

Aβ Peptide entstehen durch die proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins (engl.: *amyloid precursor protein*, APP). APP ist ein großes Transmembranprotein, das aus einer großen, N-terminalen, extrazellulären Domäne, einer hydrophoben Transmembrandomäne sowie einer kurzen, C-terminalen, zytoplasmatischen Domäne besteht. APP wird überwiegend von Neuronen des ZNS exprimiert und erfüllt unter physiologischen Bedingungen essentielle Funktionen, darunter die Synapsenbildung, die Aufrechterhaltung synaptischer Strukturen sowie Reparaturmechanismen des Nervensystems. APP kann über zwei alternative proteolytische Wege gespalten werden (s. Abbildung 2), die entweder über den amyloidogenen Pfad zur Entstehung amyloidogener Peptide führen oder nicht-amyloidogen verlaufen, sodass keine Aβ-Peptide gebildet werden [67].

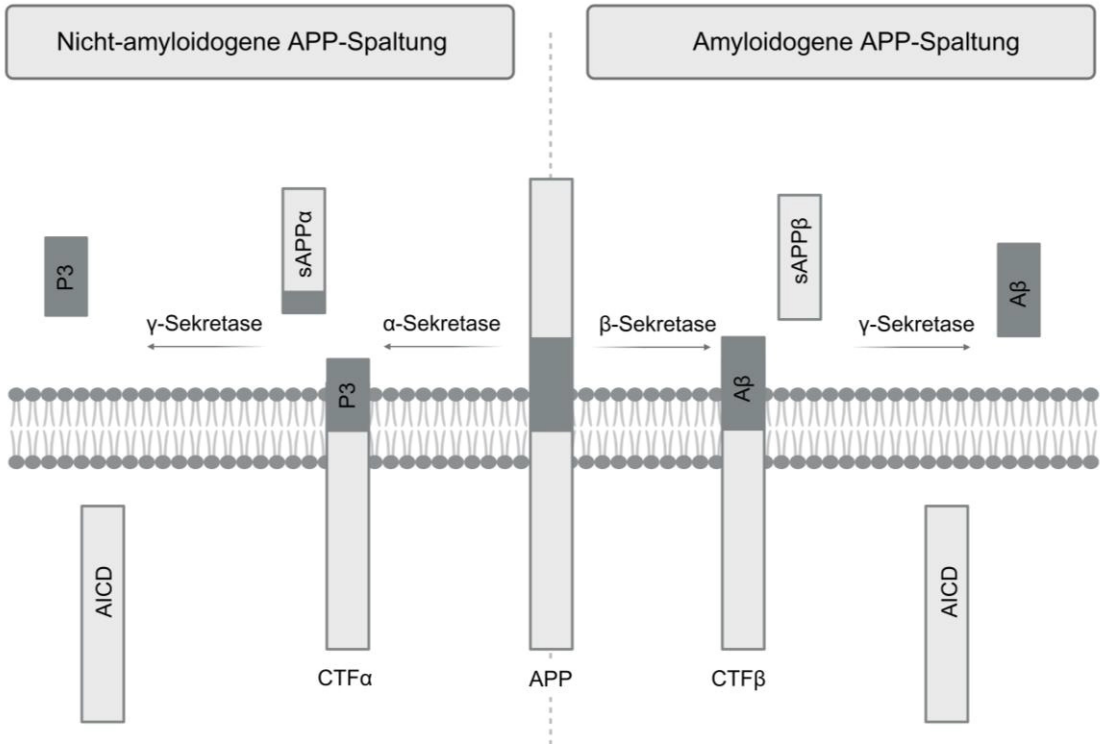


Abbildung 2: Schematische Darstellung der proteolytischen Spaltung von APP
Die proteolytische Prozessierung von APP erfolgt über zwei alternative Wege: die nicht-amyloidogene Spaltung und die amyloidogene Spaltung. Bei der nicht-amyloidogenen Spaltung wird APP zunächst durch die α-Sekretase innerhalb der Aβ-Sequenz gespalten, wodurch die Bildung des Aβ-Peptids verhindert wird. Dabei wird das lösliche Fragment sAPPα freigesetzt, während das C-terminale Fragment α (CTFα) in der Membran verbleibt. Das CTFα wird anschließend durch die γ-Sekretase weiterverarbeitet, wobei das extrazelluläre P3-Fragment sowie die intrazelluläre APP-Domäne (engl.: *APP intracellular domain*, AICD) entstehen. Im Gegensatz dazu wird APP bei der amyloidogenen Spaltung zunächst durch die β-Sekretase prozessiert, wodurch das lösliche Fragment sAPPβ und das membranständige C-terminale Fragment β (CTFβ) generiert werden. Die nachfolgende Spaltung von CTFβ durch die γ-Sekretase führt schließlich zur Freisetzung des Aβ-Peptids sowie der intrazellulären APP-Domäne AICD. Abbildung modifiziert nach Kent et al., 2020 [67]. *Erstellt mit BioRender.com.*

Bei der nicht-amyloidogenen Spaltung wird APP durch die α-Sekretase innerhalb der Aβ-Sequenz gespalten, wodurch die Bildung von Aβ-Peptiden verhindert wird. Dabei entstehen

das lösliche Fragment sAPPα und ein membrangebundenes Fragment aus 83 Aminosäuren (CTFα), das die Sequenz für das nicht-toxischen P3-Fragment enthält. Bei der amyloidogenen Spaltung wird APP hingegen durch die β-Sekretase an der extrazellulären Domäne gespalten, wodurch sAPPβ und ein 99 Aminosäuren langes, C-terminales Fragment (CTFβ) entstehen [67].

Die C-terminalen Fragmente (CFTα und CTFβ) aus beiden Spaltungsprozessen werden anschließend durch die γ-Sekretase innerhalb der Transmembrandomäne weiterverarbeitet. Wenn die initiale Spaltung von APP durch die α-Sekretase erfolgt, resultiert die nachfolgende Spaltung durch die γ-Sekretase in der Freisetzung des nicht-toxischen P3-Peptids. Dahingegen führt eine initiale Spaltung durch die β-Sekretase zur Bildung toxischer Aβ-Peptide unterschiedlicher Länge (s. Abbildung 2). Grund hierfür ist das Fehlen einer spezifischen Schnittstelle der γ-Sekretase, was zu Variationen am C-terminalen Ende der Aβ-Peptide führt. Somit entstehen die Aβ-Isoformen unterschiedlicher Länge mit unterschiedlichem Aggregationspotenzial, insbesondere die AD-assoziierten Isoformen $A\beta_{40}$ und $A\beta_{42}$ [27, 31, 68].

Die Aβ-Peptide, die durch die proteolytische Spaltung von APP gebildet werden, übernehmen essenzielle kognitive und synaptische Funktionen. Dazu zählen die Regulation der Neurotransmission, die Stimulierung der hippocampalen Neurogenese, die Förderung der Langzeitpotenzierung als zellulärer Mechanismus von Lernen und Gedächtnis, die Modulation der synaptischen Plastizität sowie die Aufrechterhaltung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke. Außerdem besitzen Aβ-Peptide antimikrobielle und tumorhemmende Eigenschaften und fördern die Angiogenese [27, 67].

Die häufigsten Isoformen der Aβ-Peptide sind die intrinsisch ungeordneten Peptide $A\beta_{40}$ und $A\beta_{42}$. $A\beta_{40}$ besteht aus 40 Aminosäuren und weist eine Molekülmasse von ca. 4,3 kDa auf, während $A\beta_{42}$ aus 42 Aminosäuren besteht und eine Molekülmasse von ca. 4,5 kDa besitzt. $A\beta_{40}$ macht den Großteil der Aβ-Population im Gehirn aus, wobei $A\beta_{42}$ nur einen kleinen Anteil von ca. 5-10% besitzt. Trotz seines geringeren Anteils neigt $A\beta_{42}$ aufgrund der zwei zusätzlichen hydrophoben Aminosäuren Isoleucin und Alanin am C-terminalen Ende stärker zur Aggregation. Diese Eigenschaft begünstigt die Entstehung von löslichen Oligomeren, die als besonders neurotoxisch gelten [27].

Unter physiologischen Bedingungen im Gehirn werden diese Aβ-Peptide kontinuierlich produziert und abgebaut, wodurch ein homöostatisches Gleichgewicht entsteht. Dahingegen wird dieses Gleichgewicht unter pathophysiologischen Bedingungen beeinträchtigt, was zur Fehlfaltung der $A\beta_{42}$- und $A\beta_{40}$-Peptide sowie zu dessen Aggregation und Akkumulation in Plaques führt, was ein zentrales Merkmal der AD-Pathologie darstellt [31]. Insbesondere lösliche Aβ-Oligomere können mit verschiedenen zellulären Rezeptoren interagieren und dadurch pathologische Signalwege aktivieren. Dies umfasst unter anderem die Bildung

reaktiver Sauerstoffspezies, die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins sowie die Auslösung neuroinflammatorischer Reaktionen [68]. Im gesunden Gehirn liegt das Produktionsverhältnis von $A\beta_{42}$ zu $A\beta_{40}$ bei etwa 1:9. Eine Erhöhung des $A\beta_{42}/A\beta_{40}$-Verhältnisses verschiebt das Gleichgewicht zugunsten der neurotoxischen $A\beta_{42}$-Peptide, wodurch pathologische Ablagerungen begünstigt werden [69]. Obwohl die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen für die Verteilung der Aβ-Peptide bislang nicht vollständig geklärt sind, kommt $A\beta_{42}$ überwiegend im Gehirn vor, während $A\beta_{40}$ die in der Peripherie dominierende Spezies ist [31].

Die Aggregation der Aβ-Peptide beruht auf einem Zusammenspiel aus vermehrter Expression, veränderter Proteolyse und posttranslationalen Modifikationen, wodurch die Aggregationsneigung gesteigert werden kann. Beispielsweise weisen am N-Terminus verkürzte Aβ-Peptide mit N-terminalem Pyroglutamat eine verringerte Löslichkeit, eine erhöhte Aggregationsneigung sowie eine erhöhte Zytotoxizität auf. Zudem fördern die Phosphorylierung der Serin-Reste an Position 8 und Position 26 sowie die Acetylierung des Lysin-Rests an Position 16 ebenfalls die Aggregation von Aβ. Im Gegensatz dazu reduziert die Nitrierung des Tyrosin-Rests an Position 10 die Aggregation von Aβ [9, 70]. Darüber hinaus verursachen Mutationen im APP-Gen sowie in den Genen Presenilin-1 (*PSEN1*) und Presenilin-2 (*PSEN2*) eine vermehrte Expression von Aβ oder erhöhen die γ-Sekretase-Aktivität, und sie sind mit einer früh-einsetzenden AD assoziiert [27].

Basierend auf Messungen isotopenmarkierter Liquorproben kognitiv gesunder Erwachsener wird die Aβ-Produktions- und Abbaurate auf etwa 8% pro Stunde geschätzt. Bereits minimale Beeinträchtigungen des Aβ-Abbaus im Gehirn können daher ausreichend sein, um eine Akkumulation von Aβ und somit eine Pathologie auszulösen [21]. Der Abbau der Aβ-Peptide im ZNS erfolgt über mehrere, sich ergänzende Mechanismen, darunter enzymatische und nicht-enzymatische Wege. Intrazelluläres Aβ in Neuronen wird über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut, während extrazelluläres Aβ durch Aβ-abbauende Enzyme (engl.: *Aβ-degrading enzymes*, ADE) wie Neprilysin, das Insulin-abbauende Enzym (engl.: *insulin-degrading enzyme*, IDE), weitere Zink-Metalloendopeptidasen oder das Angiotensin-konvertierende Enzym (engl.: *angiotensin-converting enzyme*, ACE) abgebaut wird [21, 31]. Im nicht-enzymatischen Weg wird Aβ über verschiedene Transport- und Clearance-Mechanismen aus dem Gehirn entfernt. Aβ kann über die Blut-Hirn-Schranke ins Blut transportiert oder von Astrozyten, Mikroglia und Neuronen aufgenommen und intrazellulär abgebaut werden. Zusätzlich erfolgt die Clearance über die interstitielle Flüssigkeit, wobei der Liquor das Peptid aufnimmt und aus dem ZNS entfernt. Etwa 60% der im Gehirn vorhandenen extrazellulären Aβ-Peptide werden über die Blut-Hirn-Schranke in periphere Organe transportiert und dort abgebaut. Dies deutet darauf hin, dass der periphere Abbau von Aβ eine wesentliche Rolle in der AD-Pathologie spielen könnte [71]. Es wurde gezeigt, dass die

Gesamt-Aβ-Konzentrationen und insbesondere die in der Peripherie dominierende $Aβ_{40}$-Konzentration mit sinkender Blutflussrate abnehmen, während die $Aβ_{42}$-Konzentration gegenüber diesen hämodynamischen Schwankungen unverändert bleibt [72]. Aβ-Peptide werden in der Peripherie hauptsächlich durch Blutbestandteile wie Erythrozyten und Monozyten oder durch bestimmte Gewebe oder Organe wie Leber, Niere und den Gastrointestinaltrakt abgebaut [31]. Die weitreichende Verteilung und der systemische Transport von Aβ-Peptiden wurden bisher in diversen Körperflüssigkeiten wie Liquor (engl: *Cerebrospinal fluid, CSF*), Blut, Galle, Urin und Stuhl nachgewiesen [71, 73].

1.2.2 Tau

Tau ist ein intrazelluläres, hochlösliches und intrinsisch ungeordnetes Protein, das überwiegend in Neuronen exprimiert wird. Unter physiologischen Bedingungen erfüllt das Tau-Protein eine zentrale Funktion bei der Stabilisierung sowie der räumlichen Organisation von Mikrotubuli innerhalb der Axone. Durch die Förderung der Bildung von Mikrotubuli aus Tubulin-Dimeren trägt Tau zur Aufrechterhaltung des neuronalen Zytoskeletts und des axonalen Transports bei und ist somit unerlässlich für die strukturelle und funktionelle Integrität von Nervenzellen [27]. Das humane Tau-Protein wird durch das Mikrotubuli-assozierte Protein Tau (engl.: *microtubule-associated protein tau*, *MAPT*) Gen kodiert, welches auf Chromosom 17q21 lokalisiert ist und 16 Exons enthält. Durch alternatives Spleißen spezifischer Exons (Exon 2, 3 und 10) entstehen dabei verschiedene Tau-Isoformen, deren Expressionsmuster im zentralen und peripheren Nervensystem sowie in verschiedenen Entwicklungsstadien variieren [67, 74].

Das Tau-Protein wird strukturell in den N-Terminus, die prolinreiche Region, die Mikrotubuli-Bindungsdomäne sowie den C-Terminus unterteilt. Die N-terminale Projektionsdomäne umfasst etwa zwei Drittel der gesamten Proteinlänge und besteht aus einem sauren N-Terminus und einer darauffolgenden alkalischen, prolinreichen Region. Indem diese Domäne von der Mikrotubuli-Oberfläche in das Zytosol hinausragt, ermöglicht sie Wechselwirkungen mit weiteren Zytoskelett- und Zytoplasmaproteinen, den Organellen sowie mit der Zellmembran. Durch diese Vernetzungsfunktion ist sie an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt und spielt eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der axonalen Stabilität [75]. Die prolinreiche Region weist durch eine Überrepräsentation von Arginin-Resten eine erhöhte Basizität auf und besitzt zudem den höchsten relativen Gehalt an Serin und Threonin. Dies ermöglicht die Interaktion mit zahlreichen Kinasen und Phosphatasen und deutet auf eine zentrale Rolle bei der Regulation der Phosphorylierung hin. Aufgrund einer hohen Dichte an kationischen Lysin-Resten weist die C-terminale Mikrotubuli-Bindungsdomäne unter physiologischen Bedingungen eine stark positive Ladung auf. Diese fungiert als primäre funktionelle Domäne, indem sie mit der negativ geladenen Mikrotubuli-Oberfläche über

Tubulin-Heterodimere interagiert. Durch diese elektrostatischen Wechselwirkungen werden der Zusammenbau und die strukturelle Stabilisierung der Mikrotubuli gewährleistet. Darüber hinaus enthält die Mikrotubuli-Bindungsdomäne zwei Hexapeptidsequenzen, die unter pathologischen Bedingungen β-faltblattreiche Strukturen einnehmen und somit die pathologische Tau-Aggregation initiieren können [74, 76, 77].

Im adulten menschlichen ZNS werden sechs Hauptvarianten des MAPT-Transkripts in entsprechende Tau-Isoformen (mit 352 bis 441 Aminosäuren) translatiert. Diese unterscheiden sich durch das Vorhandensein von null, einer oder zwei N-terminalen Insertionen (0N, 1N oder 2N) sowie durch die Anzahl der Mikrotubuli-Bindungsdomänen. Die Anzahl der Mikrotubuli-Bindungsdomänen hängt vom Ein- oder Ausschließen von Exon 10 ab, wodurch Tau-Isoformen mit drei (3-Repeat, 3R) oder vier (4-Repeat, 4R) Wiederholungssequenzen entstehen, da Exon 10 für eine zusätzliche Bindungsdomäne kodiert. Die Affinität der Mikrotubuli zu Tau nimmt mit der Anzahl dieser Wiederholungen zu [27, 67, 78, 79]. Neuropathologische Tau-Ablagerungen bei verschiedenen Erkrankungen wie der AD, der progressiven supranukleären Blickparese (PSP), der kortikobasalen Degeneration (CBD) oder der frontotemporalen Demenz (FTD), unterscheiden sich nicht nur in ihrer morphologischen Ausprägung und ihren histopathologischen Ausbreitungsmustern, sondern auch in der Beteiligung spezifischer Tau-Isoformen. Bei der AD, einer Amyloid-assoziierten Tauopathie, akkumulieren die 3R- und 4R-Isoformen in einem nahezu ausgewogenen Verhältnis. Im Gegensatz dazu ist die dominierende Tau-Isoform bei der PSP und CBD die 4R-Isoform, während bei bestimmten Formen der FTD überwiegend die 3R-Variante akkumuliert [77].

Das native Tau-Protein liegt unter physiologischen Bedingungen ungefaltet vor. In Abwesenheit von Interaktionspartner wie Mikrotubuli kann es jedoch eine dynamische Konformation einnehmen, bei der sich der C-Terminus zurückfaltet und sich der Mikrotubuli-Bindungsdomäne räumlich annähert, während der N-Terminus sich darüberlegt. In dieser sogenannten *Paperclip*-Konformation werden die aggregationsanfälligen Hexapeptid-Motive der mittleren Domäne, die zur Bildung von β-Faltblattstrukturen neigen, vor einer Aggregation geschützt (s. Abbildung 3). Bei fehlender intramolekularer Wechselwirkung zwischen dem C-Terminus und der Mikrotubuli-Bindungsdomäne kommt der N-Terminus mit diesen exponierten Sequenzen in Kontakt und initiiert die Aggregation [80–82].

Die pathologischen Veränderungen und das Aggregationsverhalten des Tau-Proteins werden u.a. durch verschiedene posttranslationale Modifikationen, durch negativ geladene Cofaktoren wie Polyanionen (z.B. DNA, RNA, Polyphosphate) sowie durch genetische Mutationen im MAPT-Gen beeinflusst [82]. Im AD-Gehirn zeigt Tau eine Vielzahl pathologischer Modifikationen, darunter Hyperphosphorylierung, Glykosylierung, Acetylierung, Methylierung und Ubiquitinierung [75]. Die Hyperphosphorylierung fungiert dabei als zentraler Auslöser der

Tau-Pathologie, indem sie die Dissoziation des Tau-Proteins von den Mikrotubuli induziert. Die daraus resultierende Ladungsverschiebung destabilisiert die protektive, aggregationshemmende *Paperclip*-Konformation, wodurch die aggregationsanfälligen Motive exponiert werden. Somit werden die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen der Tau-Monomere begünstigt, die sich infolgedessen zusammenlagern und initiale Keime für pathologische Fibrillen bilden können (s. Abbildung 3) [81]. Die längste humane Tau-Isoform besitzt 85 potenzielle Phosphorylierungsstellen (Serin, Threonin, Tyrosin) sowie 102 hydrophobe Reste (Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Methionin und Phenylalanin). Zahlreiche dieser Phosphorylierungen und hydrophoben Reste wurden nachweislich mit der Tau-Aggregation in Verbindung gebracht [27, 83]. Zusätzlich zur Phosphorylierung und Acetylierung wirkt die proteolytische Spaltung an den N- und C-terminalen Enden des Tau-Proteins aggregationsfördernd [77].

Die im AD-Gehirn vorkommenden NFTs bestehen überwiegend aus hyperphosphoryliertem Tau, das in fibrillärer Morphologie als gepaarte helikale Filamente (engl.: *paired helical filaments*, PHF) oder als gerade Filamente (engl.: *straight Filaments*, SF) vorliegt, wobei die PHFs die dominierende Struktur darstellen [82]. NFTs führen zu einer Dysfunktion des axonalen Transports von essenziellen Molekülen und beeinträchtigen dadurch die synaptische Kommunikation im ZNS, was zur Neurodegeneration beiträgt. Die Anzahl der NFTs korreliert zudem positiv mit dem Schweregrad der Demenz bei AD [84].

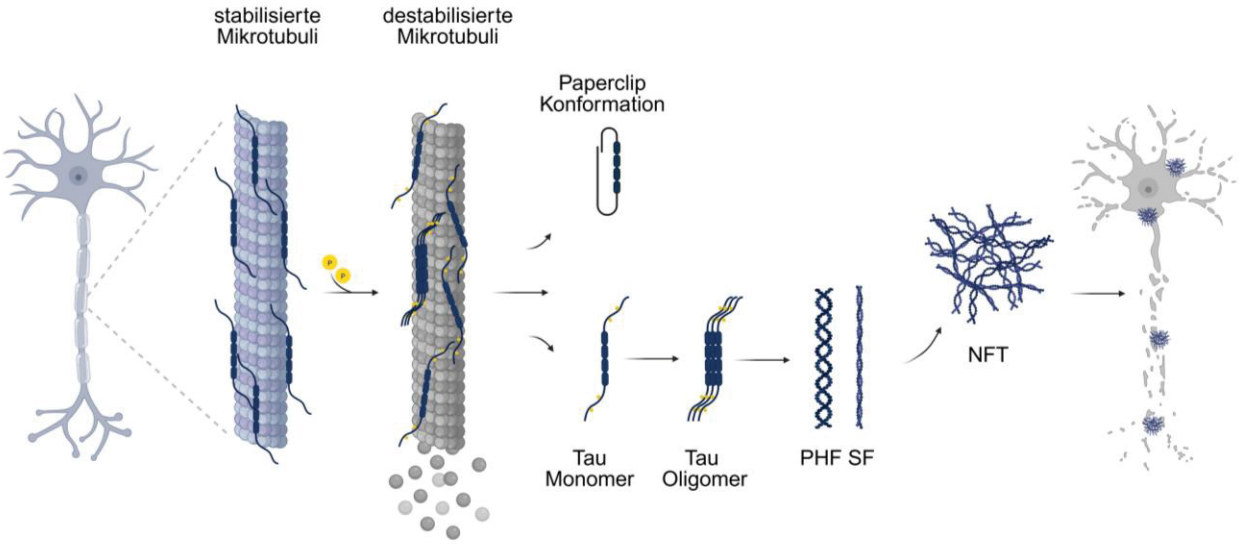


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Tau-Aggregation bei der AD
Unter physiologischen Bedingungen ist Tau in Neuronen an Mikrotubuli gebunden und trägt zu deren Stabilisierung bei. Durch Phosphorylierung verliert Tau diese Bindung und liegt anschließend als Monomer entweder in ungeordneter Form oder in einer sogenannten *Paperclip*-Konformation vor. Diese Monomere können sich zu Oligomeren zusammenlagern, die weiter zu gepaarten helikalen Filamenten (PHF) oder geraden Filamenten (SF) aggregieren und schließlich als neurofibrilläre Bündel (NFTs) abgelagert werden, was mit neuronaler Schädigung und letztlich dem Zelltod einhergeht. Abbildung modifiziert nach Almedia et al., 2025 [27]. *Erstellt mit BioRender.com.*

Analog zu Aβ wird auch bei Tau angenommen, dass insbesondere die Tau-Oligomere eine zentrale Rolle bei der Ausbreitung der Pathologie sowie bei den darauffolgenden neurotoxischen Effekten spielen. Sowohl physiologisch als auch pathologisch gefaltetes Tau wird infolge synaptischer Aktivität in den extrazellulären Raum sezerniert. Die Freisetzung von Tau-Spezies erfolgt über verschiedene Prozesse, darunter die Abgabe über extrazelluläre Vesikel wie Exosomen, die direkte Translokation durch die Zellmembran sowie der Transport über TNTs. Die Aufnahme von sezernierten Tau-Spezies erfolgt schließlich über verschiedene Endozytoseprozesse. Nach der Aufnahme in die Empfängerzelle können die fehlgefalteten Tau-Proteine im Zytosol physiologische Tau-Monomere rekrutieren und somit die pathologische Tau-Ausbreitung induzieren. Darüber hinaus können Mikroglia und Astrozyten extrazelluläres Tau aufnehmen und somit zur Ausbreitung der Tau-Pathologie beitragen [82].
Das intrazelluläre Tau wird hauptsächlich über zwei proteolytische Prozesse abgebaut, das Ubiquitin-Proteasom-System und das Autophagie-Lysosom-System. Fehlregulationen oder eine Überlastung der Kapazitäten dieser Prozesse können zur Akkumulation fragmentierter Tau-Proteine führen. Extrazelluläres Tau wird zusätzlich durch Proteasen sowie durch Phagozytose abgebaut, wobei endozytotische und endolysosomale Prozesse in Mikroglia und Astrozyten eine wichtige Rolle in der Clearance spielen. Ergänzend zum lokalen Abbau wird Tau über die Blut-Hirn-Schranke, die Blut-Liquor-Schranke und über das glymphatische System ins Blut sowie in das Lymphsystem transportiert. Der Nachweis von Tau außerhalb des ZNS, wie in Speicheldrüsen, im Darm, in der Leber oder in der Haut, bestätigt systemische Abbaumechanismen in der Peripherie [85–87].

1.2.3 α-Synuclein

α-Syn ist ein aus 140 Aminosäuren bestehendes,14,6 kDa großes, hochkonserviertes Protein, das überwiegend an präsynaptischen Endigungen lokalisiert ist und 0,5-1% des gesamten zytosolischen Proteins im Gehirn ausmacht. Das α-Syn wird durch das *SNCA*-Gen, das auf Chromosom 4q22.1 lokalisiert ist, kodiert und kommt primär in verschiedenen Bereichen des Gehirns vor, darunter in Neuronen des Neocortex, Hippocampus, Thalamus, Cerebellums und der Substantia Nigra. Trotz weiterhin bestehender Unklarheiten hinsichtlich der wesentlichen physiologischen Funktion im Nervensystem konnte nachgewiesen werden, dass das α-Syn eine bedeutende Rolle bei der Modulation der präsynaptischen Freisetzung von Neurotransmittern, bei mitochondrialen Funktionen und beim Membrantransport mittels Vesikeln spielt und sich an präsynaptischen Enden anreichert [88–90].
α-Syn wird insgesamt in drei Domänen unterteilt. Die N-terminale, amphipathische, lipidbindende α-Helix-Domäne (Aminosäuren 1-60) enthält die evolutionär konservierten KTEGV-Motive und interagiert aufgrund ihrer positiven Ladung mit Membranen. Die N-terminale Domäne enthält den Großteil der mit der familiären PD-assoziierten

Punktmutationen (s. Abbildung 4). Innerhalb der N-terminalen Domäne liegen die bekannten, mit PD-assoziierten Mutationen wie A30P, E46K, H50Q, G51D, A53E sowie die A53T Missense-Mutationen [91]. Darüber hinaus befinden sich die erst kürzlich identifizierten Mutationen T72M und E83Q in der Zentraldomäne des α-Syn-Proteins [92, 93]. Diese hydrophobe Zentraldomäne (Aminosäuren 61-95), die auch als Nicht-Amyloid-β-Komponente (engl.: *non-amyloid-β-component*, NAC-Domäne) bezeichnet wird, ist an der Bildung von zytotoxischen Fibrillen beteiligt, indem sie β-Faltblattstrukturen bildet. Die stark unstrukturierte, negativ geladene, saure C-terminale Domäne (Aminosäuren 96-140) spielt eine bedeutende Rolle bei der Hemmung der Selbstassemblierung zu Fibrillen. Diese Domäne wird an mehreren Stellen phosphoryliert [45, 94].

α-Syn ist ein intrinsisch ungeordnetes Protein, das unter physiologischen Bedingungen im Zytosol ungefaltet vorliegt. Insbesondere die C-terminale Domäne verbleibt aufgrund ihrer geringen Hydrophobizität und hohen negativen Nettoladung in einer ungeordneten *random-coil*-Struktur. Erst bei der Bindung an Membranen nimmt der N-Terminus eine α-helikale Konformation an. Unter pathologischen Umständen unterliegt das α-Syn hingegen einer tiefgreifenden Konformationsänderung hin zu einer β-faltblattreichen Struktur, wodurch toxischen Oligomere und Fibrillen entstehen. Die pathologische Aggregationsneigung wird durch intramolekulare elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der C-terminalen und der NAC-Domäne gehemmt, wodurch aggregationsfördernde β-Faltblatt-Interaktionen abgeschirmt werden. Daher wirkt eine erhöhte Trunkierung der C-Domäne, z.B. aufgrund eines unvollständigen Abbaus, beschleunigend auf die pathologische Aggregation des Proteins. Zudem wurden sowohl trunkierte als auch phosphorylierte Formen des α-Syn-Proteins in Synucleinopathien-assoziierten Lewy-Körperchen nachgewiesen [95, 96].

Kalziumionen spielen eine wichtige Rolle bei der synaptischen Übertragung. α-Syn interagiert mit der Membran in einer spezifischen Konformation und beeinflusst die Kalzium-Signaltransduktion, wobei eine pathologische β-faltblattreiche Konformation des α-Syns Kalzium-Dysregulation verursacht und dadurch den Kalzium-abhängigen Zelltod induziert [91].

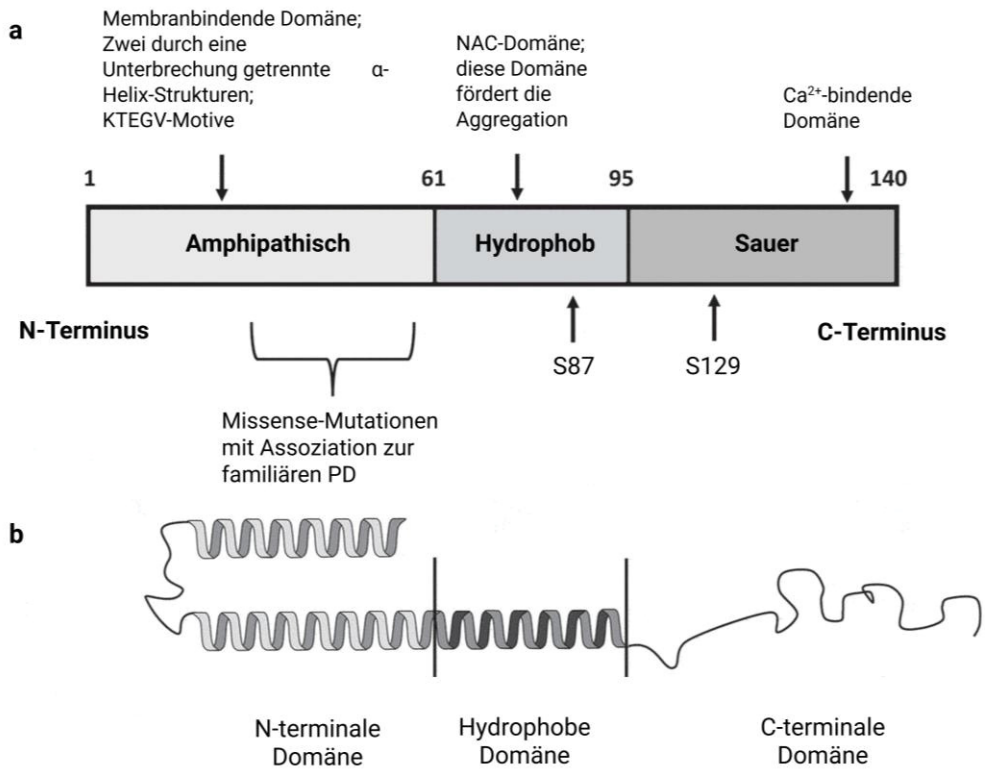


Abbildung 4: Schematische Darstellung der α-Syn-Domänen und der membrangebundenen Struktur
α-Syn besteht aus 140 Aminosäuren und drei Domänen: einer N-terminalen, amphipathischen, membranbindenden Domäne mit konservierten KTEGV-Motiven, der hydrophoben NAC-Domäne, die die pathologische Aggregation des Proteins begünstigt, sowie einer negativ geladenen C-terminalen Domäne mit Kalzium-Bindestelle. Innerhalb der N-terminalen Domäne liegt zudem der Großteil der mit der familiären PD-assoziierten Mutationen. Die Phosphorylierungsstellen S87 und S129 stellen relevante Modifikationsstellen dar, die mit pathologischen Eigenschaften in Verbindung stehen (a). α-Syn liegt unter physiologischen Bedingungen ungefaltet vor und bildet bei einer Membranbindung eine α-helikale Sekundärstruktur am N-terminalen Ende des Proteins aus (b). Abbildung modifiziert nach Török et al., 2016 [97].

Nahezu 90% des α-Syn-Proteins, das in Lewy-Körperchen akkumuliert, ist am Serin-Rest an Position 129 (S129) phosphoryliert, während nur 4% des α-Syn-Proteins im gesunden Gehirn phosphoryliert vorliegt. Dies könnte darauf hindeuten, dass die posttranslationale Modifikation eine bedeutende Rolle bei der Aggregation spielt. Allerdings ist bislang unklar, ob die Phosphorylierung des α-Syn-Proteins kausal zur Aggregation und zur darauffolgenden Ablagerung beiträgt, beispielsweise durch eine reduzierte proteasomale Degradation, oder ob sie erst in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung bzw. nach der Ablagerung auftritt [98].
Der Abbau von intrazellulärem α-Syn erfolgt komplementär über verschiedene Mechanismen. Das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert lösliche Monomere sowie kleine Oligomere, während das lysosomale Autophagie-System, insbesondere die Makroautophagie und die Chaperon-vermittelte Autophagie, die größeren Oligomere abbaut. Darüber hinaus wird sekretiertes α-Syn im Extrazellulärraum durch proteolytische Enzyme degradiert oder von Mikrogliazellen und Astrozyten aufgenommen und lysosomal abgebaut. Es wurde gezeigt, dass eine Dysfunktion dieser Abbaumechanismen zur pathologischen Akkumulation von α-

Syn beiträgt. Insbesondere das Alter, der wichtigste Risikofaktor für PD, ist mit einer verminderten Aktivität dieser Abbaumechanismen assoziiert, was mit erhöhten α-Syn-Konzentrationen in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra während des physiologischen Alterungsprozesses korreliert [50, 99].

1.3 Behandlungsstrategien für neurodegenerative Erkrankungen

Die Aufklärung der nativen Strukturen und physiologischen Funktionen von Aβ-, Tau-, α-Syn-Proteinen sowie der komplexen pathologischen Interaktionen ihrer fehlgefalteten Konformationen mit weiteren relevanten molekularen, zellulären und systemischen Komponenten neurodegenerativer Erkrankungen bildet eine wesentliche Grundlage für das Verständnis der ursächlichen Mechanismen und die Entwicklung gezielter, effektiver therapeutischer Strategien. Die aktuellen Therapieansätze konzentrieren sich überwiegend auf die Linderung der Krankheitssymptome oder die Verlangsamung des Krankheitsverlaufs. Aufgrund dessen sind neue Strategien, die darauf abzielen, die grundlegende Pathologie zu beseitigen, von großer Bedeutung. Dazu zählen Ansätze zur Hemmung der Aggregation, zur Förderung des Abbaus pathologischer Ablagerungen sowie zur Verhinderung der pathologischen Ausbreitung im Körper. Darüber hinaus stellen immunotherapeutische Verfahren, bei denen spezifische Antikörper gezielt gegen pathologische Proteine eingesetzt werden, oder genetische Strategien, wie die Regulation der Genexpression assoziierter Proteine, einen vielversprechenden Ansatz dar [63].

1.3.1 Therapieansätze für AD

Die derzeit etablierten Therapieansätze der AD umfassen symptomatische und krankheits-modifizierende Behandlungsstrategien. Zu den symptomatischen Behandlungsstrategien zählen Acetylcholinesterase-Inhibitoren wie Donepezil, Rivastigmin und Galantamin, die primär bei leichter bis moderater AD eingesetzt werden. Diese erhöhen die Acetylcholin-Spiegel, indem sie den Abbau des wichtigen Neurotransmitters Acetylcholin blockieren, wodurch die kognitiven und funktionellen Fähigkeiten der Betroffenen gefördert werden. Memantin, ein Antagonist des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptors, moduliert die Glutamataktivität und wird insbesondere bei mittelschweren bis schweren AD-Fällen eingesetzt. Memantin verbessert ebenfalls die kognitiven und alltäglichen Leistungen der Patienten. Beide Therapieansätze zielen auf die Symptomatik ab, ohne das Fortschreiten der Erkrankung wesentlich zu beeinflussen [100].

Die Fehlfaltung, Aggregation und anschließende Akkumulation der Aβ- und Tau-Proteine werden als der zugrunde liegende Mechanismus der AD-Pathologie angesehen und stellen daher ein primäres Ziel krankheitsmodifizierender Behandlungsstrategien dar. Aducanumab, ein rekombinanter humaner IgG1-Antikörper, ist das erste zugelassene

krankheitsmodifizierende Medikament, welches durch die spezifische Bindung an Aβ-Plaques einen immunvermittelten Abbau durch Mikrogliazellen unterstützt. Dieser Antikörper führte zu einer signifikanten Reduktion der Aβ-Ablagerungen im Gehirn, konnte jedoch bislang keine eindeutige Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten der Patienten nachweisen [11, 101]. Weitere anti-Amyloid-Immunotherapien wie Donanemab und Lecanemab sind ebenfalls humanisierte monoklonale Antikörper, die zur Reduktion der Aβ-Ablagerungen eingesetzt werden. Im Gegensatz zu Aducanumab zeigten diese beiden Therapien in klinischen Studien eine statistisch signifikante, jedoch klinisch moderate Verlangsamung des kognitiven Abbaus. Nichtsdestotrotz war der Einsatz all dieser Therapien mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von amyloidbedingten Bildgebungsanamolien (engl.: *amyloid-related imaging abnormalities, ARIA)* assoziiert, die Hirnödeme sowie zerebrale Mikroblutungen verursachen können [100, 102–104].

Um die pathologische Fehlfaltung und die Aggregationsprozesse der amyloidogenen Proteine zu vermeiden, kann die physiologische Konformation durch spezifische Liganden stabilisiert oder die Aggregation gezielt inhibiert werden. Ein Beispiel hierfür ist das Transthyretin, ein tetrameres Protein, das durch Bindung an physiologisches Aβ dessen Aggregation hemmt und die fibrillären Strukturen destabilisiert [105]. Das in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Willbold entwickelte D-enantiomere Peptid PRI-002 (auch als RD2 oder Contraloidacetat bezeichnet) befindet sich aktuell in der klinischen Entwicklung und stellt eine alternative, ligandenbasierte Therapie dar, bei der der Wirkstoff durch Stabilisierung der Monomere die Auflösung der bestehenden Aggregate fördert [106].

Der Großteil der sich derzeit in der klinischen Entwicklung befindlichen AD-Therapeutika ist krankheitsmodifizierend. In Phase-3-Studien handelt es sich bei etwa 65% der Wirkstoffe um krankheitsmodifizierende Therapien, wobei 22% dieser Wirkstoffe auf Neurotransmitter-Rezeptoren, 18% auf Aβ-assoziierte Pathologien und 11% auf Tau-assoziierte Pathologien abzielen. Außerdem fokussieren sich aktuelle Studien auf eine Vielzahl potenzieller AD-Mechanismen, darunter Neuroinflammation und Immunreaktionen, synaptische Plastizität, Wachstumsfaktoren und Hormone, Proteostase und Proteinopathie, oxidativen Stress, vaskuläre Mechanismen, die Darm-Hirn-Achse, Neurogenese sowie Lipoproteinrezeptoren [107].

1.3.2 Therapieansätze für PD

Aufgrund der mangelnden Therapien, welche die ursächliche Pathologie der PD gezielt verhindern oder aufhalten, konzentrieren sich die aktuellen PD-Behandlungen primär auf die Linderung der motorischen und nicht-motorischen Symptome sowie auf die Verzögerung der Krankheitsprogression. Die meisten symptomatischen Therapieansätze zielen darauf ab, den Dopaminspiegel im Gehirn der Betroffenen zu erhöhen [11].

Die gängigste Therapie besteht in der Verabreichung von L-Dopa-Präparaten (Levodopa), einem metabolischen Vorläufer von Dopamin. Das Levodopa wird im Körper der Betroffenen von den verbleibenden dopaminergen Neuronen aufgenommen und im präsynaptischen Terminal durch Decarboxylierung zu Dopamin umgewandelt. Im Gegensatz zu Dopamin kann Levodopa die Blut-Hirn-Schranke überwinden, wird jedoch sowohl im ZNS als auch in der Peripherie zu Dopamin metabolisiert. Um eine vorzeitige periphere Metabolisierung zu vermeiden und sicherzustellen, dass genügend Levodopa die Blut-Hirn-Schranke erreicht, wird es häufig in Kombination mit peripheren Decarboxylasehemmern wie Carbidopa verabreicht [11, 108]. Neben Levodopa werden bei der Therapie auch andere Wirkstoffe eingesetzt, darunter Dopaminagonisten wie Rotigotin oder Apomorphinhydrochlorid, sowie Monoaminoxidase-Hemmer (MAO-Hemmer) und Catechol-O-Methyltransferase-Hemmer (COMT-Hemmer). MAO- und COMT-Hemmer blockieren im Gehirn und in der Peripherie den Dopamin- bzw. Levodopa-Abbau und verlängern somit deren Wirkdauer [109]. Auch wenn Levodopa die am häufigsten eingesetzte medikamentöse Dopaminsubstitution darstellt, ist diese Therapie mit einer Reihe unerwünschter Nebenwirkungen wie Levodopa-induzierten Dyskinesien, Impulskontrollstörungen und motorischen Fluktuationen verbunden. Amantadin, ein Antagonist des NMDA-Rezeptors, ist derzeit das einzige wirksame Medikament zur Behandlung Levodopa-induzierter Dyskinesien [110].

Von den aktuell in der klinischen Entwicklung befindlichen PD-Therapien zielen 51% auf krankheitsmodifizierende Mechanismen ab, während 49% auf die symptomatische Behandlung ausgerichtet sind, darunter 15% auf nicht-motorische und 34% auf motorische Symptome [111]. Die krankheitsmodifizierenden PD-Therapien, die sich derzeit in der klinischen Entwicklung befinden, zielen primär darauf ab, die Synthese von α-Syn zu reduzieren, dessen Abbau zu fördern, die Aggregation zu hemmen sowie die Ausbreitung der Pathologie zu verhindern. Im Fokus der aktuellen Entwicklungen stehen insbesondere monoklonale Antikörper, aktive Immunisierungen und Aggregationshemmer aufgrund ihres hohen therapeutischen Potenzials. Eine dieser experimentellen Behandlungen ist Buntanetap, ein niedermolekularer Wirkstoff, der sich derzeit in einer Phase-3-Studie befindet und die α-Syn-Expression auf translationaler Ebene hemmt. Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist die passive Immunisierung durch den monoklonalen Antikörper Prasinezumab, der selektiv gegen aggregiertes α-Syn gerichtet ist und dadurch dessen pathologische Ausbreitung hemmt. Eine Alternative hierzu ist die aktive Immunisierung, bei der das native Immunsystem durch die Verabreichung spezifischer Antigene zur Bildung gewünschter Antikörper genutzt wird. Im Rahmen dieser immunotherapeutischen Behandlungen stellt der Impfstoff UB-312 einen vielversprechenden Ansatz zur aktiven Immunisierung dar. Dieser synthetische Peptidimpfstoff löst eine gezielte Immunantwort gegen pathologisches α-Syn aus, wodurch dessen Aggregation sowie die interzelluläre Weitergabe gehemmt werden [112–114].

Trotz vielversprechender Entwicklungen bleibt die erfolgreiche Etablierung wirksamer AD- sowie PD-Therapeutika ohne relevante Nebenwirkungen eine große Herausforderung. Dies ist unter anderem auf Limitationen der klinischen Studien zurückzuführen, darunter die Fokussierung auf nicht primär toxische Amyloidformen wie physiologische Monomere oder Plaques, eine unzureichende Hemmung toxischer Oligomere, die geringe Permeabilität von Antikörpern in das Gehirn sowie die Heterogenität der Neuropathologien und der Patientenpopulationen. Darüber hinaus erschwert das Fehlen spezifischer Biomarker die präklinische Diagnostik, wodurch therapeutische Ansätze häufig erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien getestet und eingesetzt werden [113, 115].

1.4 Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen

Die Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen basiert im klinischen Alltag primär auf der Anamnese, der Bewertung der klinischen Symptomatik und des Erscheinungsbildes sowie auf ergänzenden neurologischen Untersuchungen. Eine wesentliche Herausforderung besteht jedoch darin, dass derartige Erkrankungen bzw. die zugrunde liegenden pathologischen Veränderungen im Körper bereits über Jahre oder Jahrzehnte hinweg fortschreiten, bevor sie klinisch diagnostizierbar werden. Darüber hinaus erschweren die interindividuelle Heterogenität sowie die neuropathologische Überlappung verschiedener Erkrankungen eine eindeutige diagnostische Zuordnung. Aufgrund dessen wurden standardisierte diagnostische Kriterien und Klassifikationen entwickelt, um die diagnostische Genauigkeit zu erhöhen und somit zielgerichtete Behandlungen zu ermöglichen. Diese Ansätze berücksichtigen nicht nur die klinischen Kriterien, sondern auch Biomarker-basierte und pathophysiologische Konzepte [33, 63].

1.4.1 AD Diagnose und Klassifizierung

Die Diagnose der AD hat sich, wie bereits im Kapitel 1.1.1.1 dargestellt, in den letzten Jahren von einer rein syndromalen Perspektive hin zu einer biologisch orientierten Konzeptualisierung entwickelt. Während früher vor allem die klinischen Folgen der Erkrankung, wie die Symptome oder das Erscheinungsbild, im Vordergrund standen, basiert die Diagnosestellung im Forschungsrahmen auf dem Nachweis pathophysiologischer Veränderungen. Hierzu zählen insbesondere der Nachweis von krankheitsspezifischen Biomarkern im Körper sowie Befunde aus bildgebenden Verfahren [33, 116].

Die AD ist eine chronisch progrediente neurodegenerative Erkrankung, deren Pathologie im Gehirn sich lange vor dem Auftreten klinischer Symptome entwickelt, wodurch die kognitiven Einschränkungen allmählich zunehmen. Basierend auf dem Ausmaß der kognitiven Beeinträchtigungen wird die AD in verschiedene Stadien unterteilt, die asymptomatische präklinische Phase, die prodromale Phase und die Demenzphase. Jedoch sind die Übergänge

zwischen diesen Phasen nicht eindeutig zu identifizieren. Dies erschwert die Diagnose besonders in den Frühstadien der Erkrankung [117]. Vor diesem Hintergrund stellt die S3-Leitlinie „Demenzen“ eine evidenzbasierte Orientierungshilfe dar und definiert den aktuellen wissenschaftlichen Qualitätsstandard in Deutschland für die Diagnose und Behandlung von Demenzerkrankungen im klinischen Alltag. Diese Leitlinie bildet den gesamten Prozess ab, indem sie fundierte Empfehlungen von der Früherkennung mittels validierter kognitiver Tests bis hin zu den therapeutischen Behandlungen für die Betroffenen bereitstellt [118].

Die klinische Diagnosestellung basiert weiterhin primär auf der Erhebung einer ausführlichen Anamnese, in der die Krankheitsgeschichte systematisch erfasst wird. Dazu gehören aktuelle Beschwerden, der Krankheitsverlauf, Vorerkrankungen, medikamentöse Behandlungen sowie relevante Lebensumstände [119]. Diese dient als Grundlage für weitere Untersuchungen sowie für die Einordnung der bestehenden Symptomatik. Die Auswertung funktioneller Tests, wie den Aktivitäten des täglichen Lebens (engl.: A*ctivities of Daily Living*, ADL) oder dem Angehörigenfragebogen zur Alltagsfunktionalität (engl.: *Functional Activities Questionnaire*, FAQ), liefert zudem wichtige diagnostische Hinweise auf die kognitiven und funktionellen Fähigkeiten sowie den Grad der Selbstständigkeit der Betroffenen [118, 119]. Der mentale Status wird anhand verschiedener kognitiver Domänen beurteilt, wobei Gedächtnis, Denkvermögen, visuell-räumliche und sprachliche Fähigkeiten sowie das Verhalten in Betracht gezogen werden. Eine kognitive Beeinträchtigung im Sinne einer Demenz wird diagnostiziert, wenn in mindestens zwei dieser Bereiche Veränderungen bzw. Defizite identifiziert werden, die eine relevante Einschränkung der Selbstständigkeit im Alltag verursachen [119, 120].

Im klinischen Alltag wird die Demenzphase nach dem Ausmaß der kognitiven Beeinträchtigungen in leichte, moderate und schwere Formen unterteilt. Als symptomatische Indikatoren für eine Demenz gelten die subjektive kognitive Beeinträchtigung (engl.: *Subjective cognitive decline*, SCD) sowie die leichte kognitive Beeinträchtigung (engl.: *Mild cognitive impairment*, MCI). Die SCD beschreibt einen von den Betroffenen selbst wahrgenommenen Rückgang der kognitiven Fähigkeiten, wobei im Gegensatz zur MCI in standardisierten neuropsychologischen Tests keine objektiven Beeinträchtigungen nachweisbar sind. Ergänzend umfasst die klinische Diagnose körperliche und neuropsychologische Untersuchungen, um andere mögliche Erkrankungen auszuschließen, insbesondere dann, wenn die routinemäßige Anamnese und die klinische Beurteilung des mentalen Status keine eindeutige Diagnose ermöglichen. Um alternative Ursachen der kognitiven Beeinträchtigungen, wie vaskuläre, andere neurodegenerative oder medikamentöse Faktoren auszuschließen, werden ergänzende diagnostische Verfahren eingesetzt. Dazu gehören bildgebende Untersuchungen, Laboranalysen sowie weitere differenzialdiagnostische Abklärungen [117, 118, 121, 122].

Bei unklarer Diagnosestellung können zur weiterführenden Differenzierung bildgebende Verfahren wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) sowie die strukturelle Magnetresonanztomographie (MRT) eingesetzt werden. Ergänzend ermöglichen CSF-Biomarkeranalysen die Bestimmung charakteristischer Merkmale der AD-Pathologie. Die MRT wird zur Erfassung der topographischen Hirnatrophie eingesetzt, die mit dem klinischen Schweregrad korreliert. Morphometrische Parameter spezifischer Hirnregionen sowie Strukturmerkmale des Hippocampus erlauben eine Differenzierung zwischen MCI, AD und Kontrollen mit moderater diagnostischer Genauigkeit. Da andere neurodegenerative Erkrankungen ebenfalls eine erhöhte Hirnatrophie aufweisen, eignet sich die MRT primär zur allgemeinen Objektivierung von Neurodegeneration sowie zum Ausschluss anderer potenzieller Ursachen wie der DLB oder einer vaskulären Demenz [116]. Die PET wird zur Lokalisierung und Quantifizierung von Aβ- und Tau-Ablagerungen im Gehirn sowie zur Erfassung des regionalen Glukosestoffwechsels eingesetzt, um die synaptische Dysfunktion sowie die neuronale Degeneration abzubilden. Die Lokalisierung wird mittels eines intravenös verabreichten Radiopharmakons ermöglicht. Die Amyloid-PET ermöglicht die selektive Detektion fibrillärer Aβ-Ablagerungen im Gehirn unter Verwendung etablierter Radiopharmaka. Zu den etablierten Amyloid-PET radiomarkierten Liganden zählen Pittsburgh Compound B (PiB), Florbetapir, Florbetaben und Flutemetamol. Im Vergleich zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen weist die Amyloid-PET eine erhöhte diagnostische Spezifität für das Vorliegen von Aβ-Pathologie auf, die mit der AD-Pathologie assoziiert ist. Die diagnostische Aussagekraft der Amyloid-PET ist jedoch begrenzt, da Aβ-Ablagerungen auch bei kognitiv unauffälligen älteren Individuen vorkommen. Ein positiver Amyloid-PET-Befund ist daher nicht spezifisch für die klinisch manifestierte AD-Pathologie und sollte durch weitere Biomarker ergänzt werden. Daher wird die Amyloid-PET primär zur Unterstützung der Differenzialdiagnostik eingesetzt, insbesondere zur Differenzierung zwischen neurodegenerativen Erkrankungen mit Aβ-Ablagerungen und solchen, die mit α-Syn oder Tau assoziiert sind. Die Tau-PET stellt hierbei eine aussagekräftigere Methode dar, um kognitive Dysfunktionen und das Erkrankungsstadium abzuschätzen, da sie NFTs erfasst, die eng mit der klinischen Symptomatik korrelieren. Zur Analyse des zerebralen Glukosestoffwechsels wird die ^{18}F-Fluordesoxyglukose-PET (FDG-PET) eingesetzt, die als funktioneller Bildgebungsbiomarker dient. Bei reduzierter neuronaler Aktivität kommt es zu einer Abnahme des Glukosestoffwechsels. Mittels FDG-PET wird dieses regionale, charakteristische Muster des Glukose-Hypometabolismus visualisiert, das mit spezifischen zugrunde liegenden neuropathologischen Veränderungen assoziiert ist. Bei AD findet sich in der FDG-PET typischerweise ein reduzierter Glukosestoffwechsel im Temporoparietallappen, besonders ausgeprägt im hinteren cingulären Kortex und im Precuneus. Diese Hirnareale spielen für kognitive Prozesse eine wichtige Rolle [7, 116, 119, 123].

Die zentralen CSF-Biomarker für die AD-Diagnostik sind $A\beta_{42}$, $A\beta_{40}$, p-Tau und Gesamt-Tau (engl.: *total-Tau*, t-Tau). Charakteristisch für die AD ist eine reduzierte $A\beta_{42}$-Konzentration im CSF, was auf die Plaquebildung im Gehirn zurückzuführen ist. Demgegenüber sind sowohl die t-Tau- als auch die p-Tau-Konzentrationen im CSF erhöht. Da ein Anstieg der t-Tau-Konzentration ein allgemeiner Biomarker für die neuronale Schädigung ist und ebenfalls bei einem Schlaganfall oder Schädel-Hirn-Trauma auftritt, gilt eine erhöhte p-Tau-Konzentration als spezifischerer Biomarker für die AD-Pathologie. Die erhöhte p-Tau-Konzentration steht im Zusammenhang mit der Bildung von NFTs, einem weiteren charakteristischen Merkmal der AD-Pathologie [123]. Im Gehirn von AD-Betroffenen befindet sich die drei- bis vierfache Konzentration an p-Tau im Vergleich zu einem gesunden Gehirn [124]. Die Biomarker-Verhältnisse stellen einen sensitiveren Indikator für die AD-Pathologie als Einzelmarker dar. Im Vergleich zu Kontrollprobanden ist die $A\beta_{42}$-Konzentration bei Individuen mit Aβ-Ablagerungen im Gehirn typischerweise um 40-60% reduziert, während die $A\beta_{40}$-Konzentration in beiden Gruppen weitgehend unverändert bleibt. Daher weist eine Abnahme des $A\beta_{42}/A\beta_{40}$-Verhältnisses auf eine beeinträchtigte Aβ-Clearance hin, wobei individuelle Unterschiede in der APP-Prozessierung berücksichtigt werden [7, 123]. Da t-Tau ein Zustandsmarker für eine neuronale Schädigung ist, weist es eine geringere Spezifität für die AD auf und wird daher häufig im Verhältnis zu $A\beta_{42}$ oder p-Tau bewertet. Erhöhte t-Tau- und p-Tau-Konzentrationen im CSF in Kombination mit einer reduzierten $A\beta_{42}$ -Konzentration (t-Tau/$A\beta_{42}$ und p-Tau/$A\beta_{42}$) stellen ein typisches AD-Biomarkerprofil dar und korrelieren mit den PET-Befunden von Individuen [125]. Sowohl die bildgebenden Verfahren als auch die CSF-Biomarkeranalysen weisen jeweils spezifische Vor- und Nachteile auf. CSF ist reich an hirneigenen Biomarkern, die die Pathophysiologie gut widerspiegeln, und enthält zudem wenige Verunreinigungen. Demgegenüber stellt die Gewinnung von CSF mittels Lumbalpunktion ein invasives Verfahren dar, das mit möglichen Nebenwirkungen verbunden ist und dadurch eine routinemäßige Entnahme erschwert. Auch die bildgebenden Verfahren bieten wertvolle diagnostische Informationen, sind jedoch mit hohen Kosten verbunden und nur eingeschränkt verfügbar. Die routinemäßige Anwendung dieser Verfahren ist zudem aufgrund der Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung oder starken Magnetfeldern für einen Teil der Betroffenen nicht möglich [7].

Blutbasierte Biomarker zur Detektion der AD-Pathologie haben sich in den letzten Jahren erheblich weiterentwickelt, da sie im Vergleich zu den etablierten, jedoch aufwendigen Verfahren der CSF-Analyse und PET-Bildgebung eine kostengünstige und minimal-invasive Alternative darstellen [126]. Ein reduziertes $A\beta_{42}/A\beta_{40}$-Verhältnis reflektiert dabei, analog zu den etablierten CSF-Analysen, zunehmende zerebrale Aβ-Ablagerungen, wobei dieser Biomarker im Blut jedoch eine geringere Stabilität und Genauigkeit aufweist als p-Tau-Spezies. Plasma-p-Tau-Konzentrationen korrelieren eng mit etablierten PET- und CSF-

Biomarkern sowie mit neuropathologischen Hirnveränderungen und der späteren Manifestation einer AD-bedingten Demenz [127]. Als klinisch besonders aussagekräftig haben sich die p-Tau-Spezies p-Tau217 und p-Tau181 erwiesen. Deren Konzentrationen im Plasma reflektieren primär die zerebrale Aβ-Pathologie. Insbesondere Plasma-p-Tau217 zeigt eine hohe Genauigkeit für den frühen Tau-PET-Status und steigt bereits sehr früh im Verlauf des AD-Kontinuums als Reaktion auf die Aβ-Pathologie an, noch bevor ausgeprägte Tau-Ablagerungen in Form von NFTs nachweisbar sind [116, 128]. Neben p-Tau217 und p-Tau181 zählen zudem das Gliafaserprotein (engl.: *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) als Indikator der Astrozytenaktivierung sowie die Neurofilament-Leichtkette (engl.: *neurofilament light chain*, NfL) als ein unspezifischer Biomarker neuroaxonaler Schädigung zu den relevanten blutbasierten Biomarkern [128]. Während GFAP-konzentrationen im Plasma mit reaktiver Astrogliose und früher AD-assoziierter Aβ-Pathologie in Verbindung gebracht werden, spiegeln erhöhte NfL-Konzentrationen vor allem das Ausmaß neuroaxonaler Schädigung wider, sind jedoch nicht spezifisch für die AD-Pathologie [129]. Unter diesen Varianten zeigt p-Tau217 mit einer diagnostischen Genauigkeit von 90% beim Nachweis einer Aβ-Pathologie die höchste Aussagekraft [128]. Trotz dieses erheblichen Potenzials bestehen weiterhin klinische Herausforderungen, die den breiten Einsatz blutbasierter Biomarker limitieren. Ein zentraler Kritikpunkt ist die Beeinflussung der Plasma-Biomarker-Werte durch Begleiterkrankungen wie chronische Niereninsuffizienz. Außerdem erschweren die derzeit noch unzureichende assayspezifische Standardisierung sowie die Variabilität der Grenzwerte zwischen verschiedenen Herstellern die Vergleichbarkeit der Ergebnisse in der klinischen Routine [126].

Um ein kontinuierliches Fortschreiten der AD im Forschungskontext besser berücksichtigen zu können, wurden im Jahr 2011 international anerkannte Leitlinien für die Diagnosekriterien der AD vom *National Institute on Aging* und der *Alzheimer's Association* (NIA-AA) entwickelt. Die NIA-AA-Leitlinien betrachten die AD als ein Kontinuum, das von präklinischen Stadien über die SCD und MCI bis hin zur Manifestation der Demenz reicht. Ziel dieser internationalen Kriterien ist eine differenzierte Einordnung der Krankheitsstadien, primär für Untersuchungen im Forschungskontext, jedoch mit adaptierter Anwendung in der klinischen Diagnostik [33, 116]. Die Einteilung des AD-Kontinuums (s. Abbildung 5) erfolgt anhand des AT(N)-Klassifizierungssystems, wobei „A" eine Aβ-Pathologie bezeichnet, die mittels Aβ-PET oder reduzierten CSF-$A\beta_{42}$-Werten nachgewiesen wird, „T" eine Tau-Pathologie, die durch Tau-PET oder erhöhtes CSF-p-Tau erfasst wird, und „N" die Neurodegeneration oder neuronale Schädigung widerspiegelt, die durch MRT, einen Hypometabolismus in der FDG-PET oder erhöhtes t-Tau bestimmt wird [33].

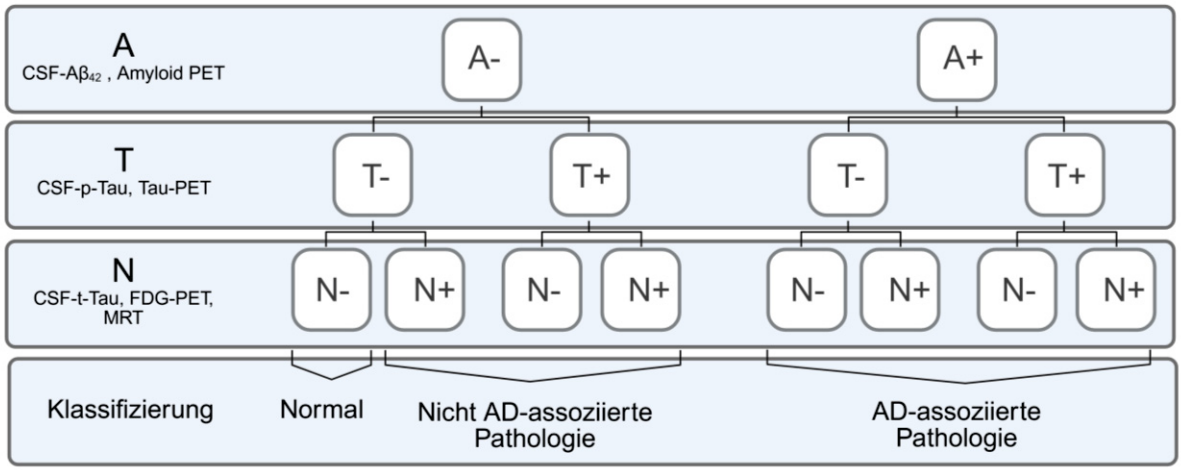


Abbildung 5: Etablierte Biomarker und AT(N)-Klassifizierung der AD
Zur Diagnostik der Aβ-Pathologie (A), Tau-Pathologie (T) und Neurodegeneration (N) werden etablierte Biomarker eingesetzt. Das Vorliegen einer Aβ-Pathologie wird durch reduzierte Aβ42-Konzentrationen im CSF oder eine auffällige Amyloid-PET nachgewiesen. Eine Tau-Pathologie zeigt sich durch erhöhte p-Tau-Konzentrationen im CSF sowie eine pathologische Tau-PET. Neurodegeneration wird über erhöhte t-Tau-Spiegel im CSF sowie mittels MRT oder FDG-PET erfasst. Die Einteilung dementieller Erkrankungen erfolgt anhand verschiedener AT(N)-Profile. Dabei wird zunächst zwischen einer AD-assoziierten Pathologie mit positivem Amyloid-Status (A+) und einer nicht AD-assoziierten Pathologie ohne Aβ-Ablagerungen (A-) unterschieden. Ergänzend wird das Vorliegen (T+) oder Fehlen (T-) einer Tau-Pathologie berücksichtigt. Bei gleichzeitigem Vorhandensein beider Pathologien (A+T+) wird die Erkrankung als AD klassifiziert. Sind alle Biomarker unauffällig (A-, T-, N-), entspricht dies einem physiologischen Biomarkerprofil (normal). Abbildung modifiziert nach Jack et al., 2018 [33]. *Erstellt mit BioRender.com*.

Eine Aβ-Pathologie gilt als das früheste und häufigste messbare Biomarker-Ereignis im Alzheimer-Kontinuum, das bereits Jahre vor klinischen Symptomen oder dem Auftreten der Tau-Pathologie vorhanden ist. Aufgrund dessen gilt ein positiver Amyloid-Status (A+) als ein ausschlaggebendes Kriterium für die Einordnung in das AD-Kontinuum. Die zeitliche Abfolge der pathologischen Veränderungen bei AD zeigt, dass die Tau-Pathologie verzögert zur Aβ-Pathologie auftritt. Ein unauffälliger Tau-Status wird daher bei vorhandener Amyloid-Pathologie meist als Hinweis auf ein frühes Stadium im AD-Kontinuum interpretiert, während eine nachgewiesene Tau-Pathologie (T+) als ausschlaggebend für die gesicherte AD-Diagnose gilt. Bei nachweisbarer Neurodegeneration (N+) trotz gleichzeitig unauffälligem Amyloid- (A-) und Tau-Status (T-) ist primär von einer nicht AD-assoziierten Pathologie auszugehen. Eine Einteilung als nicht AD-assoziierte Pathologie erfolgt, wenn keine Amyloid-Pathologie vorliegt (A-) und gleichzeitig entweder eine Tau-Pathologie und/oder eine Neurodegeneration nachweisbar ist [33].

Eine symptomatische Klassifizierung der Krankheitsstadien anhand von Biomarker-Ergebnissen kann die sequenzielle Progression innerhalb des AD-Kontinuums abbilden. Diese beginnt mit einem frühen Stadium (Stadium 1), das durch den Nachweis pathologischer AD-Biomarker bei noch asymptomatischen Individuen charakterisiert ist. Mit zunehmender Ausprägung der Biomarker-Veränderungen treten subtile klinische Symptome auf. Im weiteren

Verlauf führt das fortschreitende Ausmaß der pathologischen Veränderungen zu einer zunehmenden Verschlechterung der kognitiven Funktionen, die schließlich in einer Demenz aufgrund der AD resultiert [130].

Tabelle 1: Symptomatische Klassifizierung der AD-Krankheitsstadien nach Jack et al., 2024 [130]

Stadium	Klinischer Status	Merkmale
1	Normale Kognition	Keine subjektiv wahrgenommenen und keine objektivierbaren kognitiven Einschränkungen
2	Subjektiver kognitiver Abbau (SCD)	Subjektiv berichtete kognitive Beschwerden, jedoch keine Auffälligkeiten in neuropsychologischen Tests
3	Leichte kognitive Beeinträchtigung (MCI)	Objektivierbare kognitive Defizite in Tests, noch weitgehend erhaltene Alltagsfunktionen
4	Leichte Demenz aufgrund der AD (Milde AD)	Erste Einschränkungen der Alltagsaktivitäten, noch teilweise selbstständig
5	Moderate AD	Deutliche Einschränkungen der Alltagsfunktionalität, zunehmender Unterstützungsbedarf
6	Fortgeschrittene AD	Schwere kognitive und funktionelle Beeinträchtigung, vollständige Abhängigkeit

1.4.2 PD Diagnose und Klassifizierung

Die klinische Diagnose der PD kann in der Regel erst nach dem Auftreten motorischer Symptome gestellt werden und basiert primär auf der strukturierten Erhebung der Anamnese sowie auf körperlichen und neurologischen Untersuchungen, wobei sowohl motorische als auch nicht-motorische Symptome systematisch erfasst werden. Die klinischen Diagnosekriterien für die PD erfordern das Vorliegen motorischer Symptome, insbesondere einer Bradykinesie in Kombination mit einem Ruhetremor, einem Rigor oder beiden. Anhand der Kriterien der *International Parkinson and Movement Disorder Society* (MDS) müssen für die klinisch gesicherte Diagnose der PD, die ohne pathologische Bestätigung erfolgt und sich auf das klinische Erscheinungsbild stützt, zusätzlich zu den grundlegenden motorischen Symptomen mindestens zwei weitere Kriterien erfüllt sein. Dazu zählen ein Ruhetremor, eine deutliche Symptomverbesserung unter dopaminerger Therapie (z.B. Levodopa) sowie das Auftreten von Levodopa-induzierten Dyskinesien. Weitere unterstützende Kriterien sind Riechstörungen oder der Nachweis einer kardialen sympathischen Denervierung in der Myokardszintigraphie. Letztere ist ein bildgebendes Verfahren zur Beurteilung der Noradrenalinaufnahme im Herzen, die bei der PD typischerweise reduziert ist. Außerdem

spielen besonders prodromale Beschwerden wie Riechstörungen, Schlafverhaltensstörungen und Obstipationen eine relevante Rolle, da sie oft im Frühstadium der PD auftreten und zur klinischen Diagnose beitragen können [109, 131, 132]. Zur Diagnosestellung der iRBD, eines bedeutsamen nicht-flüssigkeitsbezogenen Biomarkers für die prodromale Phase der PD, ist eine Polysomnographie (PSG) erforderlich. Hierbei wird das Schlafverhalten der Betroffenen klinisch und elektrophysiologisch überwacht, um die für das Krankheitsbild typische, aufgehobene Muskelatonie im REM-Schlaf nachzuweisen. Unterstützend kann die Diagnose mittels eines RBD-Screening-Fragebogens (engl.: *REM sleep behavior disorder screening questionnaire*, RBDSQ) gestellt werden [133].

Klinische Bewertungsskalen sind essentielle Instrumente in der PD-Diagnose. Sie dienen der objektiven Quantifizierung der Symptomlast, der Bestimmung des Schweregrades sowie der Erfassung der Krankheitsprogression. Die am häufigsten verwendeten Bewertungsskalen bei der PD-Diagnose sind die Hoehn & Yahr Skala sowie die *Unified Parkinson`s Disease Rating Scale* der MDS (MDS-UPDRS). Die Hoehn & Yahn Skala dient hierbei der Einstufung des Schweregrades der Erkrankung, primär anhand der motorischen Symptome sowie posturaler Störungen. Hierbei handelt es sich um eine Skala, die den Krankheitsverlauf in fünf Stadien unterteilt. Sie bildet insbesondere die fortschreitende Beeinträchtigung der Motorik sowie den zunehmenden Verlust der posturalen Kontrolle und der selbstständigen Lebensführung ab [134].

Tabelle 2: Stadieneinteilung der PD nach Hoehn & Yahr, 1967 [135]

Stadium	Beschreibung
Stadium I	Ausschließlich einseitige Symptome mit minimaler oder ohne funktionelle Beeinträchtigung
Stadium II	Bilaterale Beteiligung ohne Beeinträchtigung des Gleichgewichts
Stadium III	Manifestation einer posturalen Instabilität, klinisch objektivierbar durch den „Pull-Test“; trotz funktioneller Einschränkungen körperlich selbstständig
Stadium IV	Schweres Krankheitsbild mit massiver Funktionseinschränkung, Mobilität ohne Unterstützung noch möglich, ist jedoch hochgradig erschwert
Stadium V	Vollständige Pflegebedürftigkeit, Patient ist immobil und ohne Fremdhilfe an den Rollstuhl gebunden oder bettlägerig

Zur Bestimmung des Schweregrads der Symptome wird häufig die klinische Bewertungsskala MDS-UPDRS eingesetzt. Diese Skala ermöglicht eine detaillierte Beurteilung des Krankheitsverlaufs und gliedert sich in vier Teile, die sowohl motorische als auch nicht-motorische Symptome abdecken. Die Bewertung der einzelnen Teile erfolgt über fünf

standardisierte Antwortmöglichkeiten (normal, leicht, mild, moderat und schwerwiegend), die den Ausprägungsgrad der Symptome widerspiegeln [134, 136].

Tabelle 3: Übersicht der klinischen Bewertungsskala MDS-UPDRS

Teil	Bezeichnung	Fokus der Evaluation
I	Nicht-motorische Aspekte	Neuropsychiatrische Verfassung (u.a. Kognition, Depression, Halluzinationen, Stimmung) Schlafstörungen, autonome Funktionsstörungen
II	Motorische Alltagsaspekte	Beurteilung der patientenzentrierten Beeinträchtigungen funktioneller ADL infolge der motorischen Symptomatik
III	Motorische Untersuchungen	Objektive klinische Beurteilung der motorischen Symptome, deren Schweregrad sowie der posturalen Stabilität
IV	Motorische Komplikationen	Systematische Erfassung und Quantifizierung von Dyskinesien und klinischen Fluktuationen

Ähnlich wie bei der AD-Diagnostik werden bei unklarer Diagnose ergänzend verschiedene bildgebende Verfahren sowie Laboruntersuchungen durchgeführt, um alternative Ursachen auszuschließen. Im Fokus stehen dabei insbesondere die MRT sowie nuklearmedizinische Verfahren wie PET und die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (engl.: *Single-photon emission computed tomography*, SPECT), mit denen funktionelle und strukturelle Veränderungen im Gehirn erfasst werden können. Während die MRT, analog zu AD-Diagnostik, keine zentrale diagnostische Methode zur Bestätigung der PD ist, spielt sie jedoch eine entscheidende Rolle beim Ausschluss struktureller Läsionen oder Tumoren. Funktionelle Veränderungen werden hingegen mittels PET oder SPECT dargestellt. Hierbei kommen radioaktiv markierte Liganden zum Einsatz, die die Blut-Hirn-Schranke passieren und an spezifische Zielstrukturen binden. Bei der PD kommt es infolge des fortschreitenden Verlusts dopaminerger Neurone zu einer signifikanten Reduktion der Dichte der Dopamintransporter (DAT). Diese Reduktion stellt einen etablierten Biomarker der präsynaptischen dopaminergen Dysfunktion dar und kann mittels funktioneller SPECT- und PET-Bildgebung dargestellt werden. Eine Visualisierung mithilfe von DAT-Liganden wie Ioflupan in Kombination mit SPECT oder durch PET-Verfahren mit dopaminergen Liganden wie dem markierten Levodopa-Analogon Fluorodopa (F-Dopa) ermöglicht eine differenzierte Beurteilung der dopaminergen Funktion. Dies unterstützt insbesondere die Abgrenzung der PD von anderen Ursachen wie dem essentiellen oder arzneimittelinduzierten Tremor, bei denen in der Regel eine normale DAT-Dichte vorliegt. Für eine Differenzialdiagnose zwischen PD und atypischen Parkinsonismus-Syndromen (wie CBD, DLB, MSA oder PSP) wird zudem häufig die FDG-PET eingesetzt, um spezifische Stoffwechselmuster im Gehirn zu identifizieren. Aufgrund der

hohen Kosten, der begrenzten Verfügbarkeit sowie der notwendigen spezialisierten Infrastruktur und Expertise ist der Einsatz dieser Verfahren in der klinischen Routine jedoch auf spezialisierte Zentren beschränkt. Außerdem wird die Genauigkeit der klinische PD-Diagnose auf ca. 80% geschätzt und selbst bei Anwendung strenger klinischer Diagnosekriterien weisen 10% der von Fachneurologen diagnostizierten Patienten alternative Pathologien auf. Hierzu zählen insbesondere der sekundäre Parkinsonismus (z.B. vaskulär oder medikamentös bedingt) sowie der essentielle Tremor [131, 132, 137].

Trotz der Identifizierung zahlreicher molekularer und biochemischer Kandidaten hat bisher kein Biomarker für die PD-Diagnostik Einzug in die klinische Routine gefunden. Ein zentraler Fokus der Forschung liegt auf dem α-Syn, da dessen Fehlfaltung und Aggregation zentrale pathologische Merkmale der PD darstellen. Die Übertragung dieser Erkenntnisse in die klinische Routine scheiterte bisher jedoch an der mangelnden Sensitivität und Spezifität der Messverfahren [132].

1.5 Oberflächenbasierte Fluoreszenz-Intensität-Verteilungs-Analyse (sFIDA)

Die derzeit verfügbaren Diagnosemethoden zur Identifizierung neurodegenerativer Erkrankungen, wie die neurologische Anamnese, invasive Biopsien des betroffenen Gewebes oder Bildgebungsmethoden, weisen häufig in Frühstadien der Erkrankung eine geringe Spezifität auf. Daher erfolgt die Diagnose in vielen Fällen erst in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung. Umso wichtiger ist es, genauere diagnostische Verfahren zu entwickeln, die einen frühzeitigen und präzisen Nachweis neurodegenerativer Erkrankungen anhand nicht- oder minimal-invasiv gewonnener biologischer Proben ermöglichen [138, 139].

Obwohl die neurodegenerativen Erkrankungen zum Teil unterschiedliche phänotypische Ausprägungen zeigen, weisen sie auf molekularer Ebene bedeutende Gemeinsamkeiten auf. Ein zentrales pathologisches Merkmal dieser Krankheiten ist die Aggregation spezifischer Proteine, die unter physiologischen Bedingungen löslich vorliegen und im Laufe des Krankheitsprozesses durch Selbstassemblierung fibrilläre Aggregate, sogenannte Amyloide bilden. Wie bereits in Kapitel 1.2 erläutert wurde, beinhaltet dieser Prozess die Entstehung löslicher oligomerer Zwischenstufen, die als besonders neurotoxisch gelten und eine zentrale Rolle in der Pathogenese einnehmen [139, 140]. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass krankheitsverursachende, amyloidogene Proteine auch in anderen Körperflüssigkeiten als CSF wie Urin, Speichel, Tränen, Blut oder Stuhl sowie in peripheren Geweben nachweisbar sind [63, 71, 73, 85, 141–143]. Das bioaktive, prionenähnliche Aggregations- und Ausbreitungsverhalten fehlgefalteter, amyloidartiger Proteine ermöglicht eine quantitative Analyse dieser Aggregate aus den genannten Körperflüssigkeiten [141, 144, 145]. Die Quantifizierung dieser pathologischen Proteinaggregate, insbesondere löslicher Oligomere,

gewinnt im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen zunehmend an Bedeutung für die Diagnostik.

Aufgrund ihrer geringen Konzentration in Körperflüssigkeiten erfordert ihre quantitative Analyse eine hohe Sensitivität sowie Spezifität. Die Polymorphie dieser löslichen Oligomere spielt dabei ebenfalls eine entscheidende Rolle bei den biochemischen Analysen, da sich die Oligomere in ihrem Molekulargewicht, ihrer Konformation und ihrer Dynamik stark unterscheiden können. Diese biophysikalischen Eigenschaften stehen in engem Zusammenhang mit der Toxizität und somit mit der Pathogenität der Oligomere oder Aggregate [109, 117, 140, 146–149].

Bei dem oberflächenbasierten Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungs-Analyse (engl.: *surface-based fluorescence intensity distribution analysis*, sFIDA)-Assay handelt es sich um eine analytische Methode, die zur spezifischen Quantifizierung von Proteinaggregaten mit klinischer Relevanz eingesetzt wird. Der sFIDA-Assay wurde ursprünglich zur Detektion von Prion-Aggregaten in Hirnhomogenaten und Liquor von Scrapie-infizierten Hamstern sowie von Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)-infizierten Rindern konzipiert [150–152]. Die Methode wurde später für die klinische Quantifizierung von Amyloiden in Körperflüssigkeiten neurodegenerativ erkrankter Patienten optimiert [153–155]. Der sFIDA-Assay ist ein vielversprechender biochemischer Ansatz zur sensitiven und hochspezifischen Detektion pathologischer Proteinaggregate, wie löslicher Oligomere, in Körperflüssigkeiten. Die sFIDA-Technologie eignet sich insbesondere für den Einsatz in der biomarkerbasierten Diagnostik.

Aufgrund ihrer komplexen Zusammensetzung und der niedrigen Biomarker-Konzentrationen stellt die Analyse von Körperflüssigkeiten eine besondere Herausforderung dar [141]. Diese Faktoren erfordern unterschiedliche präanalytische Aufbereitungsverfahren, wie die Homogenisierung der Proben, mehrstufige Zentrifugationsprozesse, eine Immunpräzipitation, die Probenverdünnung sowie weitere matrixspezifische Aufbereitungsmethoden, um störende Matrixeffekte weitgehend zu eliminieren und somit eine besonders sensitive Analytik zu gewährleisten [156].

1.5.1 Molekularbiologische Grundlagen des sFIDA-Assays

Das Funktionsprinzip dieses Assays basiert auf dem häufig verwendeten enzymgekoppelten Immunadsorptionsassay (engl.: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay,* ELISA) mit einem Sandwich-Aufbau, der mit hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie kombiniert wird (s. Abbildung 6). Hierbei werden die aufgenommenen Bilder digitalisiert und quantitativ analysiert. Dies ermöglicht die Detektion einzelner Partikel auf der Oberfläche mit einer Sensitivität bis auf Einzelmolekülebene [157, 158]. Im ersten Schritt des Assays wird ein Fänger-Antikörper (Capture-Antikörper) an der Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert, sodass der Ziel-Analyt an den Capture-Antikörper binden kann. Die Immobilisierung der Capture-Antikörper

kann entweder nicht-kovalent über die Fc-Region (engl.: *fragment crystallizable,* Fc) des Antikörpers an eine mit Protein A oder Protein G funktionalisierte Oberfläche oder mittels einer kovalenten Bindung an die Glasoberfläche erfolgen [151, 159–161]. Im Rahmen des hier beschriebenen Assays erfolgte die Immobilisierung der Capture-Antikörper durch Physisorption, bei der sich die Antikörper über physikalische Wechselwirkungen an die Oberfläche anlagern, ohne dass eine kovalente Bindung ausgebildet wird. Vor der Standard- oder Proben-Applikation erfolgt ein Blockierungsschritt mit einem Blockierungsmittel aus unspezifischen Proteinen oder Proteingemischen. Der Blocking-Schritt bewirkt die Sättigung freier, potenzieller Bindestellen, die vom Capture-Antikörper nicht abgedeckt wurden, um eine spätere unspezifische Bindung von Analyten oder Detektionsantikörpern an der Oberfläche zu vermeiden. Nach dem Blockierungsschritt erfolgt die Inkubation der Proben, bei der der zu untersuchende Analyt spezifisch an den Capture-Antikörper gebunden wird. Die restlichen Bestandteile der Probe, die nicht spezifisch an das Paratop des Capture-Antikörpers gebunden werden, werden mittels mehrerer Waschschritte entfernt. Zuletzt werden mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierte Antikörper (Detektionsantikörper) hinzugefügt, die ebenfalls gegen das gleiche oder ein überlappendes Epitop gerichtet sind. Der Capture-Antikörper bindet an ein einzelnes lineares Epitop des Analyten. Da dieses Epitop nun durch den Capture-Antikörper blockiert ist, ist eine weitere Bindung durch den sekundären Detektionsantikörper an Monomere nicht möglich. Ein messbares Signal entsteht, wenn Multimerstrukturen bzw. aggregierte Analyte mehrere Epitope gleichzeitig bereitstellen, an die sowohl der Capture- als auch der Detektionsantikörper binden können. Dies ermöglicht dem sFIDA-Assay eine spezifische Quantifizierung der Aggregate in den untersuchten Proben. Darüber hinaus kommt zur Erhöhung der Assay-Spezifität eine Kombination aus zwei Detektionsantikörpern zum Einsatz, die jeweils mit unterschiedlichen Farbstoffen konjugiert sind [162–164]. Hierbei werden nur die Analyten detektiert, die mindestens drei Bindestellen besitzen (eine Bindestelle für den Capture-Antikörper und zwei für die beiden Detektionsantikörper).

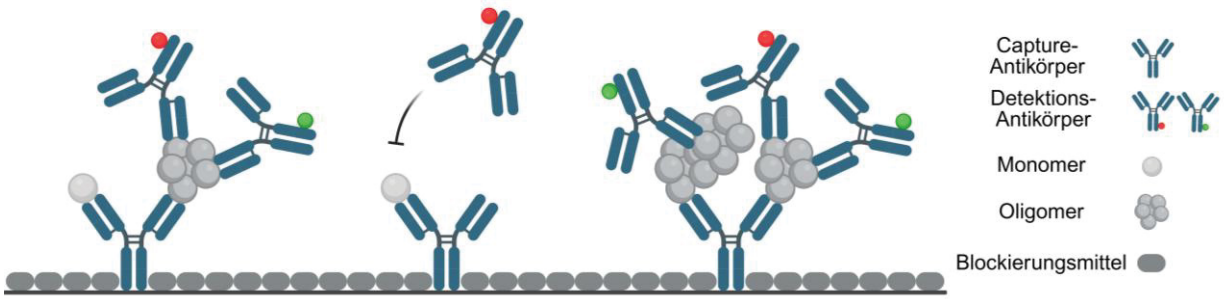


Abbildung 6: Funktionsprinzip des sFIDA-Assays zur Detektion von Proteinaggregaten
Die Oberfläche einer Mikrotiterplatte wird zunächst mit einem Capture-Antikörper beschichtet. Anschließend werden freie Bindungsstellen durch ein Blockierungsmittel gesättigt, um unspezifische Interaktionen mit der Probenlösung oder den Detektionsantikörpern zu verhindern. Nach der Inkubation mit den Proben binden sowohl die Monomere als auch aggregierte Proteine an die immobilisierten Capture-Antikörper. Im nächsten Schritt werden Detektionsantikörper eingesetzt, die mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind. Diese binden ausschließlich an aggregierte Analyten, da sie gegen dasselbe oder ein überlappendes Epitop wie der Capture-Antikörper gerichtet sind. Bei monomeren Proteinen ist dieses Epitop jedoch bereits durch den Capture-Antikörper blockiert, sodass keine weitere Bindung der Detektionsantikörper erfolgen kann. Um ungebundene Partikel zu entfernen, wird die Mikrotiterplatte zwischen jedem Assay-Schritt mit Puffer gewaschen. Nach der Markierung der gebundenen Proteinaggregate erfolgt die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie, wodurch einzelne Partikel detektiert werden. Für die Auswertung werden die Fluoreszenzsignale beider Farbstoffe herangezogen. *Erstellt mit BioRender.com*.

Die Oberfläche der Platte wird zuletzt mittels hochauflösender Zweikanalmikroskopie durch einen Laser angeregt. Die emittierten Fluoreszenzsignale werden in beiden Kanälen als Pixelintesitäten erfasst und anhand definierter Graustufenschwellenwerte ausgewertet. Je nach Assay-Design kann der Messwert auf dem Signal eines einzelnen Fluoreszenzkanals oder auf die Signale beider Kanäle beruhen. Der sFIDA-Readout ergibt sich aus der Kolokalisation der Signale beider Kanäle, wobei aus den räumlich überlappenden Pixeln gleich oder oberhalb der jeweiligen Intensitätsschwellenwerte erfasst werden. Sowohl der in den einzelnen Kanälen gemessene Pixel-Wert als auch der kolokalisierte sFIDA-Wert korrelieren mit der in der Probe vorhandenen Menge an Aggregaten, während eine Kolokalisation die Spezifität des Assays erhöht [155, 157, 162].

1.5.2 Kalibration des sFIDA-Assays

Wie bereits in Kapitel 1.2 erläutert, weisen die Proteinaggregate variierende physikochemische Eigenschaften auf. Die Standardisierung der Messungen von Proteinbiomarkern stellt aufgrund ihrer ausgeprägten strukturellen Heterogenität, einschließlich Fragmentierung, posttranslationaler Modifikationen, Aminosäurensubstitutionen sowie Variationen innerhalb der räumlichen Anordnung der Proteine, eine große Herausforderung dar [165]. Diese Faktoren erschweren die Auswahl eines reproduzierbaren und konsistenten Kalibrationsstandards. Zur Standardisierung des Assays werden synthetische oder immobilisierte Proteinaggregate verwendet, die die strukturellen Merkmale nativer Aggregate nachbilden. Zur Gewährleistung einer präzisen Quantifizierung des Analyten, der Validierung

der Assay-Nachweisgrenzen sowie einer hohen Reproduzierbarkeit des sFIDA-Assays wurden im Jahr 2016 von Hülsemann et al. proteinkonjugierte Silikananopartikel (SiNaPs) entwickelt [164, 166]. Die Herstellung von SiNaPs erfolgt durch die Synthese des Grundkörpers aus Siliziumoxid. Die Morphologie sowie die Größe der Partikel können während des Syntheseprozesses durch physikochemische Faktoren wie Temperatur, Lösungsmittel oder den pH-Wert beeinflusst werden [167]. Die SiNaPs-Oberfläche kann anschließend funktionalisiert und mit dem gewünschten Peptid oder Protein konjugiert werden [163, 166].
Die erhaltene Stammlösung der SiNaPs dient im sFIDA-Assay als Standard zur Quantifizierung der Aggregate. Durch die bekannte molare Konzentration der Verdünnungsreihe der SiNaPs-Stammlösung kann eine Rückrechnung auf die detektierte Analytenkonzentration erfolgen. Somit wird eine standardisierte quantitative Auswertung des sFIDA-Assays gewährleistet. Die analytische Sensitivität eines Assays wird über die Bestimmung der Detektionsgrenze (engl.: *limit of detection,* LOD) und der unteren Quantifizierungsgrenze (engl.: *lower limit of quantification,* LLOQ) definiert. Diese Grenzwerte beschreiben die jeweils niedrigste Konzentration eines Analyten, bei der der Assay diesen zuverlässig nachweisen und quantifizieren kann. LOD und LLOQ können abhängig von der Analyt-Konzentration sowie der Zusammensetzung der Matrix unterschiedlich berechnet werden. Im sFIDA-Assay erfolgt die Berechnung dieser Grenzwerte mithilfe der SiNaPs-Verdünnungsreihe. Dabei werden die LOD- und LLOQ-Werte anhand der Signalwerte der Pufferkontrolle (BC) sowie deren Standardabweichung berechnet [162, 166, 168, 169]. Da die Präzision eines Assays schwer zu quantifizieren ist, wird sie üblicherweise über ihr Gegenteil ausgedrückt. Als Maß hierfür dient der Variationskoeffizient (engl.: *coefficient of variation*, CV%), der die Streuung der Messwerte mehrerer Replikate desselben Analyten beschreibt und somit die Reproduzierbarkeit des Assays wiederspiegelt [169, 170].

1.5.3 Interne Totalreflektionsfluoreszenzmikroskope und konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Zur Detektion einzelner markierter Aggregate kann die sFIDA-Oberfläche mithilfe verschiedener Mikroskopietechniken, wie der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie oder der internen Totalreflektionsfluoreszenzmikroskopie (engl.: *Total internal reflection fluorescence microscopy*, TIRF-Mikroskopie), erfasst werden. Hierbei werden die mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Detektionsantikörper mit einem Laserstrahl angeregt. Diese Anregung bewirkt, dass die Fluorophore in einen energetisch höheren Zustand versetzt werden. Beim Relaxationsprozess kehren die Fluorophore in ihren Grundzustand zurück und emittieren dabei Licht mit einer längeren Wellenlänge [171]. Die Fluorophore werden gezielt so kombiniert, dass ihre Anregungs- und Emissionsspektren sich möglichst wenig überschneiden, wodurch eine unerwünschte Kreuzanregung vermieden wird.

Bei beiden Techniken wird der Laserstrahl an der Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes geleitet. Für den sFIDA-Assay bilden die Oberfläche der Mikrotiterplatte mit dem höheren Brechungsindex und die untersuchte wässrige Probenlösung mit dem niedrigeren Brechungsindex die relevanten optischen Medien. Bei der TIRF-Mikroskopie muss der Einfallswinkel des Laserstrahls größer sein als der kritische Winkel, sodass der Lichtstrahl an der Grenzfläche nicht in das zweite Medium eindringt, sondern vollständig intern reflektiert wird. Der reflektierte Strahl bleibt dabei im ersten Medium und verläuft im gleichen Winkel wie der Einfallswinkel. Dabei entsteht ein elektromagnetisches Feld an der Grenzfläche zur Probe, die sogenannte evaneszente Welle, die sich in die wässrige Lösung ausbreitet. Die Intensität der evaneszenten Welle nimmt mit dem Abstand zur Grenzfläche exponentiell ab. Aufgrund dessen werden lediglich die Fluorophore bis zu einer Eindringtiefe von ca. 200 nm vom Strahl angeregt [172–174]. Die Auflösung des TIRF-Mikroskops wird mittels eines Ölimmersionsobjektivs erhöht, da das Immersionsöl einen höheren Brechungsindex als Wasser oder Luft besitzt und dadurch das Licht weniger stark reflektiert wird [175].

Ein zentrales Prinzip der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie ist die epifluoreszente Anregung und Detektion. Das Anregungslicht wird über ein Objektiv auf die Probe fokussiert und das emittierte Fluoreszenzlicht wird über einen dichroitischen Spiegel (engl.: *dichroic mirror,* DM) geleitet und durch dasselbe Objektiv aufgefangen (s. Abbildung 7). Der DM sorgt für die Trennung von Anregungs- und Emissionslicht, sodass nur das langwellige Emissionslicht zum Detektor gelangt, während das Anregungslicht blockiert wird. Um die Auswahl geeigneter Anregungs- und Emissionswellenlängen zusätzlich zur wellenspezifischen Trennung durch den DM zu optimieren, werden ebenfalls Anregungs- und Emissionsfilter in den Strahlengang integriert. Das durch den DM geleitete Emissionslicht wird anschließend auf die Bildebene fokussiert und passiert eine kleine Öffnung (engl.: *Pinhole*), bevor es den Detektor, meist einen Photomultiplier (engl.: *Photomultiplier tube,* PMT), erreicht. Das Pinhole unterdrückt Fluoreszenzsignale aus außerhalb der Fokusebene liegenden Bereichen, sodass nur Licht aus der konfokalen Ebene detektiert wird. Dadurch entsteht ein optischer Schnitt mit erhöhter Auflösung und verbessertem Kontrast [176–178].

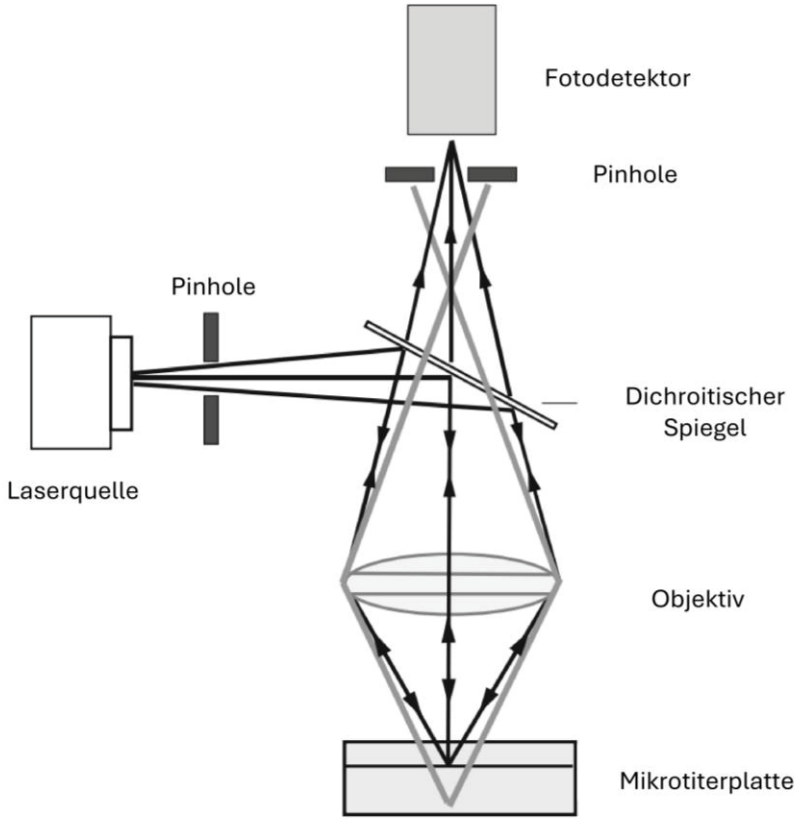


Abbildung 7: Schematischer Aufbau der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie für Einzelpartikel-Analyse
Der Laserstrahl gelangt über die Reflexion am DM und das Objektiv in die Probe, wo er die Farbstoffe in der gesamten angestrahlten Fläche anregt. Das emittierte Licht wird anschließend durch DM zurückgeleitet und auf ein *Pinhole* fokussiert. Diese kleine Öffnung dient als räumlicher Filter und lässt nur Licht aus der exakten Fokusebene zum Fotodetektor durch, wodurch Hintergrundsignale eliminiert werden. Abbildung modifiziert nach Mahlke, 2010 [178].

Die Aufnahmen werden entsprechend der Kamera und dem Objektiv des jeweils verwendeten Mikroskops mit verschiedenen Spezifikationen aufgenommen. Beim TIRF-Mikroskop werden die Aufnahmen mit insgesamt 1.000.000 Pixeln (1000 × 1000) erstellt, was einer Bildgröße von 113,76 µm × 113,76 µm entspricht. Hierbei werden eine 14-Bit-Kamera und ein invertiertes Ölimmersionsobjektiv mit einer 100-fachen Vergrößerung verwendet. Das konfokale Fluoreszenzmikroskop ist mit einer 16-Bit-Kamera ausgestattet. Die dabei aufgenommenen Bilder umfassen insgesamt 4.161.600 Pixel (2040 × 2040). Für die Messungen wird ein Wasserimmersionsobjektiv mit 40-facher Vergrößerung eingesetzt. Die Bildgröße dieser Aufnahmen beträgt 330 µm × 330 µm. Jedes Well der verwendeten Mikrotiterplatte besitzt eine Fläche von 10,9 mm^2. Die genannten Spezifikationen beziehen sich ausschließlich auf die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mikroskope und können je nach Gerät variieren. Die Aufnahmen, die mittels eines TIRF-Mikroskops erfasst werden, decken somit eine Gesamtwellfläche von ca. 3% und die konfokale Fluoreszenzmikroskop-

Aufnahmen decken ca. 25% der Gesamtwellfläche ab. Jede Probe wird in Vierfachbestimmung gemessen.

1.5.4 Datenaufnahme und -analyse

Die Analyse der aufgenommenen Bilder wird mithilfe der Software sFIDAta durchgeführt. Die Software sFIDAta verfügt über verschiedene Funktionen, um die Analyse möglichst objektiv und automatisch zu gestalten. Eine dieser Funktionen ist die automatische Artefakt-Detektion, um artefaktbehaftete Aufnahmen von der Auswertung auszuschließen. Die Auswertung der aufgenommenen Bilder erfolgt auf Pixelebene. Zur Reduktion des Einflusses von Hintergrundsignalen und zur Bestimmung der Abweichungen der absoluten Fluoreszenzintensitäten wird ein Intensitätsschwellenwert, der sogenannte *Cut-off*, basierend auf der BC festgelegt. Als *Cut-off* wird ein Graustufenwert definiert, der nur von einem zuvor festgelegten Prozentsatz der Pixel überschritten wird. Durch die Festlegung des *Cut-off*s werden ausschließlich jene Pixel in die Datenanalyse miteinbezogen, deren Intensität gleich oder höher ist als der entsprechende Grauwert der BC. Die Summe aller Pixel einer Aufnahme, die oberhalb dieses vorbestimmten *Cut-off*s liegen, wird für den jeweiligen Kanal als *Pixel-Count* bezeichnet. Wie bereits in Kapitel 1.5.1 beschrieben, erfolgt die Zweikanalanalyse durch die Auswertung der *Pixel-Count*s beider Kanäle. Der sFIDA-Readout entspricht der Summe aller kolokalisierten Pixel beider Kanäle, die sich an identischen Positionen befinden und deren Intensität eine gleiche bzw. höhere Intensität als der *Cut-off* aufweisen [155, 157].

Mithilfe des sFIDA-Readouts werden mehrere Störfaktoren wie Hintergrundrauschen oder Signale aufgrund unspezifischer Bindungen an der Plattenoberfläche eliminiert. Dies ermöglicht dem sFIDA-Assay eine höhere Sensitivität, wodurch eine bessere Differenzierung in den niedrigen Konzentrationen gewährleistet wird. Basierend auf den *Pixel-Count*s und sFIDA-Readouts der Einzelbilder der Quadruplikate werden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Aus den Ergebnissen der Analysen mittels der sFIDAta Software werden anschließend Excel-Dateien generiert, die für weitere Analysen der Daten zur Verfügung stehen.

1.6 Zielsetzung

Neurodegenerative Erkrankungen, primär repräsentiert durch AD und PD, sind pathophysiologisch durch die Fehlfaltung und Akkumulation amyloidogener Proteine, insbesondere wie Aβ, Tau und α-Syn sowie die daraus resultierende Neurodegeneration definiert. Angesicht weltweit steigender Prävalenzzahlen stellen sowohl die unzureichende Sensitivität aktueller Diagnostikverfahren als auch der Mangel an krankheitsmodifizierenden Therapien große medizinische Herausforderungen dar. In diesem Kontext rücken pathologische Oligomere als vielversprechende Biomarker für die Frühdiagnose in den Fokus. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die sFIDA-Technologie eine hochsensitive Quantifizierung dieser Aggregate in verschiedenen Körperflüssigkeiten ermöglicht.

Das Hauptziel dieser vorliegenden kumulativen Dissertation besteht primär in der Validierung der sFIDA-Technologie anhand klinischer Proben als hochsensitives Diagnoseverfahren zur Frühdiagnostik der AD auf Basis nicht-invasiv gewonnener Stuhlproben. Ein zentraler Fokus liegt dabei auf der Quantifizierung von fäkalen Aβ- und Tau-Aggregaten mittels der sFIDA-Technologie in der komplexen Stuhlmatrix. Die klinische Klassifizierung der Probanden erfolgte hierbei primär anhand etablierter CSF-Biomarker, die als Referenz fungieren. Durch die systematische Bestimmung der fäkalen Aβ- und Tau-Aggregatkonzentrationen in einem groß angelegten Patientenkollektiv (n = 206) sowie eine anschließende multivariable Analytik im Vergleich zu den CSF-Biomarkern wird die diagnostische Relevanz dieses Ansatzes evaluiert. Die Validierung an einer klinischen Kohorte, die verschiedene Krankheitsstadien abbildet, soll dabei aufzeigen, inwiefern die periphere Pathologie als komplementärer Indikator für die zentrale AD-Pathologie dienen kann. Hierbei soll gezeigt werden, dass die pathologischen Veränderungen nicht nur im ZNS stattfinden, sondern die periphere Pathophysiologie eine eigenständige Ebene der AD darstellen kann, die einen vielversprechenden Einblick in die systemische Regulation des Organismus bietet.

Über die primäre Zielsetzung dieser Dissertation hinaus werden im Rahmen assoziierter Forschungsprojekte weitere wissenschaftliche Fragestellungen beantwortet, die die Therapie sowie Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen erweitern. Hierzu zählen die Validierung der sFIDA-Analytik in weiteren nicht-invasiven Matrizen, insbesondere in Stuhl- und Urinproben von Patienten mit Synucleinopathien (iRBD und PD), sowie die begleitende Evaluation neuartiger krankheitsmodifizierender Therapieansätze gegen PD. Zudem tragen die Entwicklungen im Bereich chemischer Sonden dazu bei, die Diagnose neurodegenerativer Erkrankungen zu vervollständigen.

2 Manuskripte

2.1 Quantifizierung fäkaler Aβ- und Tau-Aggregate in humanen Stuhlproben

Titel	Detection of fecal Aβ and tau aggregates reveals a peripheral dimension of Alzheimer's disease proteinopathy
Autoren	**Pelin Özdüzenciler**, Laura Müller, Esra Kara, Maria-Christina Weber, Marlene Pils, Fabian Rehn, Oliver Bannach, Gereon R. Fink, Dieter Willbold, Michael T. Barbe, Özgür A. Onur, Gültekin Tamgüney
Journal	Eingereicht bei **Alzheimer's Research & Therapy** (Juli 2026)
Beitrag	**Eigener Anteil** ▪ Weiterentwicklung der sFIDA-Technologie für den Nachweis von Aβ- und Tau-Aggregaten in humanen Stuhlproben ▪ Koordinierung der Probensammlung, Transport und Biobanking ▪ Auswertung und Analyse der sFIDA-Daten ▪ Anfertigung der Abbildungen ▪ Diskussion der Ergebnisse ▪ Verfassen des Manuskripts
Ergänzende Informationen	**s. Anhang 5.1**
Druckgenehmigung	/

Detection of fecal Aβ and tau aggregates reveals a peripheral dimension of Alzheimer's disease proteinopathy

Pelin Özdüzenciler[1,2], Laura Müller[1,2], Esra Kara[3], Maria-Christina Weber[3], Marlene Pils[1,2], Fabian Rehn[1,2], Oliver Bannach[4], Gereon R. Fink[3,5], Dieter Willbold[1], Michael T. Barbe[3], Oezguer A. Onur[3,5], and Gültekin Tamgüney[1,2*]

[1] Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, 40225, Germany

[2] Institute of Biological Information Processing, Structural Biochemistry (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, Jülich, 52428, Germany

[3] Department of Neurology, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, Köln, 50923, Germany

[4] attyloid GmbH, Düsseldorf, 40225, Germany

[5] Cognitive Neuroscience, Institute of Neuroscience and Medicine (INM-3), Jülich Research Centre, Jülich, 52428, Germany

***Correspondence:**

Prof. Dr. Gültekin Tamgüney

Institute of Biological Information Processing, Structural Biochemistry (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, Wilhelm-Johnen-Straße, 52428 Jülich, Germany

E-Mail: e.tamgueney@fz-juelich.de

Phone.: +4915161324989

Fax: +492461612023

Abstract

INTRODUCTION: Aggregation of amyloid-β (Aβ) and tau is central to Alzheimer's disease (AD) pathogenesis. We previously demonstrated fecal Aβ aggregates. Here, we investigated whether fecal tau aggregates are detectable and whether combined fecal Aβ and tau quantification distinguishes cognitive impairment.

METHODS: Using sFIDA, a single-particle assay selective for aggregated species, we quantified fecal Aβ and tau aggregates in individuals with cognitive impairment and normal controls and evaluated their associations with CSF biomarkers and classification performance.

RESULTS: Tau aggregates were detectable in feces. Both Aβ and tau aggregate concentrations were elevated in cognitively impaired participants. In cross-validated logistic models, fecal tau aggregates showed stronger classification performance than fecal Aβ, and integration of fecal aggregates with demographic predictors achieved an AUC of 0.91 ± 0.06.

DISCUSSION: Fecal tau detection extends prior findings on fecal Aβ and supports stool-based aggregate quantification as a non-invasive biomarker candidate reflecting systemic aspects of AD-associated protein aggregation.

KEYWORDS

Alzheimer's disease, amyloid-β aggregates, tau aggregates, fecal biomarkers, non-invasive diagnostics, gut–brain axis, sFIDA

1 BACKGROUND

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia and represents a major global health burden.[1] Neuropathologically, AD is characterized by the accumulation of extracellular amyloid-β (Aβ) aggregates and intracellular tau pathology, leading to synaptic dysfunction, neuronal loss, and progressive cognitive decline.[2-5] Although these pathological processes originate in the central nervous system (CNS), increasing evidence suggests that protein aggregation associated with neurodegeneration may also be reflected in peripheral biological compartments. The introduction of biologically defined diagnostic frameworks, particularly the AT(N) classification system, has substantially refined the conceptualization of AD as a continuum defined by amyloid deposition (A), tau pathology (T), and neurodegeneration (N).[2, 6] Established cerebrospinal fluid (CSF) and positron emission tomography (PET) biomarkers now enable in vivo detection of these processes with high accuracy.[7-11] However, CSF sampling remains invasive, and PET imaging is costly and not universally accessible, highlighting the need for minimally invasive biomarkers that capture core aspects of AD-related proteinopathy.

Protein misfolding and aggregation are central to AD pathogenesis. While fibrillar plaques and neurofibrillary tangles define the neuropathological hallmarks of the disease, increasing evidence indicates that smaller soluble Aβ and tau aggregates, including oligomeric species, may be particularly neurotoxic and mechanistically linked to synaptic dysfunction and disease progression.[5, 12] Aggregate dynamics are influenced not only by production but also by clearance mechanisms. In addition to glymphatic and blood–brain barrier–mediated pathways, peripheral organs, including the liver, have been implicated in Aβ clearance and systemic elimination.[13-16] These observations raise the possibility that central proteopathic processes may be reflected in peripheral compartments.

Converging experimental and clinical evidence supports bidirectional communication between the gastrointestinal system and the CNS, commonly referred to as the gut–brain axis, involving

neural, immune, endocrine, and microbial signaling pathways.[17] Alterations in gut microbiota composition, intestinal permeability, and systemic inflammatory signaling have been reported in AD and in prodromal stages of the disease.[18-20] Microbial amyloids and metabolites may influence host protein aggregation and immune responses, supporting the concept of a gut–brain axis in neurodegeneration.[21] While several studies have examined microbiome composition in AD, comparatively little is known about intestinal or fecal Aβ and tau aggregates themselves. Initial reports demonstrated the presence of Aβ peptides in intestinal tissue and fecal material, and exploratory studies suggested increased fecal Aβ levels in AD.[22-26] However, these studies did not systematically assess aggregate species or relate intestinal findings to CSF-defined AT biomarker status.

We previously developed surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA), a microscopy-based single-particle detection platform enabling sub-femtomolar quantification of protein aggregates while minimizing monomer interference through epitope-overlapping antibody design.[27] Using sFIDA, we demonstrated the feasibility of detecting Aβ aggregates in human feces in a proof-of-concept cohort and established the utility of sFIDA for quantifying Aβ and tau aggregates in CSF, where aggregate concentrations are associated with clinical diagnosis and biomarker-defined AD.[22, 28, 29] Whether fecal aggregate burden replicates in larger biomarker-characterized cohorts, whether fecal tau aggregates are detectable in humans, and how intestinal aggregate signals relate to canonical CSF Aβ and tau biomarkers remain unresolved.

In the present study, we applied analytically validated sFIDA assays to quantify fecal Aβ and tau aggregates in a well-characterized cohort of patients with cognitive impairment and cognitively healthy controls. We examined associations with CSF $A\beta_{1–42}$, total tau, phosphorylated tau, and AT classification, and evaluated the incremental diagnostic performance of fecal aggregates beyond demographic variables. By integrating intestinal

aggregate quantification with established CSF biomarkers, we aimed to determine whether fecal protein aggregates represent a biologically informative and minimally invasive marker linked to central tau pathology.

2 METHODS

2.1 Study cohort and diagnostic classification

Participants were recruited at the Department of Neurology, University Hospital Cologne. Individuals without neurological disease, subjective cognitive complaints, evidence of neuropsychological deficits, or impairment in activities of daily living (ADL) were classified as cognitively healthy controls (HC). Patients presenting with cognitive decline were evaluated by an interdisciplinary team with expertise in dementia diagnosis. Clinical diagnoses were established according to National Institute on Aging–Alzheimer's Association (NIA-AA) criteria based on clinical evaluation and neuropsychological assessment.[30] Patients with cognitive impairment and preserved ADL were classified as having mild cognitive impairment (MCI), whereas those with impaired ADL were diagnosed with dementia. Individuals reporting subjective cognitive decline (SCD) but demonstrating normal performance on objective cognitive testing and preserved ADL were classified as having SCD. CSF and/or PET biomarker measurements were analyzed to determine AT biomarker status. If Functional Activities Questionnaire (FAQ) data were unavailable, functional status was determined based on structured clinical history and caregiver interview.

2.2 Neuropsychological and functional assessments

Global cognitive performance was assessed using the DemTect screening instrument (score range 0–18). Scores >12 were considered age-adjusted normal, 9–12 consistent with MCI, and <9 indicative of dementia.[31] Depressive symptoms were evaluated using the German version of

the Beck Depression Inventory II (BDI-II; score range 0–63), with established severity categories (minimal, mild, moderate, severe).[32] Subjective memory complaints were assessed using the Memory Assessment Clinic Questionnaire (MAC-Q, score range 7–35); scores >24 were considered clinically relevant.[33] Functional impairment was determined using the FAQ (score range 0–30), with scores >8 indicative of clinically relevant impairment and required for a diagnosis of dementia.[34]

2.3 CSF and PET biomarker assessment

To determine AD etiology, biomarker-based diagnostics were performed.[2] Biomarker classification followed the NIA-AA AT(N) framework. Amyloid positivity (A+) was defined by abnormal amyloid PET or cerebrospinal fluid (CSF) evidence of amyloid pathology based on validated assay-specific thresholds for $A\beta_{1–42}$, the $A\beta_{1–42}/A\beta_{1–40}$ ratio and/or a phosphorylated tau181 (p-tau181)/$A\beta_{1–42}$ ratio. Tau positivity (T+) was defined by elevated CSF p-tau181 and/or positive tau PET. Total tau was analyzed separately as a marker of neuronal injury and neurodegeneration (N). Prior to 2022, CSF biomarkers were quantified using commercially available enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA; Euroimmun AG; Fujirebio Europe N.V.). Amyloid positivity was defined as $A\beta_{1–42} < 630$ pg/mL or $A\beta_{1–42}/A\beta_{1–40}$ ratio ≤ 0.095. Elevated total tau was defined as > 452 pg/mL, and p-tau181 > 61 pg/mL was considered pathological. From 2022 onward, biomarkers were measured using automated electrochemiluminescence immunoassays (Elecsys, Roche Diagnostics) on a cobas e 801 analyzer. With these assays, amyloid positivity was defined as $A\beta_{1–42} \leq 1030$ pg/mL, total tau > 300 pg/mL, p-tau181 > 27 pg/mL, and/or a p-tau181/$A\beta_{1–42}$ ratio > 0.0230.

2.4 Assessment of gastrointestinal symptoms

Gastrointestinal symptoms were assessed using the Cleveland Clinic Constipation Scoring System (CCCSS). The CCCSS is an eight-item, patient-reported questionnaire evaluating

bowel movement frequency, difficulty of evacuation, sensation of incomplete evacuation, time spent per attempt, abdominal pain, use of assistance or laxatives, unsuccessful attempts, and duration of symptoms. Total scores range from 0 to 30, with higher scores indicating more severe constipation. The CCCSS was administered at the time of biological sample collection. For statistical analyses, the total score was treated as a continuous variable.[35]

2.5 Fecal sample collection and homogenization

Fecal samples were collected between September 2020 and November 2024 in polypropylene sample tubes with a screwcap-integrated spoon (megro, Wesel, Germany) and a paper-based collection aid (Med Auxil analysis aids, Seesen, Germany). Samples were aliquoted into polypropylene protein low-binding tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) for storage at −80 °C. For homogenization, 17 mg-samples were transferred to Simplix polypropylene tubes (Gaudlitz, Coburg, Germany) containing 1300 µL of homogenization buffer (20 mM Tris, 250 mM NaCl, pH 8.3; AppliChem, Darmstadt, Germany) supplemented with 1× cOmplete EDTA-free protease inhibitor and 1× PhosStop phosphatase inhibitor (Roche, Basel, Switzerland), 5% glycerol, 0.05% NaN_3 (AppliChem), and 1% bovine serum albumin (BSA, AppliChem). BSA was omitted from the buffer used for measurements of tau aggregates. Samples were homogenized using a vortex mixer for 10 min at room temperature, then transferred to 2 mL polypropylene low-binding tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) and centrifuged at 3000 × g for 5 min at 4 °C. The supernatants were subsequently transferred to 1.5 mL polypropylene low-binding tubes and stored at −80 °C until further use. Homogenates were diluted 1:5 in sample buffer containing phosphate-buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich), 0.05% Tween (AppliChem), 0.095% NaN_3, and 0.5% BSA for measuring Aβ aggregates, or in LowCross-Buffer (Candor, Wangen, Germany) for measuring tau aggregates.

2.6 sFIDA assay

The principle of sFIDA was reported previously.[22, 28, 36, 37] To capture Aβ or tau aggregates, a 384-well glass-bottom microplate (SensoPlate plus, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) was incubated with 2.5 µg/mL of monoclonal IC16 anti-Aβ antibody directed against amino acids 2−8 (kindly provided by Carsten Korth, Universitätsklinikum Düsseldorf, Germany), or Tau-12 anti-Tau antibody directed against amino acids 6−18 (Biolegend, San Diego, USA) in 0.1 M $NaHCO_3$ overnight at 4 °C.[38] Subsequently, the plates were washed five times with Tris-buffered saline (TBS; Serva, Duisburg, Germany) with 0.05% Tween 20 (TBS-T), and then five times with TBS. To block free binding sites, the wells were incubated for 1.5 h at room temperature with 0.5% BSA in TBS with 0.03% ProClin (TBS-ProClin; Sigma-Aldrich, Missouri, USA) for the detection of Aβ aggregates or with Blocking Solution (Candor, Wangen, Germany) for the detection of tau aggregates. Next, the wells underwent five washes with TBST and TBS. Silica nanoparticles (SiNaPs) coated with $Aβ_{1–15}$ or full-length tau functioned as a standard for protein quantification and were prepared as previously described and diluted in sample buffer or LowCross-Buffer, respectively.[22, 28, 39] Four replicates of 20 µL of each SiNaP dilution or of 1:5 diluted samples were added to the wells and incubated for 2 h at room temperature. Subsequently, the plate was washed five times with TBS. To detect Aβ and tau aggregates, the wells were incubated for 1 h with fluorescent IC16-CF633 and IC16-CF488A antibodies each at 0.625 µg/mL in TBS-T containing 0.1% BSA, or Tau-12-CF633 and Tau-12-CF488A antibodies, each at 0.156 µg/mL in TBS, respectively. Finally, the plate was washed five times with TBS and the buffer exchanged to TBS-ProClin for measurement. An automated microtiter plate washer (405 LS Microplate Washer, BioTek, VT, USA) carried out all washing steps.

Images were captured using an IN Cell Analyzer 6500HS (GE Healthcare, Freiburg, Germany) with a 40× objective through two-channel confocal fluorescence imaging. The first channel was excited at 642 nm, using an emission filter at 682.5/59 nm, with an exposure time set to 4 s. The second channel utilized an excitation wavelength of 488 nm, with an emission filter at 524.5/48 nm and an exposure time of 5 s. A total number of 25 images per well, each measuring 2040 × 2040 pixels, were captured for each channel. sFIDAta version 2.2.7 was utilized for the automated detection and elimination of images with artifacts, and for quantifying colocalized pixels in both channels (sFIDA readout).[40] To minimize background, a cutoff was established as the grey value at which 0.001% of all pixels in images of the buffer control were positive. Only pixels with grey values above the cutoff were analysed. The limit of detection (LOD) was defined as the sFIDA readout of the buffer control plus two standard deviations. A calibration curve was fitted using sFIDA readouts of dilutions of SiNaPs of known concentration and second order polynomial regression. This calibration curve was used to calculate a concentration for each sFIDA readout. The mean value and the standard deviation of the sFIDA readouts and the coefficient of variation (CV%) for each sample were calculated by the sFIDAta software based on the four replicates.

2.7 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 11) and RStudio (version 2024.12.1). Two-sided p-values < 0.05 were considered statistically significant. Continuous variables are presented as mean ± standard deviation (SD) or median with interquartile range (IQR), as appropriate. Group differences in fecal aggregate concentrations between cognitively healthy controls (HC) and patients with cognitive impairment were assessed using two-sided Mann-Whitney U tests due to non-normal distribution of aggregate concentrations. Effect sizes for pairwise comparisons were quantified using Cliff's δ. Global comparisons across CSF-

defined AT biomarker strata were performed using Kruskal–Wallis tests. Sensitivity analyses were conducted using an age-restricted control subset (≥60 years). For regression and visualization analyses, fecal aggregate concentrations were $\log_{10}$-transformed after addition of a small constant (0.01 fM) to avoid zero values. Associations between fecal aggregates and CSF biomarkers within the patient cohort were evaluated using linear regression, and coefficients of determination (R^2) are reported. Multivariable linear regression models were constructed to assess independent associations, including age, sex, and diagnostic category (AD vs non-AD) as covariates. For models evaluating patient–control differences, regression coefficients were exponentiated to derive adjusted fold-change estimates with 95% confidence intervals (CI). Classification performance was assessed using logistic regression with stratified 5-fold cross-validation. In each fold, models were trained on 80% of the data and evaluated on the remaining 20%, preserving class proportions. Continuous predictors were standardized within each training fold and applied to the corresponding test fold. Receiver operating characteristic (ROC) curves were generated from predicted probabilities, and mean area under the curve (AUC) ± standard deviation across folds was reported. Analyses were conducted using complete-case data without imputation.

3 RESULTS

3.1 Study cohort

The study included 206 participants comprising 101 patients with cognitive impairment and 105 cognitively healthy controls (HC) (Table 1). Patients ranged from 48 to 92 years of age at sample collection (mean ± SD: 70.6 ± 8.8 years) and 55.4% were female. HC ranged from 18 to 83 years of age (52.9 ± 18.2 years), with 60.0% females. Among patients, 16 individuals (15.8%) were diagnosed with a clinical syndrome with dementia, 82 (81.2%) with mild cognitive impairment (MCI), and three (3.0%) with subjective cognitive decline (SCD). Across all syndromes, 65 patients were diagnosed with Alzheimer's disease (AD). Diagnoses were

established by clinical expertise using standardized neuropsychological assessments and biomarker-supported criteria, including CSF measurements of $A\beta_{1–42}$, $A\beta_{1–40}$, total tau, phosphorylated tau181 (p-tau181), PET imaging of amyloid and tau pathology when available, and cognitive and functional assessments (DemTect, BDI-II, MAC-Q, FAQ) (Table S1). Patients were older than HC on average, necessitating age-adjusted and age-restricted sensitivity analyses (see below). As expected, patients showed impaired cognitive performance (DemTect) and increased functional impairment (FAQ) (Table 1). Constipation severity, assessed using the Cleveland Clinic Constipation Scoring System (CCCSS), was recorded in both patients and controls and showed comparable mean values between the overall patient cohort (2.2 ± 2.9) and HC (2.5 ± 3.3) (Table 1). This measure was included given the potential relevance of gastrointestinal function for fecal biomarker interpretation. Within the patient cohort, individuals were stratified according to CSF- and/or PET-derived AT status into A(−)T(−), A(+)T(−), A(−)T(+), and A(+)T(+) groups based on CSF Aβ and phosphorylated tau measurements or PET results (Table S1), enabling evaluation of fecal aggregate concentrations relative to canonical amyloid and tau biomarker classification.

3.2 Fecal protein aggregates are elevated in cognitive impairment

Fecal Aβ and tau aggregate concentrations were significantly elevated in patients with cognitive impairment (Dementia/MCI/SCD) compared with cognitively healthy controls (HC). Patients (n = 101) exhibited a median fecal Aβ concentration of 5.90 fM (IQR 2.30–11.30) vs 2.00 fM (0.60–6.50) in HC (n = 105; Mann-Whitney U $p = 4.3 \times 10^{-6}$; Cliff's $\delta = 0.37$, moderate effect size) (Figure 1A). For fecal tau aggregates, patients (n = 100) showed a median concentration of 77.85 fM (46.90–152.43) compared with 25.50 fM (11.85–59.77) in HC (n = 104; $p = 1.4 \times 10^{-12}$; Cliff's $\delta = 0.57$, large effect size) (Figure 1B). To address potential age confounding, analyses were repeated using an age-restricted control subset (≥60 years, n = 48), increasing the mean age of controls from 52.9 to 68.4 years and substantially reducing the age difference

relative to patients (70.6 years) (Figure S1). Group differences remained significant for both fecal Aβ ($p = 9.4 \times 10^{-7}$; Cliff's $\delta = 0.50$, large effect size) and fecal tau ($p = 1.6 \times 10^{-7}$; Cliff's $\delta = 0.53$, large effect size). The persistence of these effects in the age-restricted analysis supports an age-independent association between fecal aggregate burden and cognitive impairment.

3.3 Demographic-adjusted associations

In linear regression models on $\log_{10}$-transformed fecal concentrations including age and sex as covariates, patient status remained independently associated with elevated fecal aggregates (Figure S2). Patients had 4.13-fold higher adjusted fecal Aβ concentrations (95% CI 2.49–6.85, $p = 1.07 \times 10^{-7}$) and 2.97-fold higher fecal tau concentrations (95% CI 2.10–4.21, $p = 3.41 \times 10^{-9}$) compared with HC.

3.4 Elevation persists in AT biomarker–negative patients

Importantly, fecal aggregate elevations were observed even in biomarker-negative patients (A(−)T(−), n = 32). In this subgroup, fecal Aβ aggregates were 8.05 fM (3.62–12.88), significantly higher than 2.00 (0.60–6.50) fM in HC ($p = 4.2 \times 10^{-5}$; Cliff's $\delta = 0.48$) (Figure 2A). Fecal tau aggregates were likewise elevated with 85.45 fM (47.73–203.22) vs 25.50 (11.85–59.77) fM in HC ($p = 2.6 \times 10^{-7}$; Cliff's $\delta = 0.60$) (Figure 2B). Across AT strata, global differences were significant for both fecal Aβ and fecal tau (Kruskal–Wallis $p < 0.001$). These findings indicate that fecal aggregate burden is not restricted to canonical AT-positive individuals and may reflect a proteopathic axis partially independent of CSF-defined amyloid and tau pathology in patients with cognitive deficits.

3.5 Associations with CSF biomarkers

Within the patient cohort, $\log_{10}$-transformed fecal Aβ aggregate concentrations showed inverse associations with CSF tau markers. Significant negative associations were observed with CSF p-tau181 ($R^2 = 0.15$, $p < 0.0001$, $n = 99$) in univariable linear regression analyses (Figure 3A) and the p-tau181/$A\beta_{1–42}$ ratio ($R^2 = 0.13$, $p = 0.0002$, $n = 99$) (Figure 3B). A weaker but still significant inverse association was detected with CSF total tau ($R^2 = 0.11$, $p = 0.001$, $n = 99$) (Figure S3). In multivariable linear regression models adjusting for age, sex, and clinical AD diagnosis (AD vs non-AD), CSF p-tau181 remained an independent negative predictor of $\log_{10}$-transformed fecal Aβ concentrations ($\beta = -0.0054$ per pg/mL, $p < 0.001$, $n = 99$). These findings indicate that fecal Aβ aggregate burden is inversely associated with CSF tau biomarkers, particularly phosphorylated tau, independent of demographic factors and clinical AD status.

3.6 Classification performance

Logistic regression analyses were performed in the study cohort ($n = 206$) to evaluate the association of demographic variables and fecal aggregate measures with cognitive impairment (Figure 4). In univariable models, increasing age and higher fecal tau aggregate concentrations were positively associated with patient status, whereas fecal Aβ showed a weaker association. In multivariable logistic regression models including age, sex, $\log_{10}$-transformed fecal tau, and $\log_{10}$-transformed fecal Aβ concentrations, both fecal tau and fecal Aβ remained independently associated with cognitive impairment, with fecal tau showing the strongest effect. Multivariable models were based on complete cases ($n = 203$).

To evaluate classification performance, stratified 5-fold cross-validated logistic regression models were constructed. Among models using fecal biomarkers alone, $\log_{10}$-transformed fecal tau aggregates achieved an area under the receiver operating characteristic curve (AUC) of 0.80 ± 0.05, outperforming fecal Aβ (AUC 0.68 ± 0.04) (Figure 5; Table S2). A combined fecal Aβ

+ tau model achieved an AUC of 0.83 ± 0.05. Demographic variables alone (age and sex) yielded an AUC of 0.80 ± 0.06, whereas integration of fecal aggregates with demographic predictors increased discrimination to an AUC of 0.91 ± 0.06, indicating substantial incremental diagnostic value beyond demographic variables.

4 DISCUSSION

AD is increasingly conceptualized as a systemic disorder characterized by dynamic interactions between central proteopathic processes and peripheral biological pathways.[5, 13, 14] In this study, we demonstrate that aggregates of both Aβ and tau are detectable in human fecal samples and that their concentrations are significantly elevated in individuals with cognitive impairment compared with cognitively healthy controls. These findings extend the emerging concept that pathological protein aggregation associated with AD is not confined to the CNS but can also be detected in peripheral biological compartments. Importantly, these differences remained robust after adjustment for demographic variables and after restricting analyses to age-matched controls, indicating that the observed signal cannot be explained by age differences alone. The detection of fecal tau aggregates represents a substantial extension of previous work on stool-based Aβ detection and suggests that multiple classes of disease-associated aggregates can be quantified in fecal material.[22, 23, 26, 40]

Our earlier proof-of-concept study reported elevated fecal Aβ aggregates in AD using sFIDA.[22] The present data extend this concept in three important ways. First, we show that tau aggregates are detectable in feces and elevated in cognitive impairment, broadening the biological scope from amyloid alone to the two core aggregate classes that define AD pathology. Second, combining fecal Aβ and fecal tau improves discrimination relative to single markers, consistent with the general principle that multi-analyte aggregate profiling often outperforms individual biomarkers. Third, fecal aggregate elevations were observed even in individuals without CSF-

defined AT biomarker positivity, indicating that stool-based aggregate measurements may capture aspects of systemic proteopathic biology that are not fully reflected by canonical central biomarkers. These findings are conceptually aligned with previous applications of sFIDA in biofluids, where quantitative aggregate measurements have proven informative across several neurodegenerative proteinopathies.[28, 29, 40-42]

Our findings support the concept that protein aggregation associated with neurodegenerative disease is not confined to the CNS but may also be reflected in peripheral compartments.[26] Increasing evidence indicates that clearance of Aβ involves a network of processes that include glymphatic drainage, blood–brain barrier transport, and peripheral elimination mechanisms.[13] In particular, hepatobiliary pathways have been implicated in the systemic clearance of circulating Aβ, with the liver acting as a major site of uptake and degradation before secretion into bile and subsequent intestinal elimination.[16] These mechanisms provide a biologically plausible framework through which aggregated proteins may enter peripheral elimination pathways and ultimately become detectable in fecal material. Although the precise origin of fecal aggregates cannot be determined from the present data, both hepatobiliary clearance of circulating aggregates and local processes within the enteric nervous system may contribute to their appearance in stool.[23, 24]

A notable observation in this study is that fecal aggregate elevations were not restricted to individuals with CSF-defined AT positivity. Elevated fecal Aβ and tau concentrations were also detected in the A(−)T(−) subgroup, indicating that stool aggregate burden is not simply a downstream reflection of canonical amyloid and tau biomarkers measured in CSF. One interpretation is that fecal aggregates capture systemic proteopathic dynamics that extend beyond the central AT cascade. Peripheral handling of aggregated proteins may vary between individuals depending on metabolic, inflammatory, and gastrointestinal factors. Importantly,

clinical cohorts of cognitively impaired individuals frequently include heterogeneous or mixed underlying pathologies, and AT-negative patients may represent early disease stages or non-AD proteinopathies that are not captured by CSF Aβ and tau biomarkers alone.[2, 4, 8, 9, 43, 44] The persistence of fecal aggregate elevations in these subgroups therefore suggests that stool-based aggregate measurements may represent a complementary biological dimension rather than a direct surrogate for CNS biomarker status.

The inverse association observed between fecal Aβ aggregates and CSF tau measures represents an additional indication that fecal aggregates reflect biological processes distinct from those captured by central biomarkers. CSF phosphorylated tau and total tau are widely interpreted as indicators of neuronal injury and tau pathology and increase with disease progression along the AD continuum.[2, 3, 8, 9, 45, 46] Although the strength of these associations is moderate ($R^2 \approx 0.11–0.15$), the consistency across multiple tau-related biomarkers suggests that fecal aggregate signals capture biological information that is not redundant with established CSF markers. In contrast, fecal aggregates may reflect systemic elimination or redistribution processes operating outside the CNS. One possible explanation is that fecal aggregates reflect peripheral handling or elimination processes that may vary across disease stages. Under such a model, increasing central tau pathology could coincide with altered peripheral distribution or clearance of aggregated species, resulting in the inverse association observed between fecal Aβ aggregates and CSF tau measures. Alternatively, fecal aggregate concentrations may be influenced by gastrointestinal physiology, including intestinal transit time, bile secretion, microbial protease activity, and stool matrix composition. Such factors could modulate the stability or detectability of aggregated proteins within the intestinal lumen and may therefore contribute to fecal aggregate variability independent of central pathology. Although constipation severity measured by the CCCSS did not differ between groups in this cohort (Table 1), this metric provides only a coarse assessment of gastrointestinal function and does not capture additional

biological factors such as bile acid metabolism or microbiome composition that may influence intestinal aggregate levels.[47-49]

These findings intersect with growing interest in the gut–brain axis in neurodegenerative disease.[17, 47] Bidirectional communication between the gastrointestinal tract and the CNS occurs through neural, immune, endocrine, and microbial pathways, and alterations in gut microbiota composition, intestinal barrier function, and systemic inflammation have been reported in AD and prodromal disease stages.[18-20] Although microbiome composition was not examined in the present study, the detection of disease-associated protein aggregates in stool adds a complementary molecular dimension to this emerging field. Stool aggregate measurements may therefore provide a means of linking gastrointestinal biology with systemic proteostasis and neurodegenerative pathology.

From a translational perspective, the diagnostic analyses highlight both the potential and current limitations of stool-based aggregate biomarkers. Fecal tau aggregates showed stronger discriminatory performance than fecal Aβ alone, and combining both markers further improved classification accuracy. The strongest performance was observed when fecal aggregates were integrated with demographic predictors, suggesting that stool aggregate measurements provide incremental diagnostic information within multimodal biomarker frameworks.[2] In clinical settings, such markers may be most useful as minimally invasive screening tools that help identify individuals who would benefit from confirmatory CSF or imaging-based diagnostics.[8, 50] However, the observed overlap between groups indicates that stool-based aggregate measurements are unlikely to replace established biomarkers but may instead complement existing CSF and imaging approaches.

Several aspects of the study strengthen the interpretation of these findings. The sFIDA platform allows highly selective detection of aggregated protein species while minimizing interference from monomeric peptides, enabling quantification of aggregates at sub-femtomolar concentrations.[27] The integration of stool-based measurements with CSF biomarker data and AT classification also provides a direct comparison with established biological definitions of AD. Furthermore, the persistence of group differences after demographic adjustment and age-restricted analyses supports the robustness of the observed associations.

At the same time, several considerations should be acknowledged. Stool biomarkers are inherently influenced by pre-analytical variables, including diet, medications, microbial composition, and sample handling, and standardized protocols will be essential for future multi-center validation studies.[51-54] In addition, the clinical cohort included heterogeneous cognitive diagnoses, which may contribute biological variability but also reflects the complexity of real-world patient populations. Finally, the mechanistic relationship between central aggregate pathology and fecal aggregate concentrations remains to be fully elucidated and will require further investigation.

Future studies should therefore validate these findings in independent cohorts and determine whether fecal aggregates change longitudinally across the AD continuum or in response to disease-modifying therapies. Integrating stool aggregate measurements with systemic markers—including liver function parameters, bile acid profiles, and microbiome composition—may further clarify the biological pathways linking peripheral aggregate handling with central neurodegenerative processes.

In conclusion, this study demonstrates that both Aβ and tau aggregates can be quantified in human fecal samples and that their concentrations are significantly elevated in individuals with

cognitive impairment. The detection of fecal tau aggregates extends previous observations on fecal Aβ and indicates that multiple classes of disease-associated protein aggregates can be measured in stool using single-particle assays.[22] The persistence of elevated fecal aggregates after demographic adjustment and in age-restricted analyses, together with their presence in AT biomarker-negative patients, suggests that fecal aggregate burden reflects systemic aspects of proteopathic biology that are not fully captured by CSF-defined amyloid and tau biomarkers. The observed inverse associations between fecal Aβ aggregates and CSF tau measures further support the notion that intestinal aggregate signals may relate to peripheral clearance or redistribution processes operating alongside central neurodegeneration. Collectively, these findings identify stool-based aggregate quantification as a promising minimally invasive approach for capturing the systemic dimension of protein aggregation in AD. With independent validation, longitudinal studies, and integration with established biomarkers, fecal aggregate measurements may contribute to scalable multi-modal biomarker strategies for patient stratification and disease monitoring.

REFERENCES

1. 2025 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 2025;21:e70235. doi: https://doi.org/10.1002/alz.70235

2. Jack CR, Jr., Bennett DA, Blennow K, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018;14:535-62. doi: 10.1016/j.jalz.2018.02.018

3. Jack CR, Jr., Knopman DS, Jagust WJ, et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol*. 2013;12:207-16. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70291-0

4. Dubois B, Villain N, Frisoni GB, et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: recommendations of the International Working Group. *Lancet Neurol*. 2021;20:484-96. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00066-1

5. Hampel H, Hardy J, Blennow K, et al. The Amyloid-beta Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry*. 2021;26:5481-503. doi: 10.1038/s41380-021-01249-0

6. Jack CR, Jr., Bennett DA, Blennow K, et al. A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. *Neurology*. 2016;87:539-47. doi: 10.1212/WNL.0000000000002923

7. Jack CR, Jr., Andrews JS, Beach TG, et al. Revised criteria for diagnosis and staging of Alzheimer's disease: Alzheimer's Association Workgroup. *Alzheimers Dement*. 2024;20:5143-69. doi: 10.1002/alz.13859

8. Hansson O, Seibyl J, Stomrud E, et al. CSF biomarkers of Alzheimer's disease concord with amyloid-beta PET and predict clinical progression: A study of fully automated immunoassays in BioFINDER and ADNI cohorts. *Alzheimers Dement*. 2018;14:1470-81. doi: 10.1016/j.jalz.2018.01.010

9. Palmqvist S, Insel PS, Stomrud E, et al. Cerebrospinal fluid and plasma biomarker trajectories with increasing amyloid deposition in Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med*. 2019;11:e11170. doi: 10.15252/emmm.201911170

10. Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, et al. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2021;397:1577-90. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4

11. Blennow K, Zetterberg H. Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. *J Intern Med*. 2018;284:643-63. doi: 10.1111/joim.12816

12. Kulenkampff K, Wolf Perez AM, Sormanni P, et al. Quantifying misfolded protein oligomers as drug targets and biomarkers in Alzheimer and Parkinson diseases. *Nat Rev Chem*. 2021;5:277-94. doi: 10.1038/s41570-021-00254-9

13. Wang J, Gu BJ, Masters CL, Wang YJ. A systemic view of Alzheimer disease - insights from amyloid-beta metabolism beyond the brain. *Nature reviews Neurology*. 2017;13:612-23. doi: 10.1038/nrneurol.2017.111

14. Cheng Y, Tian DY, Wang YJ. Peripheral clearance of brain-derived Abeta in Alzheimer's disease: pathophysiology and therapeutic perspectives. *Transl Neurodegener*. 2020;9:16. doi: 10.1186/s40035-020-00195-1

15. Ullah R, Park TJ, Huang X, Kim MO. Abnormal amyloid beta metabolism in systemic abnormalities and Alzheimer's pathology: Insights and therapeutic approaches from periphery. *Ageing Res Rev*. 2021;71:101451. doi: 10.1016/j.arr.2021.101451

16. Cheng Y, He CY, Tian DY, et al. Physiological beta-amyloid clearance by the liver and its therapeutic potential for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2023;145:717-31. doi: 10.1007/s00401-023-02559-z

17. Loh JS, Mak WQ, Tan LKS, et al. Microbiota-gut-brain axis and its therapeutic applications in neurodegenerative diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9:37. doi: 10.1038/s41392-024-01743-1

18. Kowalski K, Mulak A. Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease. *J Neurogastroenterol Motil*. 2019;25:48-60. doi: 10.5056/jnm18087

19. Warren A, Wynia Z, Corr PG, et al. The microbiota-gut-brain axis in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a scoping review of human studies. *Alzheimers Dement*. 2026;22:e71023. doi: 10.1002/alz.71023

20. Ferreiro AL, Choi J, Ryou J, et al. Gut microbiome composition may be an indicator of preclinical Alzheimer's disease. *Sci Transl Med*. 2023;15:eabo2984. doi: 10.1126/scitranslmed.abo2984

21. Friedland RP, Chapman MR. The role of microbial amyloid in neurodegeneration. *PLoS Pathog*. 2017;13:e1006654. doi: 10.1371/journal.ppat.1006654

22. Pils M, Dybala A, Schaffrath A, et al. Elevated Abeta aggregates in feces from Alzheimer's disease patients: a proof-of-concept study. *Alzheimer's research & therapy*. 2024;16:223. doi: 10.1186/s13195-024-01597-3

23. Pellegrini C, Daniele S, Antonioli L, et al. Prodromal Intestinal Events in Alzheimer's Disease (AD): Colonic Dysmotility and Inflammation Are Associated with Enteric AD-Related Protein Deposition. *Int J Mol Sci*. 2020;21. doi: 10.3390/ijms21103523

24. Manocha GD, Floden AM, Miller NM, et al. Temporal progression of Alzheimer's disease in brains and intestines of transgenic mice. *Neurobiology of aging*. 2019;81:166-76. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.05.025

25. Puig KL, Lutz BM, Urquhart SA, et al. Overexpression of mutant amyloid-beta protein precursor and presenilin 1 modulates enteric nervous system. *J Alzheimers Dis*. 2015;44:1263-78. doi: 10.3233/JAD-142259

26. Joachim CL, Mori H, Selkoe DJ. Amyloid beta-protein deposition in tissues other than brain in Alzheimer's disease. *Nature*. 1989;341:226-30. doi: 10.1038/341226a0

27. Kulawik A, Heise H, Zafiu C, et al. Advancements of the sFIDA method for oligomer-based diagnostics of neurodegenerative diseases. *FEBS letters*. 2018;592:516-34. doi: 10.1002/1873-3468.12983

28. Blömeke L, Pils M, Kraemer-Schulien V, et al. Quantitative detection of alpha-Synuclein and Tau oligomers and other aggregates by digital single particle counting. *NPJ Parkinsons Dis*. 2022;8:68. doi: 10.1038/s41531-022-00330-x

29. Blömeke L, Rehn F, Kraemer-Schulien V, et al. Abeta oligomers peak in early stages of Alzheimer's disease preceding tau pathology. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2024;16:e12589. doi: 10.1002/dad2.12589

30. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7:270-9. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.008

31. Kalbe E, Kessler J, Calabrese P, et al. DemTect: a new, sensitive cognitive screening test to support the diagnosis of mild cognitive impairment and early dementia. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2004;19:136-43. doi: 10.1002/gps.1042

32. Beck AT, Steer RA, Ball R, Ranieri W. Comparison of Beck Depression Inventories -IA and -II in psychiatric outpatients. *J Pers Assess*. 1996;67:588-97. doi: 10.1207/s15327752jpa6703_13

33. Crook TH, 3rd, Feher EP, Larrabee GJ. Assessment of memory complaint in age-associated memory impairment: the MAC-Q. *Int Psychogeriatr*. 1992;4:165-76. doi: 10.1017/s1041610292000991

34. Pfeffer RI, Kurosaki TT, Harrah CH, Jr., et al. Measurement of functional activities in older adults in the community. *J Gerontol*. 1982;37:323-9. doi: 10.1093/geronj/37.3.323

35. Agachan F, Chen T, Pfeifer J, et al. A constipation scoring system to simplify evaluation and management of constipated patients. *Dis Colon Rectum*. 1996;39:681-5. doi: 10.1007/BF02056950

36. Herrmann Y, Kulawik A, Kuhbach K, et al. sFIDA automation yields sub-femtomolar limit of detection for Abeta aggregates in body fluids. *Clin Biochem*. 2017;50:244-7. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.11.001

37. Hulsemann M, Zafiu C, Kuhbach K, et al. Biofunctionalized Silica Nanoparticles: Standards in Amyloid-beta Oligomer-Based Diagnosis of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2016;54:79-88. doi: 10.3233/JAD-160253

38. Dornieden S, Muller-Schiffmann A, Sticht H, et al. Characterization of a single-chain variable fragment recognizing a linear epitope of abeta: a biotechnical tool for studies on Alzheimer's disease? *PLoS One*. 2013;8:e59820. doi: 10.1371/journal.pone.0059820

39. Herrmann Y, Bujnicki T, Zafiu C, et al. Nanoparticle standards for immuno-based quantitation of alpha-synuclein oligomers in diagnostics of Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Clin Chim Acta*. 2017;466:152-9. doi: 10.1016/j.cca.2017.01.010

40. Schaffrath A, Schleyken S, Seger A, et al. Patients with isolated REM-sleep behavior disorder have elevated levels of alpha-synuclein aggregates in stool. *NPJ Parkinsons Dis*. 2023;9:14. doi: 10.1038/s41531-023-00458-4

41. Müller L, Özdüzenciler P, Schedlich-Teufer C, et al. Elevated alpha-Synuclein Aggregate Levels in the Urine of Patients with Isolated REM Sleep Behavior Disorder and Parkinson's Disease. *Ann Neurol*. 2025. doi: 10.1002/ana.27250

42. Blömeke L, Rehn F, Pils M, et al. Blood-based quantification of Abeta oligomers indicates impaired clearance from brain in ApoE epsilon4 positive subjects. *Commun Med (Lond)*. 2024;4:262. doi: 10.1038/s43856-024-00690-w

43. Ossenkoppele R, Jansen WJ, Rabinovici GD, et al. Prevalence of amyloid PET positivity in dementia syndromes: a meta-analysis. *JAMA*. 2015;313:1939-49. doi: 10.1001/jama.2015.4669

44. Schneider JA, Arvanitakis Z, Bang W, Bennett DA. Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. *Neurology*. 2007;69:2197-204. doi: 10.1212/01.wnl.0000271090.28148.24

45. Thijssen EH, La Joie R, Wolf A, et al. Diagnostic value of plasma phosphorylated tau181 in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration. *Nat Med*. 2020;26:387-97. doi: 10.1038/s41591-020-0762-2

46. Barthelemy NR, Horie K, Sato C, Bateman RJ. Blood plasma phosphorylated-tau isoforms track CNS change in Alzheimer's disease. *J Exp Med*. 2020;217. doi: 10.1084/jem.20200861

47. Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, et al. The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev*. 2019;99:1877-2013. doi: 10.1152/physrev.00018.2018

48. Nho K, Kueider-Paisley A, MahmoudianDehkordi S, et al. Altered bile acid profile in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Relationship to neuroimaging and CSF biomarkers. *Alzheimers Dement*. 2019;15:232-44. doi: 10.1016/j.jalz.2018.08.012

49. Vogt NM, Kerby RL, Dill-McFarland KA, et al. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 2017;7:13537. doi: 10.1038/s41598-017-13601-y

50. Palmqvist S, Janelidze S, Stomrud E, et al. Performance of Fully Automated Plasma Assays as Screening Tests for Alzheimer Disease-Related beta-Amyloid Status. *JAMA Neurol*. 2019;76:1060-9. doi: 10.1001/jamaneurol.2019.1632

51. Sinha R, Abu-Ali G, Vogtmann E, et al. Assessment of variation in microbial community amplicon sequencing by the Microbiome Quality Control (MBQC) project consortium. *Nature biotechnology*. 2017;35:1077-86. doi: 10.1038/nbt.3981

52. Costea PI, Zeller G, Sunagawa S, et al. Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nature biotechnology*. 2017;35:1069-76. doi: 10.1038/nbt.3960

53. Zmora N, Suez J, Elinav E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16:35-56. doi: 10.1038/s41575-018-0061-2

54. Maier L, Pruteanu M, Kuhn M, et al. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature*. 2018;555:623-8. doi: 10.1038/nature25979

ACKNOWLEDEMENTS

The authors thank the study participants and their families for their participation. GT was supported by the Förderstiftung Dierichs and the Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. Selbsthilfe Demenz (DalzG). OAO and GRF were supported by the Marga and Walter Boll Foundation. The authors thank Carsten Korth (Institute of Neuropathology, Universitätsklinikum Düsseldorf) for providing the IC16 antibody and Volker Nischwitz (Central Institute for Engineering, Electronics and Analytics, Analytics (ZEA-3), Forschungszentrum Jülich) for determining the silicon concentration of the used Aβ-coated SiNaPs.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

DW and OB are co-founders and shareholders of attyloid, a for-profit company, with OB, MP, and FR also serving as employees. Additionally, DW is a member of attyloid's supervisory board. MP, OB, DW and GT are inventors of patent DE102020114278A1 (determination of disease-specific protein aggregates in fecal samples). The remaining authors declare no conflicts of interest.

CONSENT STATEMENT

This study was approved by the Ethics Commission of the Faculty of Medicine of the University of Cologne, and was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments (19-1644). All participants or their caregivers provided written informed consent.

2.2 Quantifizierung fäkaler Aβ-Aggregate in humanen Stuhlproben

Titel	Elevated Aβ aggregates in feces from Alzheimer's disease patients: a proof-of-concept study
Autoren	Marlene Pils, Alexandra Dybala, Anja Schaffrath, Fabian Rehn, Janine Kutzsche, Lara Blömeke, Markus Tusche, **Pelin Özdüzenciler**, Tuyen Bujnicki, Victoria Kraemer-Schulien, Hannes Gramespacher, Maximilan H.T. Schmieschek, Michael T.Barbe, Oezguer A. Onur, Gereon R. Fink, Gültekin Tamgüney, Oliver Bannach, Dieter Willbold
Journal	**Alzheimer's Research & Therapy (2024)**
DOI	10.1186/s13195-024-01597-3
Beitrag	**Eigener Anteil** ▪ Koordinierung der Probensammlung, Transport und Biobanking ▪ Diskussion der Ergebnisse ▪ Beteiligung beim Korrigieren des Manuskripts
Ergänzende Informationen	Pils et al. Supplementary Material
Druckgenehmigung	**s. Anhang 5.5**

Pils *et al. Alzheimer's Research & Therapy* (2024) 16:223
https://doi.org/10.1186/s13195-024-01597-3

Alzheimer's Research & Therapy

RESEARCH Open Access

Elevated Aβ aggregates in feces from Alzheimer's disease patients: a proof-of-concept study

Marlene Pils[1,2], Alexandra Dybala[3], Anja Schaffrath[1], Fabian Rehn[1,2], Janine Kutzsche[1], Lara Blömeke[1], Markus Tusche[1], Pelin Özdüzenciler[1], Tuyen Bujnicki[1], Victoria Kraemer-Schulien[1], Hannes Gramespacher[4], Maximilian H.T. Schmieschek[4], Michael T. Barbe[4], Oezguer A. Onur[4,5], Gereon R. Fink[4,5], Gültekin Tamgüney[1,3], Oliver Bannach[1,2] and Dieter Willbold[1,2,3*]

Abstract

Background Misfolding and aggregation of amyloid β (Aβ), along with neurofibrillary tangles consisting of aggregated Tau species, are pathological hallmarks of Alzheimer's disease (AD) onset and progression. In this study, we hypothesized the clearance of Aβ aggregates from the brain and body into the gut.

Methods To investigate this, we used surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) to determine the Aβ aggregate concentrations in feces from 26 AD patients and 31 healthy controls (HC).

Results Aβ aggregates were detectable in human feces and their concentrations were elevated in AD patients compared to HC (specificity 90.3%, sensitivity 53.8%).

Conclusion Thus, fecal Aβ aggregates constitute a non-invasive biomarker candidate for diagnosing AD. Whether digestion-resistant Aβ aggregates in feces are secreted via the liver and bile or directly from the enteric neuronal system remains to be elucidated.

Keywords Amyloidosis, Aβ oligomer quantitation, sFIDA, Brain-gut-microbiota axis, Leaky gut, Fecal/stool samples, Clearance

Background

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent age-related cause of dementia, characterized by neurodegenerative processes ultimately leading to neuronal loss in the hippocampus and cerebral cortex. Due to neurodegeneration, a progressive decline of cognitive functions, especially learning and memory, is observed [1]. AD is neuropathologically characterized by the progressive accumulation of extracellular senile plaques composed of fibrillar amyloid β (Aβ) peptides and of intracellular neurofibrillary tangles composed of tau proteins [2, 3]. Furthermore, recent evidence indicates that smaller soluble

*Correspondence:
Dieter Willbold
d.willbold@fz-juelich.de
[1]Institute of Biological Information Processing, Structural Biochemistry (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, 52428 Jülich, Germany
[2]attyloid GmbH, 40225 Düsseldorf, Germany
[3]Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany
[4]Department of Neurology, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, 50923 Köln, Germany
[5]Cognitive Neuroscience, Institute of Neuroscience and Medicine (INM-3), Jülich Research Centre, 52428 Jülich, Germany

© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

Aβ protein and tau aggregates like oligomers cause and promote pathological processes due to neurotoxicity [3, 4].

There is a growing body of experimental and clinical data confirming a link between the gut, gut microbiota, and neurodegeneration in various neurodegenerative diseases such as AD. In particular, the gut microbiota as a source of a large amount of bacterial amyloids, lipopolysaccharides, short fatty acids and secondary bile acids may promote system inflammation and increase the permeability of physiological barriers. There is even evidence that the gut microbiota is altered both taxonomically and functionally in AD, even before the onset of amyloid pathology in the CNS [5–8]. However, knowledge about changes of intestinal/fecal Aβ is limited. Considering additional factors like disturbances along the brain-gut-microbiota axis [5, 6, 9–11], liver-mediated Aβ clearance and elimination by bile [12–14], and the consequences of a disturbed blood-brain barrier and a permeable intestinal barrier [5, 10, 15, 16], the presence of Aβ aggregates in feces can be assumed. Initial studies have confirmed an association between AD and increased intestinal or fecal Aβ concentrations, irrespectively of conformational structure [17–20]. Protein aggregation occurs in various neurodegenerative disorders, and it often precedes the appearance of clinical symptoms for several years or even decades [21]. Therefore, we hypothesized that clearance mechanisms must exist that reduce the aggregate load in the brain and body by disposing Aβ aggregates via gut. Consequently, fecal Aβ aggregates may also serve as a biomarker candidate for non-invasive AD diagnosis.

We previously developed surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA), a platform technology for quantitating single protein aggregates [22]. While the biochemical setup of the sFIDA assay is similar to a sandwich ELISA (Fig. 1), the readout is microscopy-based featuring sub-femtomolar sensitivity [22, 23]. To avoid monomer interference, sFIDA uses capture and detection antibodies directed against the same or overlapping epitopes. After probing, the glass surface is imaged by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM), illuminating fluorescence-labeled detection antibodies bound to the captured aggregates. Individual particles are counted by image-data analysis of pixels with fluorescence intensities above background noise. Our previous work established the technical concept of sFIDA [23–25] and demonstrated that sFIDA is useful for diagnosing neurodegenerative diseases [26–28] and drug development [29].

This study did not intend to investigate the gut microbiome, but to investigate, whether Aβ aggregates are found in human feces and whether their levels are different in AD diseased donors versus healthy controls (HC). Therefore, we developed and analytically validated the sFIDA assay to detect and quantify Aβ aggregates in human fecal samples. We also assessed its applicability as an explorative biomarker for non-invasive AD diagnosis in a small proof-of-concept study including samples from 26 AD patients and 31 HC.

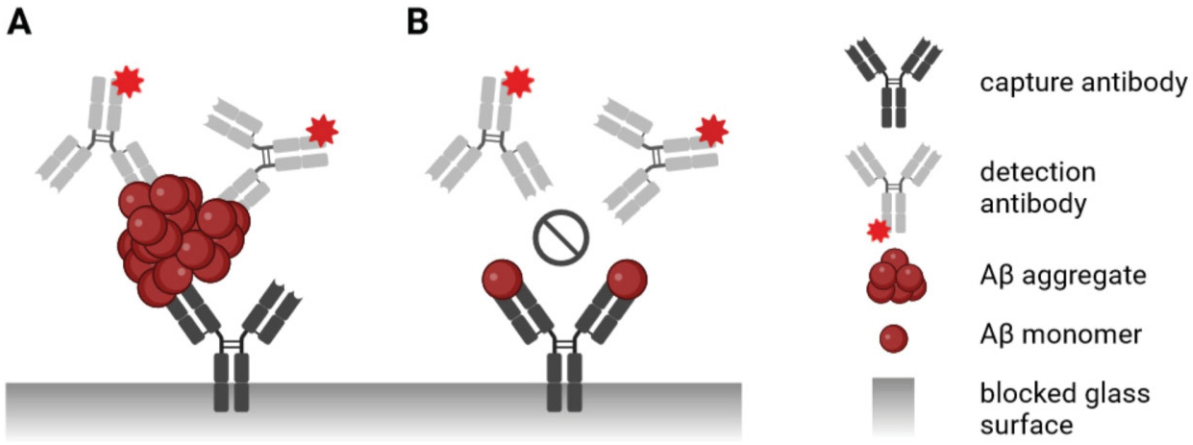


Fig. 1 Scheme of sFIDA principle. In sFIDA, capture antibodies directed against a linear epitope on Aβ (Nab228, directed against epitope amino acids 1 – 11) are immobilized on a glass surface, and unoccupied surface area is blocked with bovine serum albumin to reduce unspecific binding events. During sample incubation, monomeric and aggregated Aβ species are bound to the capture antibody. (**A**) Because sFIDA uses the same or overlapping epitopes for capture and detection, only Aβ aggregates are subsequently detected with fluorescence-labeled antibodies IC16-CF633, which is overlapping with the epitope of the capture antibody (directed against epitope amino acids 2 – 8). (**B**) For monomeric Aβ, this epitope is already masked by the capture antibody and cannot be bound by the detection antibody. Afterward, the assay surface is imaged by fluorescence microscopy, and pixels above a defined cutoff threshold are counted by image-data analysis (called pixel count). Finally, pixel-based readouts are calibrated into molar particle concentrations using silica nanoparticles (SiNaPs) coated with Aβ as calibration standards. Created with BioRender.com

Methods

Human fecal samples

Fecal samples of study participants were collected between October 2019 and June 2022. The Ethics Commission of the Faculty of Medicine of the University of Cologne approved patient recruitment (19-1644). Informed consent was obtained from each participant. A schematic illustration of the sample collection process is shown in Fig. 2.

HC had no known neurological disease, were not subjectively cognitively impaired, and showed complete functional abilities in daily living (ADL). The participants showing cognitive decline were diagnosed by an interdisciplinary team of clinicians with extensive experience in dementia care and research. The neuropsychological classification of the patients involved the following test procedures: DemTect [30], used as a screening tool to identify patients with mild cognitive impairment (MCI) and early-stage dementia; the Beck Depression Inventory II (BDI-II) [31] to evaluate the presence and severity of depression; the Memory Assessment Clinic-Questionnaire (MAC-Q) [32], a brief questionnaire for assessing age-related memory decline; and the Functional Activities Questionnaire (FAQ) to evaluate the ability to perform ADL [33]. The results of the neuropsychological tests for each cognitively impaired participant are listed in Supplementary Table S1. Cognitive impaired participants had to show the typical clinical syndrome according to the National Institute on Aging and Alzheimer's Association (NIA-AA) guidelines [34]. These guidelines specify that patients should have a subtle onset and slow progression of cognitive impairment (either self-reported or reported by a third party) and memory deficits greater than 1.5 standard deviations below the average in any neuropsychological testing results, adjusted for age, sex, and education. In this study, the cognitively impaired participants with preserved functional ADL, as assessed by the FAQ [33] or, in the absence of the FAQ, based on

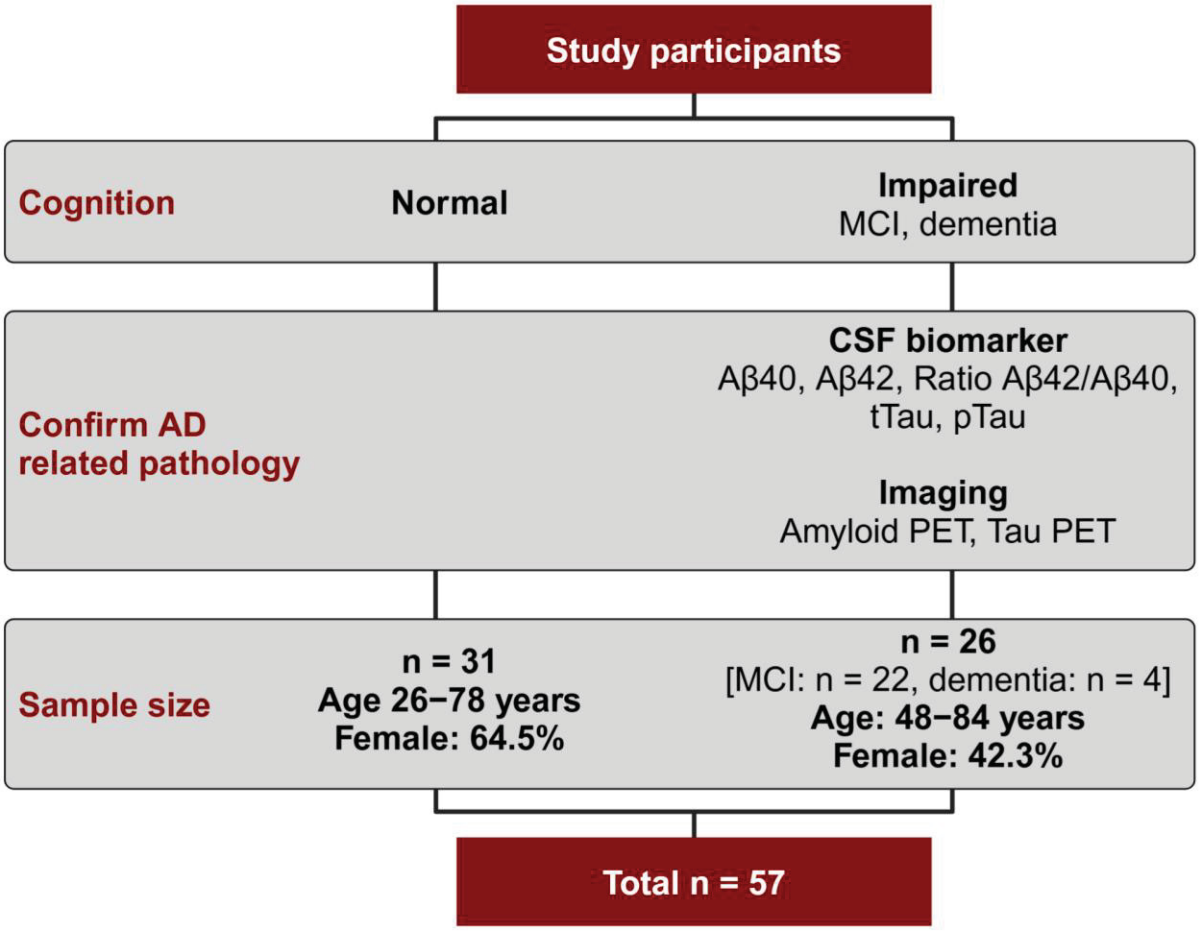


Fig. 2 Schematic illustration of the sample collection process. Study participants were divided into two groups (normal cognition, impaired cognition) based in their clinical symptoms. CSF analyses or imaging were performed for the participants with impaired cognition, to confirm AD related pathology. In total, 31 HC and 26 participants with impaired cognition due to amyloid pathology were included into this study. Created with BioRender.com

the medical history and interview of the caregiver by an experienced clinician, were classified as having MCI. If there were indications of impaired ADL, cognitively impaired participants were classified as having dementia. In order to check whether MCI and dementia are due to AD, biomarker-based diagnostics were carried out.

As described in the research framework of the NIA-AA, AD can be uniformly defined biologically, capable of identifying early pathological changes and biomarker interactions associated with the disease. Therefore, individuals can now be placed in the AD continuum as soon as pathological Aβ aggregation occurs, regardless of their cognitive status [1]. Reduced levels of Aβ42, a reduced ratio between Aβ42 and Aβ40 as well as the image-based detection of senile plaques using amyloid PET serve as evidence for the presence of Aβ aggregation. In the present study, positive amyloid PET (by visual read) and/or CSF levels of Aβ42 less than 630 pg/mL (ELISA kit of Euroimmun AG, Lübeck, Germany, product ID EQ 6511-9601-L, grey zone 570−630 pg/mL) and/or a CSF ration between Aβ42 and Aβ40 less than 0.095 (ELISA kit of Euroimmun AG, product ID EQ 6521-9601-L) confirmed amyloid positivity of cognitively impaired participants and classified them as clinical diagnosed AD patients. To confirm tauopathy, we determined levels of pTau (Fujirebio Europe N.V., Gent, Belgium, product ID 81574, cut-off >61 pg/mL) and tTau (Euroimmun AG, product ID EQ 6531-9601-L, cut-off >452 pg/mL, grey zone 290−452 pg/mL) in CSF as well as tau positivity via PET scan (by visual read).

Based on amyloid positivity, 26 patients (48−84 years of age at sample collection, 42.3% females) were enrolled as clinically defined Alzheimer's disease patients with varying degrees of cognitive impairment (n=22 patients with mild cognitive impairment (MCI), n=4 patients with dementia). In total, 31 samples from HC were collected (26−78 years of age at sample collection, 64.5% females) and were transferred to sFIDA laboratory without disclosing the names of the donors.

Sample collection

Fecal samples were collected using polypropylene sample tubes with a screwcap-integrated spoon (megro, Wesel, Germany) and a paper-based collection aid (Med Auxil analysis aids, Seesen, Germany) to avoid contamination. In order not to endanger sample stability, samples were stored and transported on ice. After receiving the fecal samples, samples were classified according to their consistency and shape using the Bristol scale [35] and were aliquoted into polypropylene protein low-binding tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Samples were stored at −80 °C until further use.

Homogenization of fecal samples for sFIDA analysis

For sample homogenization, we have developed a sample homogenization buffer and established a suitable homogenization method. A detailed description can be found in the Supplementary method section and Supplementary Figure S1. Fecal homogenates were stored at −80 °C until further use.

sFIDA Assay

Synthesis of Aβ1 − 15 coated silica nanoparticles

For assay calibration, we have previously introduced silica nanoparticle (SiNaP) standards coated with multiple Aβ-derived epitopes to mimic Aβ aggregates [24]. To this end, bare SiNaPs were synthesized via the Stöber process, functionalized, and activated as described previously by Blömeke et al. [26]. Briefly, synthesized SiNaPs were silanized with 3aminopropyl(triethoxysilane) (APTES, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to functionalize the surface with primary amino groups. Afterward, crosslinking of Aβ1−15 peptides to aminated SiNaPs surface was enabled using maleimido hexanoic acid (MIHA, abcr GmbH, Karlsruhe, Germany), preactivated with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC, Sigma-Aldrich) and N-hydroxysuccinimid (NHS, Sigma-Aldrich). Using C-terminal functionalized Aβ1−15 peptides with cysteamine, crosslinking between Aβ and maleimide groups was enabled. Finally, molar concentration of Aβ-coated SiNaPs was calculated based on silicon concentration determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry, density of SiNaPs and size and shape of the particles, as determined by transmission electron microscopy.

Aβ1 − 42 oligomer-based IQC sample

We have previously introduced synthetic Aβ1−42 oligomers as internal quality control (IQC) sample [25]. To this end, 5 µg of monomeric Aβ1−42 (Bachem, Bubendorf, Switzerland) was dissolved in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP, Sigma-Aldrich) and evaporated. Afterward, the Aβ pellet was resolved with 5 µL dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich), agitated for 10 min at 650 rpm at RT and diluted with 1× PBS containing 0.04% NaN_3 to a final stock concentration of 10 µM. Following an overnight incubation on a shaker at 650 rpm and RT, the IQC sample was sonicated for 20 min in an ultrasonic bath before dilution and use in sFIDA assay.

Labeling of antibody

For detection of captured Aβ aggregates, fluorescence-labeled anti-Aβ antibody IC16 (directed against epitope amino acid 2−8, kindly provided by Carsten Korth, Universitätsklinikum Düsseldorf, Germany) [36] was applied on the assay surface. To this end, the antibody was labeled according to the manufacturer's protocol using

CF633 dye (Biotium, Freemont, CA, USA). In carbonate buffer, the succinimidyl ester groups of the preactivated dye bind covalently to the amines of the IC16 antibody. Purification was performed using a polyacrylamide bead suspension (Bio-Gel P-30 Gel, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA), and afterward, concentration and degree of labeling of the probe were calculated as described in manufacturer's protocol. Finally, the detection probe was stored at 4 °C, diluted, and centrifuged for 1 h at 4 °C and 100,000× *g* just before usage.

Assay protocol

The biochemical principle of sFIDA was reported previously [23, 24, 26]. In this study, 384-well-plates (SensoPlate plus, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) were functionalized with 40 µL of Nab228 monoclonal anti-Aβ antibody (Sigma-Aldrich) at 2.5 µg/mL in 0.1 M $NaHCO_3$. After overnight incubation at 4 °C, the wells were washed five times with TBST (1× Tris-buffered saline, TBS (Serva, Duisburg, Germany), 0.05% Tween20 (AppliChem, Darmstadt, Germany)) and five times with TBS. Non-coated glass area was blocked with 0.5% bovine serum albumin (BSA, AppliChem) in TBS-ProClin (TBS with 0.03% ProClin (Sigma-Aldrich)) for 1.5 h at RT. After washing five times with TBST and TBS, 20 µL samples were applied in 4-fold determination and incubated for 2 h at RT. For this, Aβ-coated SiNaPs as calibration standard and synthetic Aβ1−42 oligomers as IQC were diluted in sample buffer (1× phosphate-buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich), 0.05% Tween, 0.095% NaN_3 (AppliChem) and 0.5% BSA). For fecal samples, an assay-specific 1:5 dilution in sample buffer was performed. After washing five times with TBS, 20 µL of IC16-CF633 (0.625 µg/mL in TBST+0.1% BSA) were applied and incubated for 1 h at RT. Finally, wells were washed five times with TBS, and buffer was changed against TBS-ProClin.

Image data acquisition

Using TIRFM (Leica DMI6000B, Leica microsystems, Wetzlar, Germany), 3.15% of the well surface were imaged at 25 different positions (14-bit grayscale, excitation: 635 nm, emission filter: 705/72 nm, exposure time: 1000 ms, gain: 1000). Imaging of 3.15% of the complete surface area accounts for avoiding edge regions and has been shown to be representative for the well [23, 25, 26]. Each image consists of 1000×1000 pixels and represents an area of 113.76×113.76 µm.

Quantification and statistical analysis

Analysis of image data

Image data analysis was performed using the in-house developed software sFIDAta [23, 26]. All images containing artifacts or images that were out of focus were excluded from analysis. For the exclusion of background signal, an intensity cutoff was determined at which 0.001% of all pixels remain positive in the blank control (unspiked sample buffer, BC). The number of pixels above the respective cutoff is referred to as pixel count. sFIDAta calculated the mean value, standard deviation, and coefficient of variation (CV%) for each sample based on the four replicates. Statistical analyses were performed using OriginPro (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) and matlab2019b (The MathWorks, Natick, MA, USA) were used for calculations and graphs.

Calibration

To convert pixel counts into femtomolar particle concentration, we used readouts of Aβ-coated SiNaPs to calculate the calibration curve. To this end, only those Aβ-coated SiNaPs concentrations which significantly differed from BC and were within linear range were included in the calculation. A one-sided Mann−Whitney U test with a confidence interval of 5% was performed to investigate significant differences. Linear regression was executed with matlab2019b software, where pixel counts were weighted with 1/readout.

Preanalytics

As it was the first time that we analyzed stool samples to quantify Aβ aggregates using sFIDA, we performed several studies to confirm reproducibility of the preanalytical processes, including fecal sample homogenization and sample dilution. We also investigated the effect of different transport conditions as well as the effect of repeated freeze-thaw cycles on sample stability. A detailed description of these preanalytical study designs is listed in the Supplementary Methods.

Analytical validation

Assay selectivity To evaluate the selectivity of the sFIDA assay in detecting Aβ-coated SiNaPs (molar particle concentration of 10.26 pM), IQC samples (100 nM, Aβ monomer subunit concentration), and three fecal samples with intermediate to high readouts, we measured the percent signal reduction of capture, autofluorescence, and cross-reactivity control, and compared it to a standard assay setup. In addition, we also performed immunodepletion experiments to determine if the observed pixel counts were specifically attributed to Aβ aggregates and not to interfering fecal matrix components. A detailed description of the experiments is listed in the Supplementary Method section.

Influence of Bristol scale Recent studies have demonstrated that microbiome composition and species richness change during AD progression and might impact

cognition [6, 7, 37, 38]. Microbiome composition and species richness also affect feces consistency. Therefore, changes in both water content and pH value are directly reflected in the Bristol scale [35, 39]. The latter may also act as a non-analyte-specific interfering factor [40], altering the quantification of the analyte through dilution or pH-dependent changes in assay kinetics. At sample receipt, all samples were assessed according to their consistency and shape using the Bristol scale. We performed a Mann–Whitney U test and a Spearman correlation analysis to determine whether the Bristol scale influences the fecal Aβ aggregate concentration or whether a cognition-based influence is present.

Influence of matrix components The presence of interfering endogenous substances in fecal samples may falsely alter assay results, either falsely positive or falsely negative [41, 42]. Because disturbances of the brain-gut-microbiota axis, including gut inflammation and increased permeability of the intestinal barrier, may contribute to AD pathology [5], levels of fecal biomarkers indicating pathological processes of the gut, i.e., fecal albumin, hemoglobin, α-1-antitrypsin, calprotectin, IgA, lipids, and bile acid were determined for a set of 15 fecal samples (AD $n=7$, HC $n=8$). Biomarker analyses were performed by the Medizinisches Versorgungszentrum Limbach (Heidelberg, Germany). Afterward, Spearman correlation was conducted to investigate possible interfering effects of those biomarkers on fecal Aβ aggregate concentrations. In addition, Mann–Whitney U tests were used to determine whether levels of all seven biomarkers differ in AD patients and HC.

Intra- and inter-assay variability The precision of an analytical method refers to the consistency of the measured values of several replicates of the same sample. This precision can be categorized as intra-assay variability when considering measurements within a single assay, or inter-assay variability when comparing measurements across different assays [43]. In this study, each sample was analyzed in fourfold determination. For each sample, mean and standard deviation were calculated based on the pixel counts of the four replicates. The intra-assay variation is reflected by CV% value, while for synthetic Aβ species such as Aβ-coated SiNaPs and IQC sample values below 20% were accepted. In case of human fecal samples, CV% below 25% were accepted. Normally, inter-assay variance is determined through a comprehensive validation study. However, due to the limited sample volume available in the present study, we were unable to conduct such an extensive validation. Instead, we assessed the comparability of two independent measurements using Spearman correlation analysis, with Spearman's ρ above 0.9 indicating low inter-assay variability.

Calculation of LoD In order to describe the smallest concentration of Aβ aggregates that can be measured reliably with the sFIDA assay, the limit of detection (LoD) was estimated for each experiment by measuring 24 replicates of BC. First, LoD was calculated according to Armbruster et al. using Eq. 1 [44] and then calibrated into femtomolar concentrations using the determined calibration line.

$$\text{Limit of detection (LoD)} = \text{pixel count}_{\text{BC}} + 2\sigma \quad (1)$$

Proof-of-concept study

For the proof-of-concept, the whole set of 57 fecal samples was subjected to sFIDA. At the time of measurements, all patient-related data was anonymized and researchers were aware of the clinical data at the time of the sFIDA measurements since HC samples were transferred to the sFIDA laboratory without the names of the donors. Pixel counts were generated and calibrated. Data of fecal samples were subsequently tested for normal distribution using Shapiro–Wilk, Lilliefors, Kolmogorov Smirnov, and Anderson–Darling tests. In the case of non-normally distributed data, non-parametric tests, e.g., the Mann–Whitney U test or Spearman correlation, were conducted for further analyses. A receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed to evaluate the effectiveness of fecal Aβ aggregates as diagnostic biomarker to differentiate between AD patients and HC. Using maximized Youden's index, the optimal combination of sensitivity and specificity and the area under the curve (AUC) were calculated.

Results

Homogenization and sample dilution of fecal samples are reproducible

Because fecal samples must be homogenized before they are subjected to sFIDA, we first established a suitable homogenization buffer and protocol. Due to the complex and individually varying composition of feces, we tested the reproducibility of homogenization and sample dilution (1:5 in sample buffer) using normalized pixel counts of three fecal samples (initial low, intermediate, high readout) to calculate percentage reproducibility. Figure S2 demonstrates that the homogenization and sample dilution resulted in a high degree of reproducibility, as most of the normalized pixel counts fell within the predefined tolerance range of ±25%. Only two of the observed values have exceeded the tolerance range with a slight deviation of ±0.8% (Figure S2A).

sFIDA features dilution linearity of Aβ-coated SiNaPs, IQC Samples, and fecal samples

Next, we analyzed dilution linearity by subjecting an Aβ-coated SiNaPs and IQC dilution series to sFIDA

analysis, ranging from 0.32 fM−10 pM (molar particle concentration) and 3.2 pM−31 nM (total Aβ concentration), respectively. The percent dilution linearity was determined using blank-corrected pixel counts and was accepted within a tolerance range of 80−120%. The results showed high dilution linearity for both targets, with an average linearity of 107% for Aβ-coated SiNaPs and 97.6% for IQC samples. Furthermore, for two fecal samples possessing high endogenous Aβ aggregate concentrations, high parallelism of 99.9% and 85.2%, respectively, was determined as depicted in Figure S3.

Repeated freeze-thaw cycles do not affect stability of homogenized fecal samples

In order not to compromise the sample stability during transport or assay preparation, we first performed a thermostability study. The results indicated that a temperature of 4 °C or lower did not compromise sample stability for up to 18 h, as depicted in Figure S4. In addition, we investigated the influence of freeze/thawing on crude and homogenized fecal samples since repeated freezing and thawing of clinical samples is known to compromise sample stability [43, 45, 46]. To this end, we subjected three fecal samples to repeated freeze-thaw cycles and determined the level of Aβ aggregates. As shown in Figure S5, the stability of the crude fecal samples was indeed affected by multiple thawing and freezing but remained intact in the homogenized fecal samples.

sFIDA is selective for aggregated Aβ species

To evaluate the selectivity of the sFIDA assay, we measured the percent signal reduction of capture, autofluorescence, and cross-reactivity control, and compared it to a standard assay setup (Fig. 3A). In this analysis, the sFIDA assay showed a selectivity of about 100% for both Aβ-coated SiNaPs and IQC samples. Thus, unspecific interference with the used blocking agent, autofluorescent components, and cross-reactivity can be excluded for both targets. In contrast, a selectivity of about 77% was determined for fecal Aβ aggregates. Both capture and cross-reactivity control showed about 19.2% and 24.8% remaining pixel counts, respectively. However, since the absence of the detection probe from the fecal samples also led to a comparable result (24.3% of remaining pixels), higher background intensities of the matrix and no interference with assay surface or cross-reactivity with α-synuclein directed antibodies can be assumed. Despite this increased background noise, the signal reduction down to 25% remaining pixels in the fecal samples was still sufficient.

Assay readouts are specifically attributed to Aβ

Immunodepletion was performed to demonstrate that the observed pixel counts by sFIDA can be specifically attributed to Aβ aggregates. Following Aβ immunodepletion, supernatants were subjected to sFIDA analysis, and depletion effectivity was calculated by the percent signal reduction compared to non-depleted sample (reference sample). Nab228-depleted Aβ-coated SiNaPs and

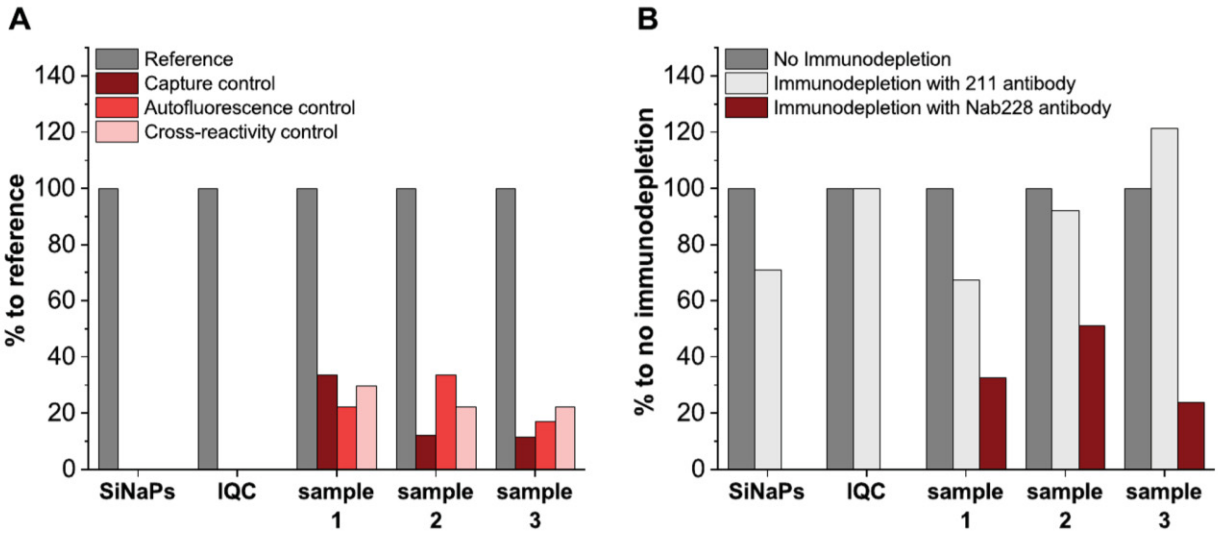


Fig. 3 Percent signal reduction of different assay controls for the assessment of assay selectivity. **A**) Aβ-coated SiNaPs, IQC, and Aβ aggregates in three fecal samples were analyzed by sFIDA. Based on the observed pixel counts, the percent signal reduction of each assay control (no capture antibody: capture control, dark red; no detection probe: autofluorescence control, light red; detection probe against α-synuclein: cross-reactivity control, rose) in comparison to reference (standard assay setup) were calculated. (**B**) All samples were subjected to immunodepletion using magnetic beads linked to Aβ-specific antibody (Nab228) and control beads linked to α-synuclein-specific antibody (211). Based on the observed pixel counts of non-depleted (dark gray), 211-depleted (light gray), and Nab228-depleted (red) samples, percent signal reduction was calculated

IQC showed depletion-dependent signal reduction close to 100% (Fig. 3B), whereas, for Nab228-depleted fecal samples, a mean signal reduction of 72.6% was determined. As a control, α-synuclein immunodepletion with 211-coated magnetic beads was performed, resulting in only negligible signal reduction of IQC (0%) and fecal samples (6.5%). However, for Aβ-coated SiNaPs a signal reduction of 28.9% was observed, suggesting some non-specific adherence of Aβ-coated SiNaPs to bead surface since cross-reactivity between 211 and Aβ-coated SiNaPs was previously excluded (Fig. 3A). To qualitatively confirm the presence of Aβ in human fecal samples, we detected Aβ species in two fecal samples (HC and AD) using a commercial ELISA kit (Figure S6). However, differentiation of fecal Aβ levels between the two subjects was only achievable after complex and sample-consuming pretreatment including homogenization, immunoprecipitation, and spiking. In the spike and recovery experiments, the percentage recovery of monomeric 100 pg/mL Aβ1−42 spiked in human fecal samples was also increased by eliminating the sample matrix using immunoprecipitation. However, the mean percentage recoveries of the ELISA were only 8.8% (homogenized samples: HC=3.5%, AD=14.1%) for homogenized samples and 13.1% (HC=10.0%, AD=16.2%) for precipitated samples, indicating substantial assay interference of matrix components that cannot be removed by immunoprecipitation. It is also important to note that the commercial ELISA used in this study was not validated for the analysis of Aβ in fecal samples, which also might explain the rather low recovery rate. In contrast, the sFIDA assay shown here was optimized for the use of stool as sample matrix (cf. homogenization procedure, homogenization buffer and assay-specific sample dilution), so that even at a lower concentration of aggregated Aβ1−42 (45 pg/mL spiked in stool sample) a mean percentage recovery of 82.3% was obtained.

Independent measurements yield comparable results

We investigated the inter-assay variability of Aβ-coated SiNaPs, IQC samples, and 13 fecal samples in two different assays (Fig. 4). All three targets showed high comparability, indicated by Spearman's coefficient of correlations (ρ: 1.0 for Aβ-coated SiNaPs and IQC samples and ρ: 0.929 (p-value: 8.63×10^{-4}) for fecal samples).

Aβ aggregates are present in fecal samples and are elevated in AD patients

After completion of preanalytical and selectivity studies, a proof-of-concept study was performed using dilution series of Aβ-coated SiNaPs for calibration and LoD calculation, a dilution series of IQC samples and 57 fecal samples comprising two diagnostic groups (Table 1). In detail, we quantified fecal Aβ aggregate concentrations of HC subjects having no subjective cognitive decline (n=31) and patients diagnosed with clinical AD (n=26). Because the data mainly did not show normal distribution (Table S2), we performed statistical analysis using non-parametric tests like the Mann−Whitney U test or Spearman correlation.

Due to the high number of assay points, the measurements were performed on two 384-well microtiter plates (experiment 1: 48 samples, experiment 2: 9 samples), each carrying both a dilution series of Aβ-coated SiNaPs for calibration and LoD calculation and a dilution series of IQC samples, respectively. We determined a femtomolar mean LoD of 1.68 fM for Aβ-coated SiNaPs, indicating high analytical sensitivity. The mean CV% for Aβ-coated SiNaPs was 13.4% and 11.1% for IQC samples. A mean intra-assay variability of 18.7% was observed for fecal samples (for individual results of each experiment see Table S3). Representative TIRFM images of Aβ-coated SiNaPs, IQC sample, patient sample and the sample buffer control are shown in Fig. 5A.

Using Aβ-coated SiNaPs standards, pixel counts of fecal samples were calibrated into molar particle concentrations (Table S4). We determined Aβ aggregate concentrations ranging from 1.3 fM−3.4 pM (Fig. 5B). Despite a substantial overlap between both groups, Aβ aggregate levels of AD patients were significantly elevated (p-value: 0.009). ROC curve were determined to evaluate the use of fecal Aβ aggregates as a diagnostic biomarker (Fig. 5C). Discrimination of AD patients versus HC showed a specificity of 90.3% and a sensitivity of 53.8% with an AUC of 0.703.

Since HC samples were collected anonymously, we could not match the sample with the demographic information of the respective donor. Thus, only the mean age and proportion of female donors was calculated. Therefore, a direct correlation to the determined fecal Aβ aggregate concentration could only be established for the AD cohort. Since we are aware that the samples used from HC do not match with samples of AD patients (Table 1), we investigated for the AD cohort whether fecal Aβ aggregate concentrations might be influenced by age or sex. However, no correlation between AD patients' age and Aβ aggregate concentration was found using Spearman correlation (ρ: 0.163, p-value: 0.426). In addition, no difference was found in Aβ aggregate concentrations in fecal samples from male and female AD patients using a two-sided Mann−Whitney U test with a confidence interval of 5% (p-value: 0.959).

Aβ aggregate quantification is not affected by sample consistency or endogenous substances

To investigate whether the feces consistency, indicated by Bristol scale, affects the measured fecal Aβ aggregate concentrations, we performed a Spearman correlation

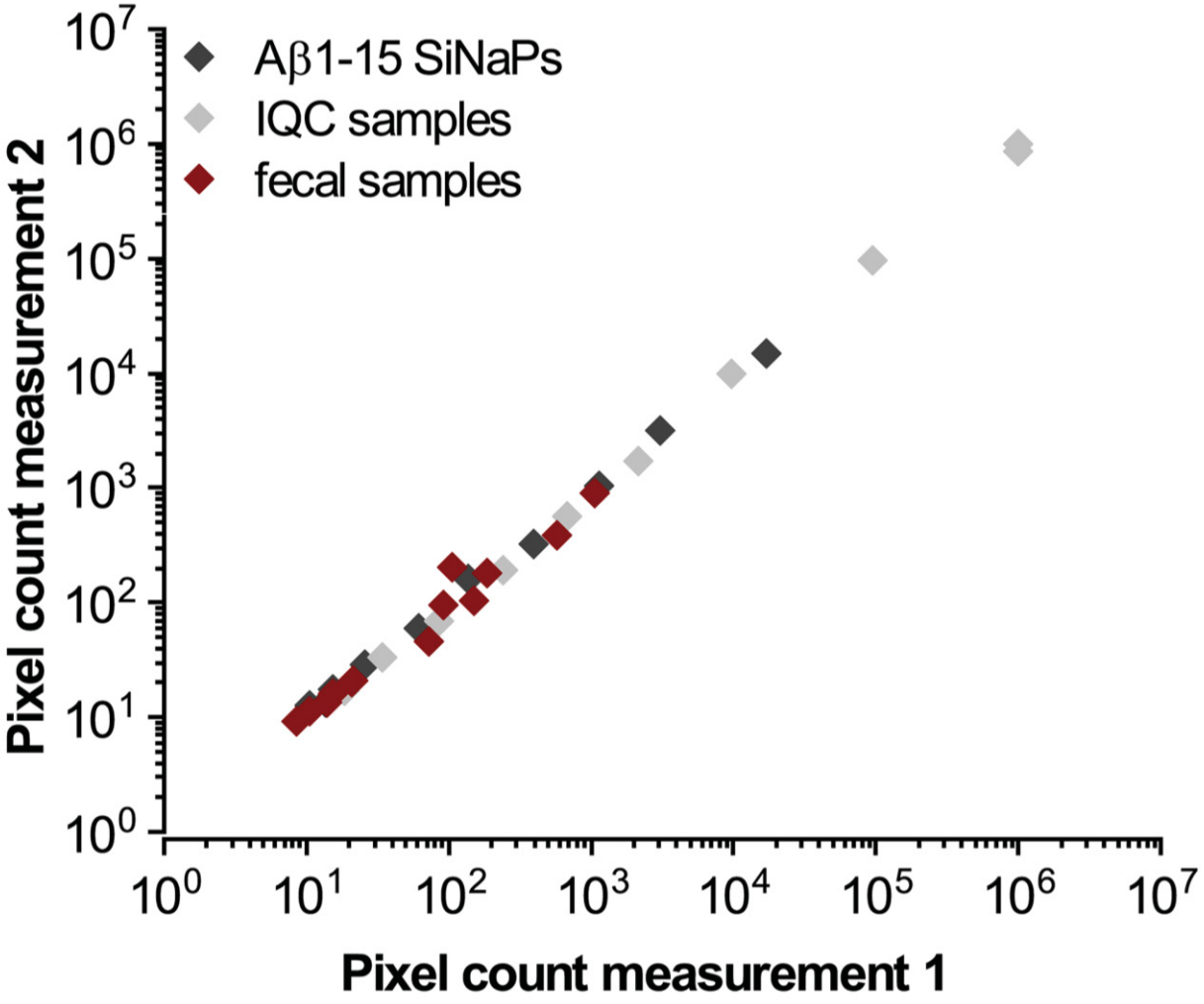


Fig. 4 Independent measurements of aggregated Aβ yield high comparability. For Aβ-coated SiNaPs (dark grey), IQC sample (light gray), and 13 fecal samples (red), pixel counts of the second measurement were plotted against pixel counts of the first measurement. Because the second measurement was carried out months later, there were minor changes in used reagent lots, e.g., manufacturing date of washing buffers, and the used homogenized fecal samples were subjected to an additional freeze-thaw cycle. Please note the logarithmic scaling

Table 1 Demographic and clinical information on AD patients and HC that donated fecal samples

Characteristics	AD	HC
Number	26	31
Female	42.3%	64.5%
Age [years ± SD]	71.1 ± 8.6	49.2 ± 16.4
Bristol scale [score ± SD]	4.4 ± 0.9	5.1 ± 0.8

[a]Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; HC, healthy controls; SD, standard deviation

for all 57 samples. Here, we did not find a significant correlation, indicating that the quantification was not affected by feces consistency (ρ: −0.176, *p*-value: 0.191). Since we found significant differences in feces consistency between AD patients and HC (*p*-value: 0.003, Table 1), we performed additional Spearman correlation for HC and AD patient groups separately. Here, we also did not find any correlation between the Bristol scale and the signals of fecal Aβ-aggregate (AD patients: ρ: −0.087, *p*-value: 0.672; HC: ρ: 0.073, *p*-value: 0.696). Spearman correlation between fecal albumin, hemoglobin, calprotectin, IgA, bile acid, α-1-antitrypsin, lipids, and fecal Aβ aggregate concentrations were investigated to assess interfering effects. As shown in Table S5, Spearman correlation coefficients between −0.38 and +0.36 were observed. However, since they were not significant, only minute interfering effects of endogenous substances on quantification can be assumed. In addition, we investigated whether the levels of all seven biomarkers were different between AD patients and HC. As shown in Table S6, no significant differences between both cohorts were observed.

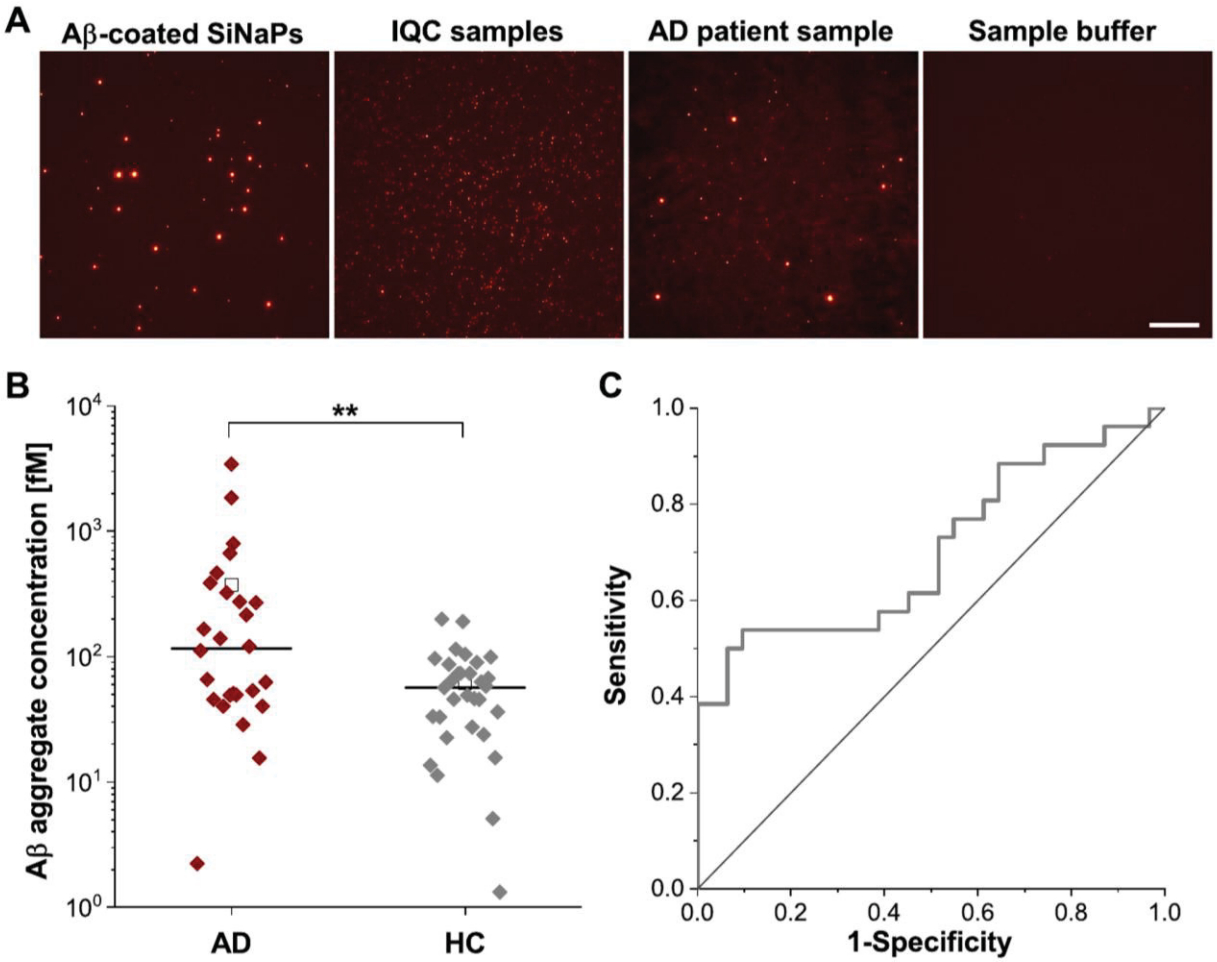


Fig. 5 Representative TIRFM images, molar particle concentration of fecal Aβ aggregates and receiver operating characteristic. (**A**) Representative TIRFM images for the red channel (IC16-CF633, excitation 635 nm, emission 705 nm, exposure time 1000 ms, gain 1000) of 1 pM Aβ-coated SiNaPs, 100 pM synthetic Aβ1 – 42 oligomers (based on total Aβ concentration), fecal sample (AD patient) and sample buffer control. For better illustration of 14-bit images, color and contrast were adjusted using ImageJ software (colormap: red hot, contrast: maximum grayscale value 8000). Scale bar: 20 µm. (**B**) Concentrations of fecal Aβ aggregates of AD patients were significantly elevated with a *p*-value of 0.009 compared to HC. Significant differences between both cohorts were calculated with a Mann – Whitney U test (**p: ≤ 0.01). Please note the logarithmic scaling (line = median, square = mean). (**C**) In receiver operating characteristic (ROC) analysis, discrimination of AD patients versus HC showed a specificity of 90.3% and a sensitivity of 53.8% with an AUC of 0.703

Discussion

AD is the most common age-related cause of dementia and among the most critical public health problems in industrialized countries due to increasing life expectancy [47]. In AD pathology, small soluble Aβ oligomers are the most toxic Aβ species that damage neurons and compromise synaptic function. Aβ oligomers form probably decades before clinical symptoms of AD manifest in humans. We hypothesized that clearance mechanisms are likely to exist to protect the brain from toxic effects. The deposition of Aβ oligomers into amyloid plaques is likely just one clearance mechanism, while the sequestration of Aβ oligomers out of the brain could be another mechanism [12, 13, 16]. Given that the liver plays a crucial role in detoxifying the blood, it is reasonable to assume that Aβ oligomers are sequestered from the bloodstream by the liver and then transported to the gut via bile. We and others have provided compelling evidence indicating that disturbances along the brain-gut-microbiota axis may substantially contribute to the pathogenesis of neurodegenerative diseases such as AD because gastrointestinal metabolic, endocrine, neuronal, and immunological pathways are critical for the maintenance of brain homeostasis [5, 6, 9–11]. Although the bidirectional communication between the brain and gut and its microbiome is not yet fully understood, it is clear that changes in the gut microbiome can induce an immune activation resulting in a systematic inflammation, which in turn may compromise the intestinal barrier (leaky gut) and the blood-brain barrier [5, 6, 10, 11, 15]. Combined with a dysregulated

Aβ homeostasis, brain-derived Aβ aggregates could thus directly enter the enteric nervous system by crossing the blood-brain barrier or by neuron-to-neuron, distal neuron spreading, or other cells like astrocytes, fibroblasts, microglia and immune system cells [5]. Conversely, Aβ species produced by enteric neurons [18] may also enter the brain. Moreover, due to the permeability of the intestinal barrier caused by systematic inflammation, it can be assumed that Aβ aggregates in blood or originating in enteric neurons enter the intestinal lumen and are excreted with feces, as we have observed for α-synuclein aggregates in patients with isolated rapid eye movement sleep behavior disorder, a prodromal form of parkinsonism [28]. Besides, circulating Aβ is predominantly cleared by degradation in hepatocytes and secreted into the gut in bile [12–14, 16], which in turn could increase intestinal and fecal Aβ concentrations. Initial studies have confirmed this association between AD and increased intestinal or fecal Aβ concentrations, irrespective of Aβ conformation [17–20]. One may assume, however, that only Aβ species that are resistant to proteases in the gut may become observable in feces.

The clinical assessment of AD is supported by neurological evaluation, imaging, and biomarkers in patients' CSF [1, 4]. Due to the invasiveness and burden of a lumbar puncture on patients, CSF is not routinely collected [48, 49]. Identifying non-invasive biomarkers that can be used for sensitive detection of AD years or even decades before clinical onset is of utmost importance [22, 50]. Therefore, we used sFIDA technology to verify whether Aβ aggregates exist in feces and, more importantly, whether Aβ aggregate concentrations in fecal samples of HC and AD differ.

As this was a pilot project to use sFIDA for the quantification of fecal Aβ aggregates, we first had to overcome several preanalytical hurdles due to a complex sample matrix in addition to already existing challenges of oligomer-based diagnostics. Because the fecal samples must be processed before they are subjected to sFIDA, we first established a reproducible homogenization procedure. Various homogenization methods for fecal samples are described in the literature, with the required sample quantity being determined either by weighing or using tubes with an integral dosing system [51–55]. For our study, we opted to use Simplix tubes, which facilitated simple, clean, and efficient sample handling, and accurate dosing, as confirmed by our results.

The easiest way to overcome matrix effects in immunoassays is to dilute samples in a dilution buffer that ensures high discrimination between negative and positive samples [56]. In this study, a 1:5 dilution of the fecal homogenates was found optimal (data not shown) and reproducible in sFIDA assay development. Furthermore, as dilution linearity or parallelism, respectively, were observed for Aβ-coated SiNaPs, IQC sample, and fecal samples, we can exclude strong interferences due to, e.g., heterophilic antibodies as these are typically reflected in insufficient dilution linearity [42]. Therefore, samples containing high levels of endogenous fecal Aβ can be diluted within a linear range, and still yield reliable outcomes.

Chemical, microbial, and physical factors influence an analyte's stability and measurable concentration in a complex sample and can significantly falsify a measurement [43, 45]. Because our thermostability study showed that incubation at temperatures above 4 °C did affect sample stability, we adjusted the sFIDA procedure for fecal analysis accordingly. In addition, we have developed a homogenization buffer, which combined with the homogenization process, leads to stable Aβ aggregates in feces, even when they are exposed to several freeze-thaw cycles. In contrast, crude samples reacted to freeze-thaw cycles with a signal reduction. These results are similar to those reported for CSF, where the stability of Aβ42 was analyzed, and a signal loss of 20% was observed after three freeze-thaw cycles [46, 57]. Especially, the signal of Aβ aggregates was further reduced with increasing cycle numbers, which is in accordance with our study in the case of crude fecal samples.

Despite complex matrix, using a suitable homogenization and sample dilution buffer ensured a high consistency within the sample replicates implicated by low intra-assay variability. Furthermore, Aβ-coated SiNaPs, IQC sample and fecal samples demonstrated low inter-assay variability, indicating a highly precise assay. In particular, the comparability of both sample measurements of the inter-assay study should be emphasized since the homogenates used for the second measurement were stored at −80 °C for nine months. Thus, besides sufficient stability against freeze-thaw cycles, the homogenization buffer also allows aggregate stability over an extended period. Additionally, the sFIDA assay displayed a high level of selectivity for fecal Aβ aggregates.

After preanalytical and analytical validation, we determined the Aβ aggregate concentrations in the feces of AD patients and HC. All feces contained Aβ aggregates in the femtomolar range, a few samples even above. Although it is not clear whether the Aβ aggregates found in feces have been secreted by the liver/bile system or have been directly secreted into the gut, e.g., from neurons of the enteric system, this study supports the presence of clearance mechanisms that reduce Aβ oligomer concentration in the body. Here, we demonstrated that sFIDA is suitable to measure low femtomolar (1.3 fM) to low picomolar (3.4 pM) concentrations of Aβ aggregates in fecal samples, which is slightly higher than the previously reported concentration range of Aβ aggregates in CSF (aM-fM) [58, 59]. We also demonstrated that fecal

samples of AD patients with proven amyloid-positivity in the CSF or brain showed significantly elevated levels of Aβ aggregates compared to HC, which has been previously shown for Aβ aggregate concentrations in CSF [27, 58–62]. Due to a high specificity for aggregated Aβ species, the sFIDA assay developed in the present study could discriminate between fecal samples from HC and AD patients with a specificity of 90.3%. Because potential clearance mechanisms can be expected to yield increased Aβ aggregate concentrations also in (still) HC, not surprisingly, we observed an overlap between both cohorts, resulting in an assay sensitivity of only 54%, which limits the clinical use at the current stage of development. In this context, longitudinal samples may help to determine possible changes in the fecal Aβ aggregate concentration before and during disease. The correlation between fecal Aβ aggregate concentration and clinical symptoms within the AD cohort could not be thoroughly evaluated in this study, as it only involved four patients with dementia and 22 with MCI. However, if future studies indeed confirm a correlation between fecal Aβ aggregate concentrations and cognitive abilities, it will represent a significant advancement toward non-invasive early detection of AD.

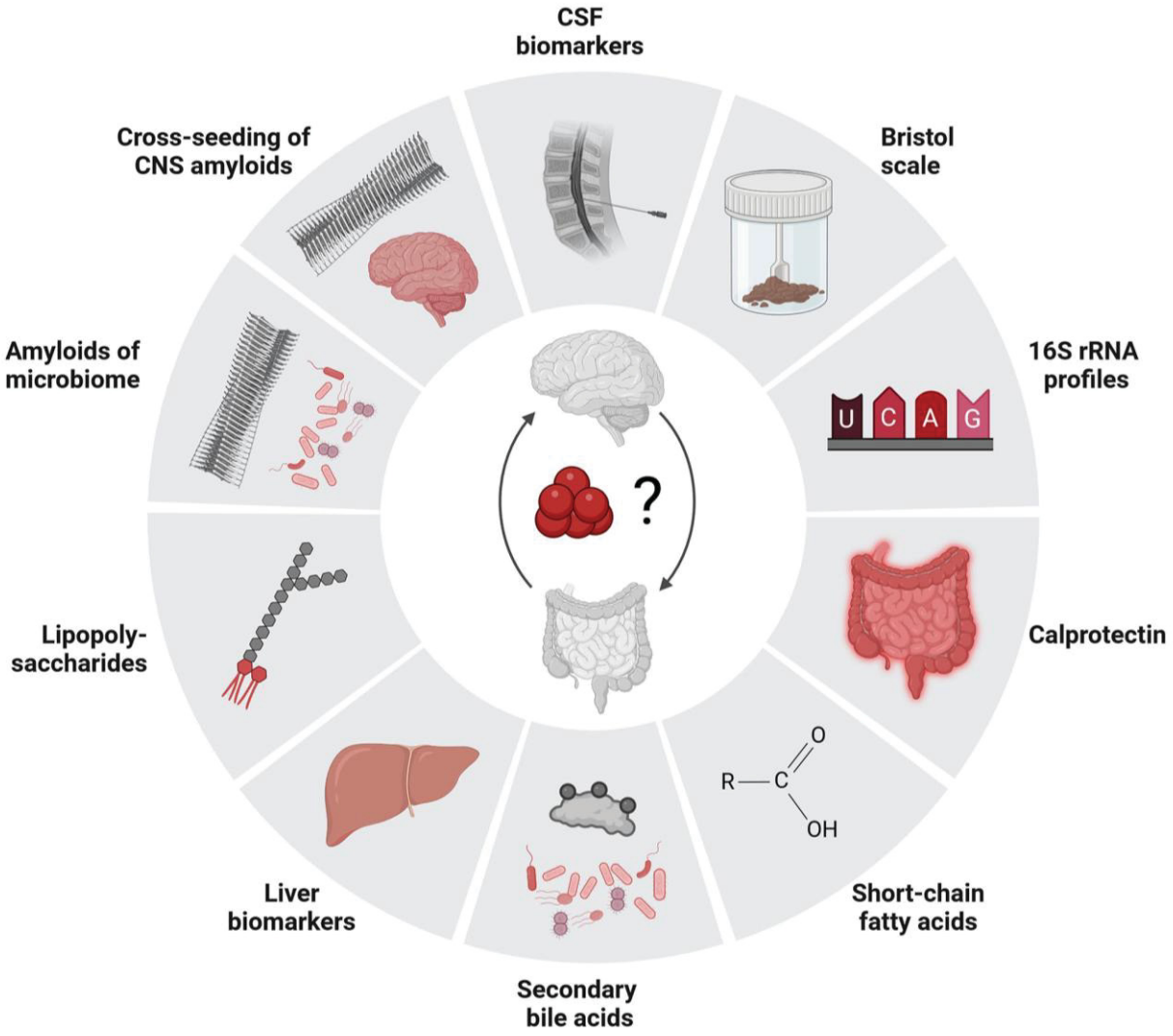


Fig. 6 Association of fecal Aβ aggregates with additional biomarkers affecting AD pathology. The combination of fecal Aβ aggregates with further biomarkers may provide new insights into mechanism of brain-gut-microbiota axis and AD pathogenesis. Therefore, in addition to CSF biomarkers (Aβ40, Aβ42, phosphorylated and total Tau) and Bristol scale, 16 S rRNA profiles, fecal calprotectin, short-chain fatty acids, secondary bile acids, liver biomarkers, and lipopolysaccharides should be determined in the future. Because amyloids produced by gut microbiome share similarities in tertiary structure with CNS amyloids, they may act in a prion-like manner and induce misfolding, aggregation, and deposition of Aβ and may cross-seed with neuronal amyloids once they have entered the brain due to increased permeability of the blood-brain barrier. Created with BioRender.com

Since this is a proof-of-concept study, there are certain limitations to our findings, primarily due to the restricted availability of samples, resulting in small sample sizes. While we could demonstrate statistically significant ($p<0.01$) elevation of fecal Aβ aggregates in AD vs. HC, it is crucial to replicate this result in larger validation studies employing independent cohorts. While in this study we did not observe any correlation between the age and Aβ aggregate concentration, we acknowledge that the samples obtained from HC were not matched in age with those from AD patients, which should be addressed in future work. Additionally, it would be intriguing to explore the link of fecal Aβ aggregates with additional biomarkers related to AD pathology, gut microbiota, and liver function (Fig. 6). Additional data on these biomarkers in combination with a larger cohort of patients across the AD continuum have the potential to enhance our comprehension of the fundamental disease pathology and enable early diagnosis at a stage when clearance mechanisms may be starting to malfunction.

Conclusion

In conclusion, we developed a sFIDA assay for the quantitation of fecal Aβ aggregates, showing high reproducibility of preanalytical procedures, high analytical sensitivity, and specificity. In this work we delivered a proof-of-concept study, that Aβ aggregate are present in human feces and that AD patients exhibited elevated levels of fecal Aβ aggregates compared to HC. Future studies will need to confirm our results with more extensive cohort of participants, encompassing various AD stages, along with longitudinal samples and more comprehensive biomarker analysis. Finally, this work underscores the promising potential of fecal Aβ aggregates as a non-invasive biomarker for AD from which clinical routine and the development of therapeutic interventions might benefit in the future.

Abbreviations

Aβ	Amyloid β
AD	Alzheimer's disease
ADL	Abilities of daily living
AF	Autofluorescence control
APTES	3aminopropyl(triethoxysilane)
AUC	Area under the curve
BC	Blank control
BSA	Bovine serum albumin
CC	Capture control
CSF	Cerebrospinal fluid
CV%	Coefficient of variation
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
HC	healthy controls
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
IQC	Internal quality control
IVDs	In-vitro diagnostics
LoD	Limit of detection
MCI	Mild cognitive impairment
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MIHA	Maleimido hexanoic acid
NHS	N-hydroxysuccinimid
OD	Optical density
PBS	10× phosphate-buffered saline
ROC	Receiver operating characteristic
SD	Standard deviation
sFIDA	Surface-based fluorescence intensity distribution analysis
SiNaP	Silica nanoparticle
TBS	1× Tris-buffered saline
TBST	1× Tris-buffered saline containing 0.05% Tween20
TIRFM	Total internal reflection fluorescence microscopy

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1186/s13195-024-01597-3.

Supplementary Material 1

Acknowledgements

The authors thank Carsten Korth (Institute of Neuropathology, Universitätsklinikum Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany) for providing the IC16 antibody. The authors thank Volker Nischwitz (Central Institute for Engineering, Electronics and Analytics, Analytics (ZEA-3), Forschungszentrum Jülich, 52428, Jülich, Germany) for determining the silicon concentration of the used Aβ-coated SiNaPs using inductively coupled plasma mass spectrometry. The authors confirm that these results have not currently been presented at any conference or reviewed or published in any other journal.

Author contributions

Conceptualization, M.P., O.B., D.W. and G.T.; Methodology, M.P.; Validation, M.P.; L.B., T.B. and V.K.; Formal Analysis, M.P., L.B. and F.R.; Investigation, M.P. and M.T.; Resources, i.e., coordination of sample collection, transport, and biobanking M.P., A.S., G.T., M.HT.S., H.G., G.R.F., M.T.B., and O.A.O.; Writing – Original Draft, M.P.; Writing – Review & Editing, O.B., D.W., H.G., O.A.O, M.T.B., G.R.F. and G.T; Visualization, M.P.; Supervision, O.B., G.T., J.K. and D.W.; Project Administration, O.B., D.W. and G.T.; Funding Acquisition, O.B., G.T., D.W., G.R.F and O.A.O. All authors participated in the discussion of the data, provided critical feedback, and contributed to the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

sFIDA was supported by the programs "Biomarkers Across Neurodegenerative Diseases I + II" of The Alzheimer's Association, Alzheimer's Research UK, and the Weston Brain Institute [11084, BAND-19-614337]. We are also grateful for support from The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research [14977, 009889], the ALS Association, and the Packard Center [19-SI-476]. We received further funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft [INST 208/616-1 FUGG, INST 208/794-1 FUGG], Helmholtz Association [HVF0079], Förderstiftung Dierichs, and Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. Selbsthilfe Demenz (DalzG). G.R.F. and O.A.O. were supported by the Marga and Walter Boll-Foundation. H.G. was supported by the Cologne Clinician Scientist Program (CCSP) / Faculty of Medicine / University of Cologne and received funding from Deutsche Forschungsgemeinschaft [DFG, FI 773/15 – 1]. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Data availability

All data generated or analysed during this study are included in this published article and its Supplementary Information. For image data analysis, we used the sFIDAta software application, which can be made available upon request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the local ethics committee (Ethics Commission of the Faculty of Medicine of the University of Cologne, approval number 19-1644) and carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and its later amendments. All participants agreed to be a participant in this study and gave their written informed consent to participate. All participants were aware

of what this study involves, that each participant was at least 18 years old, and have received a copy of this informed consent.

Consent for publication
No identifying information about participants is available in the article.

Competing interests
D.W. and O.B. are cofounders and shareholders of attyloid GmbH. D.W. is member of attyloid's supervisory board. M.P., O.B., G.T. and D.W. are inventors of patent DE102020114278A1 (determination of disease-specific protein aggregates in fecal samples). These factors did not influence the interpretation of the data. Remaining authors declare no conflicts of interest.

Received: 27 June 2023 / Accepted: 5 October 2024
Published online: 14 October 2024

References

1. Jack CR Jr, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA research framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2018;14(4):535–62.
2. Brown MR, Radford SE, Hewitt EW. Modulation of β-Amyloid fibril formation in Alzheimer's disease by Microglia and infection. Front Mol Neurosci. 2020;13:609073.
3. Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, et al. The amyloid-β pathway in Alzheimer's disease. Mol Psychiatry. 2021;26(10):5481–503.
4. Kulenkampff K, Wolf Perez AM, Sormanni P, Habchi J, Vendruscolo M. Quantifying misfolded protein oligomers as drug targets and biomarkers in Alzheimer and Parkinson diseases. Nat Reviews Chem. 2021;5(4):277–94.
5. Kowalski K, Mulak A. Brain-gut-microbiota Axis in Alzheimer's Disease. J Neurogastroenterol Motil. 2019;25(1):48–60.
6. Ferreiro AL, et al. Gut microbiome composition may be an indicator of preclinical Alzheimer's disease. Sci Transl Med. 2023;15(700):eabo2984.
7. Varesi A et al. The Potential Role of Gut Microbiota in Alzheimer's Disease: From Diagnosis to Treatment. Nutrients, 2022. 14(3).
8. Laske C, et al. Signature of Alzheimer's Disease in Intestinal Microbiome: results from the AlzBiom Study. Front Neurosci. 2022;16:792996.
9. Sun M, Ma K, Wen J, Wang G, Zhang C, Li Q, et al. A review of the brain-gut-microbiome axis and the potential role of microbiota in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2020;73(3):849–65.
10. Leblhuber F, et al. Elevated fecal calprotectin in patients with Alzheimer's dementia indicates leaky gut. J Neural Transm. 2015;122(9):1319–22.
11. Fink A, Doblhammer G, Tamgüney G. Recurring gastrointestinal infections increase the risk of Dementia. J Alzheimers Dis. 2021;84:797–806.
12. Cheng Y, Tian DY, Wang YJ. Peripheral clearance of brain-derived Aβ in Alzheimer's disease: pathophysiology and therapeutic perspectives. Transl Neurodegener. 2020;9(1):16.
13. Wang J, Gu BJ, Masters CL, Wang YJ. A systemic view of Alzheimer disease - insights from amyloid-β metabolism beyond the brain. Nat Rev Neurol. 2017;13(10):612–23.
14. Ullah R, et al. Abnormal amyloid beta metabolism in systemic abnormalities and Alzheimer's pathology: insights and therapeutic approaches from periphery. Ageing Res Rev. 2021;71:101451.
15. Jiang C, et al. The gut microbiota and Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis. 2017;58(1):1–15.
16. Wu S, Hu L, Lin J, Li K, Ye S, Zhu S, et al. Excretion of amyloid-β in the gastrointestinal tract and regulation by the gut microbiota. J Alzheimers Dis. 2022;90:1153–62.
17. Pellegrini C et al. Prodromal Intestinal Events in Alzheimer's Disease (AD): Colonic Dysmotility and Inflammation Are Associated with Enteric AD-Related Protein Deposition. Int J Mol Sci, 2020. 21(10).
18. Manocha GD, Floden AM, Miller NM, Smith AJ, Nagamoto-Combs K, Saito T, et al. Temporal progression of Alzheimer's disease in brains and intestines of transgenic mice. Neurobiol Aging. 2019;81:166–76.
19. Puig KL, Manocha GD, Combs CK. Amyloid precursor protein mediated changes in intestinal epithelial phenotype in vitro. PLoS ONE. 2015;10(3):e0119534.
20. Joachim CL, Mori H, Selkoe DJ. Amyloid beta-protein deposition in tissues other than brain in Alzheimer's disease. Nature. 1989;341(6239):226–30.
21. Willbold D, Strodel B, Schröder GF, Hoyer W, Heise H. Amyloid-type protein aggregation and prion-like properties of amyloids. Chem Rev. 2021;121(13):8285–307.
22. Kulawik A, Heise H, Zafiu C, Willbold D, Bannach O. Advancements of the sFIDA method for oligomer-based diagnostics of neurodegenerative diseases. FEBS Lett. 2018;592(4):516–34.
23. Herrmann Y, Kulawik A, Kühbach K, Hülsemann M, Peters L, Bujnicki T, et al. sFIDA automation yields sub-femtomolar limit of detection for Aβ aggregates in body fluids. Clin Biochem. 2017;50(4–5):244–7.
24. Hülsemann M, et al. Biofunctionalized silica nanoparticles: standards in Amyloid-β oligomer-based diagnosis of Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis. 2016;54(1):79–88.
25. Pils M, Dybala A, Rehn F, Blömeke L, Bujnicki T, Kraemer-Schulien V, et al. Development and implementation of an internal quality control sample to standardize oligomer-based diagnostics of Alzheimer's disease. Diagnostics. 2023;13(10):1702.
26. Blömeke L, et al. Quantitative detection of α-Synuclein and tau oligomers and other aggregates by digital single particle counting. NPJ Parkinsons Dis. 2022;8(1):68.
27. Wang-Dietrich L, et al. The amyloid-β oligomer count in cerebrospinal fluid is a biomarker for Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2013;34(4):985–94.
28. Schaffrath A, et al. Patients with isolated REM-sleep behavior disorder have elevated levels of alpha-synuclein aggregates in stool. NPJ Parkinsons Dis. 2023;9(1):14.
29. Kass B, et al. Aβ oligomer concentration in mouse and human brain and its drug-induced reduction ex vivo. Cell Rep Med. 2022;3(5):100630.
30. Kalbe E, et al. DemTect: a new, sensitive cognitive screening test to support the diagnosis of mild cognitive impairment and early dementia. Int J Geriatr Psychiatry. 2004;19(2):136–43.
31. Beck AT, et al. Comparison of Beck Depression inventories -IA and -II in psychiatric outpatients. J Pers Assess. 1996;67(3):588–97.
32. Crook TH 3rd, Feher EP, Larrabee GJ. Assessment of memory complaint in age-associated memory impairment: the MAC-Q. Int Psychogeriatr. 1992;4(2):165–76.
33. Pfeffer RI, et al. Measurement of functional activities in older adults in the community. J Gerontol. 1982;37(3):323–9.
34. Albert MS, et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement. 2011;7(3):270–9.
35. Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. Scand J Gastroenterol. 1997;32(9):920–4.
36. Dornieden S, et al. Characterization of a single-chain variable fragment recognizing a linear epitope of aβ: a biotechnical tool for studies on Alzheimer's disease? PLoS ONE. 2013;8(3):e59820.
37. Qian XH, Xie RY, Liu XL, Tang HD. Mechanisms of short-chain fatty acids derived from Gut microbiota in Alzheimer's disease. Aging Dis. 2022;13(4):1252–66.
38. Vogt NM, et al. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. Sci Rep. 2017;7(1):13537.
39. Vandeputte D, et al. Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. Gut. 2016;65(1):57–62.
40. Vanderstichele H, et al. Potential sources of interference on Abeta immunoassays in biological samples. Alzheimers Res Ther. 2012;4(5):39.
41. Dimeski G. Interference testing. Clin Biochem Rev. 2008;29(Suppl 1):S43–8.
42. Park JY, Kricka LJ. Chap. 5.*3 - interferences in Immunoassay*. The Immunoassay Handbook (Fourth Edition). Oxford: Elsevier; 2013. pp. 403–16. D. Wild, Editor.
43. Andreasson U, et al. A practical guide to Immunoassay Method Validation. Front Neurol. 2015;6:179.
44. Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. Clin Biochem Rev. 2008;29(Suppl 1):S49–52.
45. van de Merbel N, et al. Stability: recommendation for best practices and harmonization from the Global Bioanalysis Consortium Harmonization Team. Aaps j. 2014;16(3):392–9.
46. Vanderstichele HM, et al. Optimized standard operating procedures for the analysis of Cerebrospinal Fluid Aβ42 and the ratios of Aβ isoforms using low protein binding tubes. J Alzheimers Dis. 2016;53(3):1121–32.
47. Salvadores N, et al. Detection of misfolded Aβ oligomers for sensitive biochemical diagnosis of Alzheimer's disease. Cell Rep. 2014;7(1):261–8.
48. Teunissen CE, et al. Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease: towards clinical implementation. Lancet Neurol. 2022;21(1):66–77.

49. Paraskevaidi M et al. Diagnostic Biomarkers for Alzheimer's Disease Using Non-Invasive Specimens. J Clin Med, 2020. 9(6).
50. Lewczuk P, Łukaszewicz-Zając M, Mroczko P, Kornhuber J. Clinical significance of fluid biomarkers in Alzheimer's disease. Pharmacol Rep. 2020;72(3):528–42.
51. Phadia-AB. *Stool Extraction Kit plus / Stool Extraction Buffer plus, instruction for use: 200/250/2500/5000-6665-020 / UK, version 2021-09-14.*. 2021; Available on https://dfu.phadia.com/Data/Pdf/6130cb9570eec660e274806b.pdf [Accessed 23 January 2023].].
52. ORGENTEC-Diagnostika-GmbH. Calprotectin, instruction for use: ORG 580_4, version ORG 580_IFU_EN_QM140866_2022-03-08_4. 2022; Available on https://products.orgentec.com/pdfs/ifu/ORG%20580_IFU_EN_QM140866_2022-03-08_4.pdf [Accessed 23 January 2023].].
53. Immundiagnostik-AG. *IDK Hemoglobin ELISA: For the in vitro determination of hemoglobin in stool, instruction for use: K 7816D, K7816D.20, version 2022-02-22.* 2022; Available on https://www.immundiagnostik.com/media/pages/testkits/k-7816d/9a63870b70-1663639307/k7816d_2022-02-22_haemoglobin.pdf [Accessed 23 January 2023].].
54. Demeditec-Diagnostics-GmbH. *Calprotectin ELISA, instruction for use: DE849 V211014/DLB, version 2021-11-25.*. 2021; Available on https://www.demeditec.de/de/produkte/calprotectin-elisa-de849/ifu-de849-calprotectin-elisa-211125-e.pdf [Accessed 23 January 2023].].
55. Bühlmann-Laboratories. Bühlmann Smart-Prep - Faecal sample preparation kit, Instruction for use: B-CAL-RD, version 2010-11-10. 2010; Available on https://www.buhlmannlabs.ch/wp-content/uploads/2015/01/B-CAL-RD_101110.pdf [Accessed 23 January 2023].].
56. Minic R, Zivkovic I. *Optimization, Validation and Standardization of ELISA*. 2020.
57. Schoonenboom NS, et al. Effects of processing and storage conditions on amyloid beta (1–42) and tau concentrations in cerebrospinal fluid: implications for use in clinical practice. Clin Chem. 2005;51(1):189–95.
58. Yang T, et al. A highly sensitive novel immunoassay specifically detects low levels of soluble Aβ oligomers in human cerebrospinal fluid. Alzheimers Res Ther. 2015;7(1):14.
59. Savage MJ, et al. A sensitive aβ oligomer assay discriminates Alzheimer's and aged control cerebrospinal fluid. J Neurosci. 2014;34(8):2884–97.
60. Herskovits AZ, et al. A Luminex assay detects amyloid β oligomers in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. PLoS ONE. 2013;8(7):e67898.
61. Fukumoto H, et al. High-molecular-weight beta-amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. Faseb j. 2010;24(8):2716–26.
62. Hölttä M, et al. Evaluating amyloid-β oligomers in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease. PLoS ONE. 2013;8(6):e66381.

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

2.3 Quantifizierung fäkaler α-Syn-Aggregate in humanen Stuhlproben

Titel	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 Bannach, Gereon R. Fink, Dieter Willbold, Michael Sommerauer, Michael T. Barbe und Gültekin Tamgüney
Journal	**npj Parkinson's Disease (2023)**
DOI	10.1038/s41531-023-00458-4
Beitrag	**Eigener Anteil** ▪ Koordinierung der Probensammlung, Transport und Biobanking ▪ Mitwirkung bei der Probenverarbeitung ▪ Diskussion der Ergebnisse ▪ Beteiligung beim Korrigieren des Manuskripts
Ergänzende Informationen	Schaffrath et al. Supplementary Material
Druckgenehmigung	**s. Anhang 5.6**

npj | parkinson's disease

www.nature.com/npjparkd

ARTICLE OPEN

Check for updates

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

Anja Schaffrath[1], Sophia Schleyken[2], Aline Seger[2], Hannah Jergas[2], Pelin Özdüzenciler[1], Marlene Pils[1,3], Lara Blömeke[1,3], Anneliese Cousin[1], Johannes Willbold[1], Tuyen Bujnicki[1], Oliver Bannach[1,3,4], Gereon R. Fink[2,5], Dieter Willbold[1,4], Michael Sommerauer[2,5], Michael T. Barbe[2] and Gültekin Tamgüney[1,4]✉

Misfolded and aggregated α-synuclein is a neuropathological hallmark of Parkinson's disease (PD). Thus, α-synuclein aggregates are regarded as a biomarker for the development of diagnostic assays. Quantification of α-synuclein aggregates in body fluids is challenging, and requires highly sensitive and specific assays. Recent studies suggest that α-synuclein aggregates may be shed into stool. We used surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) to detect and quantify single particles of α-synuclein aggregates in stool of 94 PD patients, 72 isolated rapid eye movement sleep behavior disorder (iRBD) patients, and 51 healthy controls. We measured significantly elevated concentrations of α-synuclein aggregates in stool of iRBD patients versus those of controls ($p = 0.024$) or PD patients ($p < 0.001$). Our results show that α-synuclein aggregates are excreted in stool and can be measured using the sFIDA assay, which could support the diagnosis of prodromal synucleinopathies.

npj Parkinson's Disease (2023)9:14 ; https://doi.org/10.1038/s41531-023-00458-4

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies (DLB), and multiple system atrophy (MSA) are synucleinopathies characterized by the oligomerization and aggregation of α-synuclein into assemblies rich in cross-beta structure, which is a critical event in the pathogenesis of these diseases[1–6]. Because α-synuclein fibrils deposit in Lewy bodies and Lewy neurites in neurons in PD and DLB or in neuronal and glial cytoplasmic inclusions in MSA, small oligomeric intermediates of α-synuclein that are still soluble are thought to be the most toxic to neurons[7–9]. The diagnosis of synucleinopathies primarily relies on clinical assessment and brain imaging, which are either imprecise or costly, especially during early disease stages, highlighting the urgent need for a biomarker for early and reliable disease detection[10,11]. Also, for potential therapies to be most effective, detecting synucleinopathies at early stages may be advantageous when the burden of pathologic α-synuclein and neuronal loss are minimal. In the prodromal stage of synucleinopathies, non-motor symptoms, such as hyposmia and gastrointestinal dysfunction, can appear as early symptoms up to 20 years before cardinal motor symptoms manifest[10,12]. Also, most patients with isolated rapid eye movement (REM) sleep behavior disorder (iRBD), a parasomnia characterized by REM sleep without atonia and vivid dream enactment, convert to PD, DLB, or MSA within 10–20 years of diagnosis[13,14]. IRBD patients display many non-motor symptoms seen in PD patients including hyposmia, orthostatic hypotension, and gastrointestinal dysfunction[15]. Importantly, iRBD patients also accumulate pathologic α-synuclein assemblies in the central and peripheral nervous system[16,17]. Besides the nervous system and cerebrospinal fluid (CSF), α-synuclein aggregates have been detected in skin, olfactory mucosa, saliva, tears, urine, and blood of PD patients, which may all serve as potential sources for diagnosing synucleinopathies[18–26]. Histological findings also show that enteric neurons in the gastrointestinal submucosa of PD patients contain pathologic α-synuclein, even at prodromal stages[27–29]. Together with findings of pathological α-synuclein in the enteric nervous system (ENS) and the dorsal motor nucleus of the vagus nerve and the anterior olfactory bulb as the earliest lesion sites in PD, Braak and colleagues postulated the dual-hit hypothesis suggesting that α-synuclein pathology spreads from the olfactory bulb to the temporal lobes, and from the ENS via the vagus nerve to the CNS[30,31]. Further, several studies suggest that pathologic α-synuclein assemblies have prion-like properties, allowing them to multiply and propagate between neurons in the nervous system and to spread across large distances in the brain and body, including from the ENS to the CNS and vice versa[32–35].

Earlier findings in transgenic TgM83$^{+/-}$ mice expressing human α-synuclein demonstrated that α-synuclein fibrils used for an oral challenge could cross the mucosal barrier of the gastrointestinal tract after which they invaded the nervous system and triggered a synucleinopathy in these mice[36]. Here, we hypothesized that human pathologic α-synuclein assemblies released from, e.g., affected enteric neurons may traverse the mucosal lining of the gastrointestinal tract and be excreted in stool. This would involve a mechanism similar to the environmental shedding of prions in feces of deer and elk infected with chronic wasting disease or that of sheep and goats infected with scrapie[37,38].

It remains challenging to specifically detect protein aggregates in body fluids as the expected concentrations are very low, requiring a high sensitivity that standard techniques such as ELISA do not provide[39]. Moreover, monomers are present in great excess, necessitating that assays have a high selectivity for oligomers. To overcome these challenges in detecting aggregated α-synuclein assemblies, we used the sFIDA (surface-based fluorescence intensity distribution analysis) assay, which uses antibodies targeting overlapping or identical epitopes, enabling it to specifically detect

[1]Institute of Biological Information Processing (Structural Biochemistry: IBI-7), Forschungszentrum Jülich, 52428 Jülich, Germany. [2]Department of Neurology, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, 50923 Köln, Germany. [3]attyloid GmbH, 40225 Düsseldorf, Germany. [4]Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany. [5]Cognitive Neuroscience, Institute of Neuroscience and Medicine (INM-3), Forschungszentrum Jülich, 52428 Jülich, Germany. ✉email: erdem@fz-juelich.de

Published in partnership with the Parkinson's Foundation

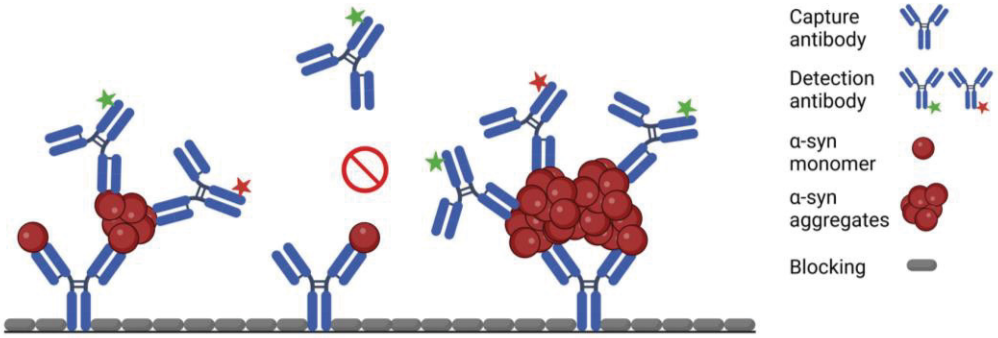


Fig. 1 Schematic figure of the sFIDA assay principle. The glass surface of a microtiter plate is coated with a capture antibody (Syn211) against amino acid residues 121–125 of α-synuclein. The capture antibody binds both α-synuclein monomers and aggregates in the sample. The detection antibody (Syn211), a 1:1 mixture of this antibody labeled with fluorescent dye CF633 or CF488A, can only detect aggregates since it is directed against the same epitope as the capture antibody. The epitope on the monomer bound to the capture antibody is masked by the capture antibody and can, thus, not be bound by the detection antibody. The microtiter plate wells are imaged by two-channel confocal fluorescence microscopy to detect single particles. Only particles decorated with at least two different detection antibodies (colocalized signal) contribute to the sFIDA readout signal. The image was created with BioRender.com.

Table 1. Demographic and clinical information on patients and controls that donated stool samples.

	PD	iRBD	HC	*p* (PD vs. HC)	*p* (PD vs. iRBD)	*p* (iRBD vs. HC)
Number	94	72	51	N/A	N/A	N/A
Female [number (percentage)]	29 (30.9)	10 (13.9)	31 (60.8)	0.001	n.s.	$p < 0.001$
Age [years ± SD]	64.5 ± 9.9	66.3 ± 6.4	56.4 ± 17.1	n.s.	n.s.	$p < 0.05$
Education [years ± SD]	15.4 ± 4.1	15.9 ± 4.0	16.0 ± 3.3	n.s.	n.s.	n.s.
Disease duration [years ± SD]	9.0 ± 5.8	7.4 ± 5.5	N/A	N/A	n.s.	N/A
DemTect [score ± SD]	13.8 ± 3.3	14.8 ± 2.3	15.9 ± 2.3	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.05$
MDS-UPDRS III [score ± SD]	24.1 ± 14.9	4.0 ± 2.7	N/A	N/A	$p < 0.001$	N/A
Non-Motor Symptoms Scale [score ± SD]	30.6 ± 23.1	16.2 ± 18.0	12.5 ± 14.4	$p < 0.001$	$p < 0.001$	n.s.
CCCSS [score ± SD]	4.1 ± 4.0	2.8 ± 2.7	2.5 ± 2.5	$p < 0.05$	$p < 0.05$	n.s.
Scent [score ± SD]	5.3 ± 2.6	6.6 ± 2.7	10.4 ± 1.7	$p < 0.001$	$p < 0.05$	$p < 0.001$
Screening questionnaire for parkinsonism [score ± SD]	5.6 ± 2.2	0.3 ± 0.8	0.3 ± 0.8	$p < 0.001$	$p < 0.001$	n.s.
IRBD screening questionnaire [score ± SD]	4.9 ± 3.0	9.0 ± 2.7	1.7 ± 1.6	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
Hoehn and Yahr [score ± SD]	3.0 ± 0.9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Levodopa challenge test [% ± SD]	40 ± 20	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

PD Parkinson's disease, *iRBD* isolated rapid eye movement sleep behavior disorder, *HC* healthy control, *SD* standard deviation, *MDS-UPDRS III* Movement Disorder Society's Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part III, *CCCSS* Cleveland Clinic Constipation Scoring System, *N/A* not available, *n.s.* not significant.

aggregates in the presence of monomers[40–43]. Here, the Syn211 antibody that recognizes amino acids 121–125 on α-synuclein is attached to a glass surface and captures α-synuclein species in stool homogenates[44]. Next, the captured α-synuclein species are detected with a blend of two Syn211 antibodies, each labeled with a different fluorescent dye, one green and one red (Fig. 1). The surface is then scanned by two-channel fluorescent confocal microscopy, yielding single particle sensitivity. Because the Syn211 antibody only recognizes a single linear epitope on α-synuclein, using the same Syn211 antibody to capture and detect α-synuclein species guarantees specific quantitation of only aggregated α-synuclein species. Monomers with a single linear epitope are captured but cannot be detected and are thus disregarded. Since the sFIDA assay in its current version does not differentiate between α-synuclein species from small oligomers to large fibrils, we refer to analytes measured in sFIDA as aggregates.

We recently used sFIDA to quantitate α-synuclein and tau aggregates in CSF of patients with PD, DLB, and other neurodegenerative diseases, showing that sFIDA is a reliable, highly sensitive, and robust assay for the diagnosis of neurodegenerative diseases and drug development[40]. The aim of this study was to detect and quantify α-synuclein aggregates in human stool and, more importantly, to demonstrate its possible use in a clinical setting and potentially for drug development. We adapted the sFIDA assay to quantify α-synuclein aggregates in stool samples of 217 subjects. We technically validated this assay by assessing parameters like the limit of detection (LOD), coefficient of variation (CV%), inter-assay correlation, and cross-reactivity to other aggregates.

RESULTS

Descriptive analysis of the patient and control groups

We collected stool samples of PD ($n = 94$) and iRBD patients ($n = 72$) and healthy controls (HC) without past or present neurological disorder ($n = 51$) to determine if and how much α-synuclein aggregates they contain. Demographic and clinical information for these three cohorts on sex, age, education, disease duration, memory, motor, non-motor, olfactory, constipation, and further information are available in Table 1, and for individual

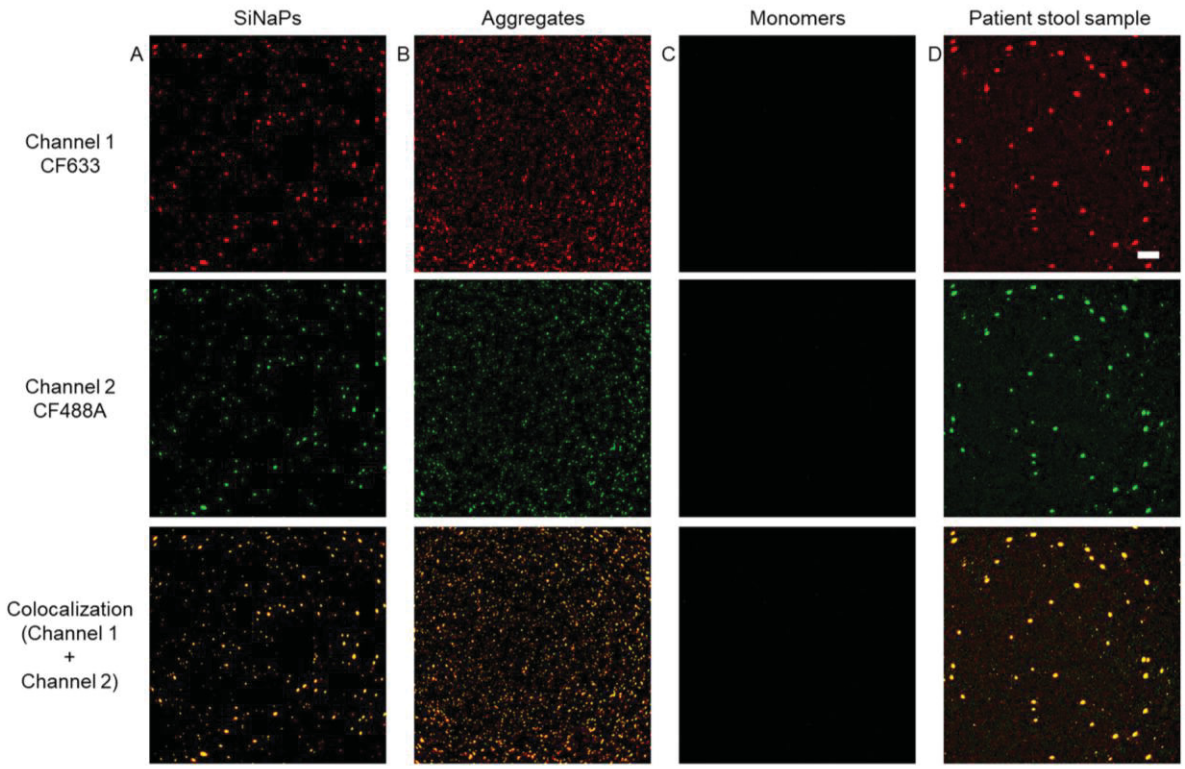


Fig. 2 Fluorescence images of α-synuclein SiNaPs, synthetic α-synuclein aggregates, monomers, and a PD stool sample. Shown are exemplary fluorescence images taken in the red fluorescence channel (channel 1, CF633), green fluorescence channel (channel 2, CF488A), and the colocalized fluorescence signal of both channels of **a** 0.32 pM α-synuclein SiNaPs in buffer **b** 1581 pM synthetic α-synuclein aggregates in buffer (concentration based on the deployed monomer concentration), **c** 1000 pM α-synuclein monomers in buffer, and **d** a stool sample of a PD patient. To better visualize the 16-bit images, the contrast and minimum/maximum values were adjusted. Scale bar: 30 µm.

patients and healthy controls in Supplementary Table 1. There was a gender bias towards men in the PD (69.1%) and more so in the iRBD (86.1%) cohort. In the control group, gender bias was slightly more towards women (60.8%). The age of PD (64.5 ± 9.9 years) and iRBD patients (66.3 ± 6.4 years) did not significantly differ, while healthy controls were on average 8–10 years younger (56.4 ± 17.1 years). We did not observe significant differences in the duration of education between the three groups. Disease duration in PD patients was 9.0 ± 5.8 years and in iRBD patients 7.4 ± 5.5 years. The cognitive performance (DemTect score) of healthy controls (15.9 ± 2.3) was significantly higher than that of PD (13.8 ± 3.3) and iRBD patients (14.8 ± 2.3, Supplementary Fig. 1a)[45]. PD patients (24.1 ± 14.9) scored significantly higher than iRBD patients (4.0 ± 2.7) on the Movement Disorder Society's Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part III (MDS-UPDRS III)[46]. Equally, PD patients (30.6 ± 23.1) scored significantly higher on the Non-Motor Symptoms Scale (NMSS) for PD than iRBD patients (16.2 ± 18.0) or healthy controls (12.5 ± 14.4, Supplementary Fig. 1b)[47]. Also, PD patients (4.1 ± 4.0) were significantly more constipated than iRBD patients (2.8 ± 2.7) and healthy controls (2.5 ± 2.5), based on the Cleveland Clinic Constipation Scoring System (Supplementary Fig. 1c)[48]. PD patients (5.3 ± 2.6) also suffered more from hyposmia (Supplementary Fig. 1d), reflected in a significantly lower scent score, than iRBD patients (6.6 ± 2.7) or healthy controls (10.4 ± 1.7). In addition, PD patients (5.6 ± 2.2) scored significantly higher in the screening questionnaire for parkinsonism compared to iRBD patients (0.3 ± 0.8) and healthy controls (0.3 ± 0.8, Supplementary Fig. 1e)[49]. The results of the RBD screening questionnaire (RBDSQ, Supplementary Fig. 1f) also showed significant differences between iRBD (9.0 ± 2.7) and PD patients (4.9 ± 3.0) or healthy controls (1.7 ± 1.6), as well as between PD patients and healthy controls[50]. On average, PD patients scored 3.0 ± 0.9 on the Hoehn and Yahr scale and 40 ± 20% on the levodopa challenge test[51].

sFIDA measurements of α-synuclein silica nanoparticles (SiNaPs) and stool samples show a low intra-assay variance

As a standard for signal calibration and LOD calculation, we used silica nanoparticles (SiNaPs), each carrying multiple monomers of α-synuclein[42]. Figure 2 shows exemplary images of the α-synuclein SiNaPs standard, synthetic α-synuclein aggregates, the buffer control, and a PD stool sample for the red fluorescence channel (channel one), the green fluorescence channel (channel two), and the colocalized signal of both channels. For analysis, only colocalized pixels (sFIDA readout) were utilized. Because of the high number of samples, the measurements had to be performed on nine 384-well microtiter plates. For all experiments, the mean intra-assay coefficient of variation (CV%) was calculated from the sFIDA readout of the four replicates of each sample to be 28.4% for the α-synuclein SiNaPs standard and 26.3% for the stool samples (Supplementary Table 2).

Repeated sFIDA measurements of α-synuclein aggregates in stool samples show a low inter-assay variance

To assess the inter-assay variance between independent sFIDA assays, we repeatedly measured 50 randomly selected stool

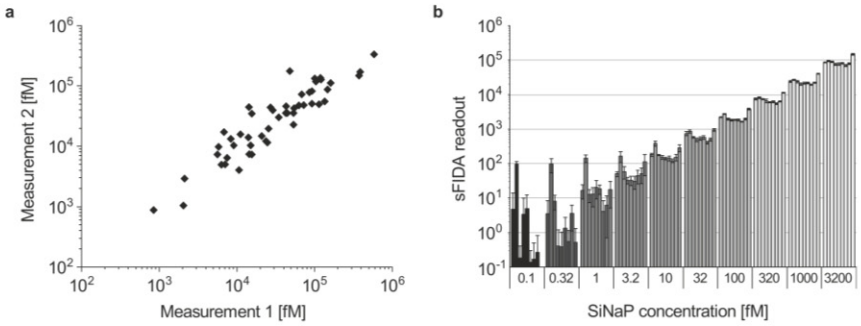


Fig. 3 Repeated measurements of α-synuclein aggregates in stool and of α-synuclein SiNaPs yield highly replicable results. We tested the inter-assay variance of the sFIDA assay for α-synuclein aggregates. **a** Repeated measurements of 50 randomly selected stool samples by the same operator in the same laboratory on different days were highly reproducible with a Spearman coefficient of correlation of $r = 0.916$ ($p = 0.2 \times 10^{-6}$). **b** Nine independent measurements of a dilution series of the α-synuclein SiNaPs used for calibration of the stool sample data set also showed highly replicable results for all concentrations with a Spearman coefficient of correlation of $r = 0.979$ ($p = 3.85 \times 10^{-62}$). Error bars indicate standard deviation.

samples on two different days. Both measurements showed a significant correlation with a Spearman correlation coefficient of $r = 0.916$ ($p = 0.2 \times 10^{-6}$) (Fig. 3a). Next, we confirmed the reproducibility of the assay by repeatedly measuring the α-synuclein SiNaPs standard used for calibrating all stool samples in nine independent assays (Fig. 3b). The repeated measurements yielded highly reproducible results with a Spearman correlation coefficient of $r = 0.979$ ($p = 3.85 \times 10^{-62}$).

sFIDA measurements of α-synuclein aggregates are highly selective

To further evaluate the sFIDA assay, we examined the ability of unspecific binding of synthetic α-synuclein aggregates or α-synuclein SiNaPs to the surface of the 384-well microtiter plate by comparing the readout in the presence and absence of a capture antibody. Relative to the readouts of α-synuclein aggregates and SiNaPs measured with a capture antibody, readouts without a capture antibody were reduced by 97% and 96%, respectively (Fig. 4a). We also measured samples in the absence of detection antibodies. This reduced the readout for synthetic α-synuclein aggregates fully (100%), which became indistinguishable from the generally low buffer control (BC) and for α-synuclein SiNaPs by 98%. Additionally, we tested the ability of the sFIDA assay to detect monomeric α-synuclein. As shown in Fig. 4b, the readout for α-synuclein monomers was as negligible as the BC readout and much lower than the readout of the positive control, which consisted of synthetic α-synuclein aggregates made from the same monomer concentration. Our results show that the potential presence of monomeric α-synuclein in stool, which most probably is degraded in this particular environment, did not influence the sFIDA readout. To determine the cross-reactivity of the sFIDA assay, we used the NAB228 antibody against amyloid-beta (Aβ) as a capture antibody and synthetic α-synuclein aggregates or SiNaPs as samples. This reduced the sFIDA readout for synthetic α-synuclein aggregates by 98% and that for α-synuclein SiNaPs by almost 100% (Fig. 4b).

At last, to determine the selectivity of the sFIDA assay, we measured synthetic Aβ aggregates and Aβ SiNaPs using the Syn211 antibody against α-synuclein for capture and detection. As a positive control for detecting Aβ aggregates and SiNaPs, we used NAB228 as a capture antibody and 6E10 and IC16 as detection antibodies. In contrast to this antibody combination specific for Aβ, antibodies specific for α-synuclein did not detect Aβ aggregates or Aβ SiNaPs (Fig. 4c).

Immunodepletion removes α-synuclein aggregates in samples

To prove that sFIDA measurements are selective for α-synuclein aggregates, we performed an immunodepletion. Samples were incubated with dynabeads coupled to the Syn211 antibody specific for α-synuclein to remove α-synuclein aggregates in stool or α-synuclein SiNaPs. As a further control, samples were also incubated with blank dynabeads not coupled to antibodies for mock immunodepletions. After immunodepletion, supernatants were analyzed with sFIDA. The sFIDA readout for immunodepleted stool samples was on average decreased by 73%, and for immunodepleted α-synuclein SiNaPs by 100% (Fig. 5a, b). Mock immunodepletion of the same samples resulted in a reduction of only about 7% compared to readouts without immunodepletion (Fig. 5b). This minimal reduction could have been caused by proteolytic digestion or disassembly of aggregates, or unspecific adhesion of aggregates to beads during incubation at room temperature.

sFIDA detects attomolar concentrations of α-synuclein SiNaPs

The sensitivity of the sFIDA assay was determined using the α-synuclein SiNaPs standard. To achieve this, a one-sided Mann-Whitney U test was applied to determine the lowest concentration significantly different from the buffer control for each SiNaPs standard to standardize the calibration range and determine the LOD. Based on these results, the lower limit of the calibration curve was set to 0.32 fM and the upper limit to 3200 fM. In all experiments, we observed a correlation between the sFIDA readout and the corresponding SiNaPs concentration with a Spearman correlation coefficient of $r = 0.979$ ($p = 3.85 \times 10^{-62}$). After calibration, the mean LOD was 0.3 fM for all experiments (for individual LOD values see Supplementary Table 3). For all measured samples, aggregate concentrations were above the LOD of the associated experiment (Supplementary Table 4).

α-Synuclein aggregate concentrations are elevated in stool of iRBD patients

We finally used the sFIDA assay to measure α-synuclein aggregate concentrations in stool of PD and iRBD patients, and healthy controls. Using the α-synuclein SiNaPs standard, we calibrated the sFIDA readout of all samples and calculated α-synuclein aggregate concentrations (Supplementary Table 1). Statistical analyses were performed using non-parametric tests because none of the three groups showed a normal distribution (p-value < 0.05, Supplementary Table 5). The median concentration of α-synuclein aggregates in stool samples of iRBD patients (9.2 fM) was significantly elevated compared to those of the control group (5.2 fM, $p = 0.024$) as well as

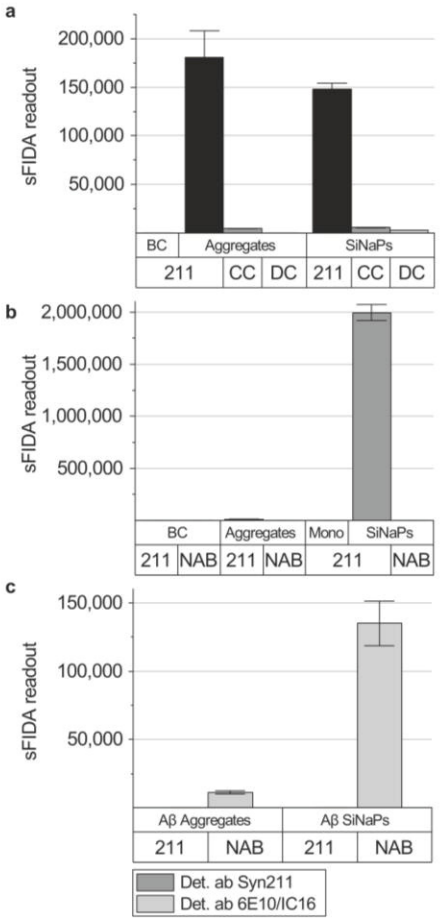


Fig. 4 sFIDA with antibodies against α-synuclein specifically detects α-synuclein aggregates and α-synuclein SiNaPs but not α-synuclein monomers, Aβ aggregates, or Aβ SiNaPs. a When either the capture antibody or the detection antibodies were omitted (capture control (CC), detection control (DC)), the sFIDA readout for the CC was reduced by 96% for α-synuclein SiNaPs and 97% for α-synuclein aggregates of the respective readout with a capture antibody. For the DC, the sFIDA readout was reduced by 98% for α-synuclein SiNaPs, and entirely for α-synuclein aggregates (100%), where the sFIDA readout was indistinguishable from the buffer control (BC). **b** The sFIDA readout of α-synuclein SiNaPs and α-synuclein aggregates, when captured with the NAB228 antibody against beta-amyloid (Aβ), was reduced by almost 100% for α-synuclein SiNaPs and 98% for synthetic α-synuclein aggregates compared to the signal with Syn211 capture antibody. The sFIDA readout of α-synuclein monomers (Mono) was reduced to the level of the BC compared to the same concentration of monomers in aggregated α-synuclein. **c** Additionally, Aβ aggregates and Aβ SiNaPs were captured and detected with the Syn211 antibody against α-synuclein. As a positive control, the same Aβ aggregates and Aβ SiNaPs were captured with antibodies specific to Aβ (capture antibody: NAB228, detection antibodies: 6E10/IC16). The graph shows that the Syn211 antibody does not detect Aβ aggregates or Aβ SiNaPs. Error bars indicate standard deviation.

those of PD patients (3.8 fM, $p < 0.001$) when using the Kruskal–Wallis *H* test (Fig. 6a). Our findings for the iRBD cohort remained significant when the two highest outliers in this cohort were ignored or when adjusted for sex ($p < 0.001$). No difference was detected between PD patients and the control group. Receiver operating characteristic (ROC) curves (Fig. 6b) revealed a high sensitivity (>75%) of the sFIDA assay in detecting α-synuclein aggregates in stool of iRBD patients versus healthy controls or PD patients but a lower specificity (iRBD vs. PD: 52.1%; iRBD vs. HC: 49.0%; Table 2). In contrast, the sFIDA assay was highly specific (96.1%) but much less sensitive (6.4%) in detecting α-synuclein aggregates in stool samples of PD patients versus healthy controls. We also observed a weak positive correlation with a Spearman coefficient between the DemTect score and α-synuclein aggregate concentrations ($r = 0.221$, $p < 0.05$), and between the RBDSQ score and α-synuclein aggregate concentrations ($r = 0.223$, $p < 0.05$), but no other correlations in stool of PD patients, iRBD patients or healthy controls (Supplementary Table 6).

DISCUSSION

We demonstrated that α-synuclein aggregates can be detected and quantified in stool, proving that not only α-synuclein aggregates are secreted from the body into the lumen of the gastrointestinal tract and excreted in stool, but also that the sFIDA assay can be applied to stool samples to reveal the existence of α-synuclein aggregates in a subgroup of humans. To investigate the origin and fate of α-synuclein aggregates in the gastrointestinal tract is essential in the future. Also, this provides opportunities to explore the concentration of α-synuclein aggregates in stool for the diagnosis of neurodegenerative diseases. By omitting the Syn211 capture or detection antibodies, changing the Syn211 capture antibody to one specific for Aβ, or changing the substrate to α-synuclein monomers, Aβ aggregates, or Aβ SiNaPs, we showed that the stool-adapted sFIDA assay measures α-synuclein aggregate and α-synuclein SiNaP concentrations very specifically and sensitively over a wide range of concentrations. We observed an overlap between patients and healthy controls, resulting in a specificity of 49.0% and a sensitivity of 76.4% for discriminating iRBD patients from healthy controls, and a specificity of 52.1% and a sensitivity of 80.6% for discriminating iRBD and PD patients. We were unable to discriminate PD patients from healthy controls. Our results are less specific but almost as sensitive as other studies aiming to discriminate α-synuclein aggregate concentrations in CSF samples of different synucleinopathies from healthy controls[40,52,53]. We are not aware of any other studies that have attempted to quantify α-synuclein aggregate concentrations in stool, making a comparison of our results with previous ones, e.g., in CSF is not straightforward. All measured stool samples showed concentrations above the determined LOD with values between 0.1 M and 100 pM, with the majority of the samples (87%) showing concentrations between 1 fM and 300 fM. Surprisingly, stool of iRBD patients showed significantly elevated levels of α-synuclein aggregates compared to healthy controls. In contrast to this, stool of PD patients not only showed significantly lower levels of α-synuclein aggregates than those of iRBD patients but also showed no difference to healthy controls (Fig. 6a). For CSF, it has previously been shown that α-synuclein aggregate concentrations are significantly elevated in PD and iRBD patients compared to healthy controls[24,40,52,54]. Further, several longitudinal studies in PD patients showed an increase of aggregated α-synuclein in CSF with disease progression[55,56]. One explanation of why we did not observe an increase of α-synuclein aggregate concentrations in stool of PD patients or a correlation with age or disease duration may be the recently proposed "brain-first" and "body-first" PD subtypes with different affection of the ENS, making it harder to observe a difference to healthy controls[57–59]. Still, separation of potential brain-first and body-first PD is most reliable in de novo PD using polysomnography to detect RBD. As we had mid-stage PD samples and only a questionnaire-based evaluation of RBD symptoms, we could not reliably separate our PD patient cohort in brain-first and body-first PD subtypes. Another explanation might be that levels of α-synuclein aggregates in stool of PD patients do not behave like those in CSF. More α-synuclein aggregates could be excreted in stool during prodromal and early phases of PD and

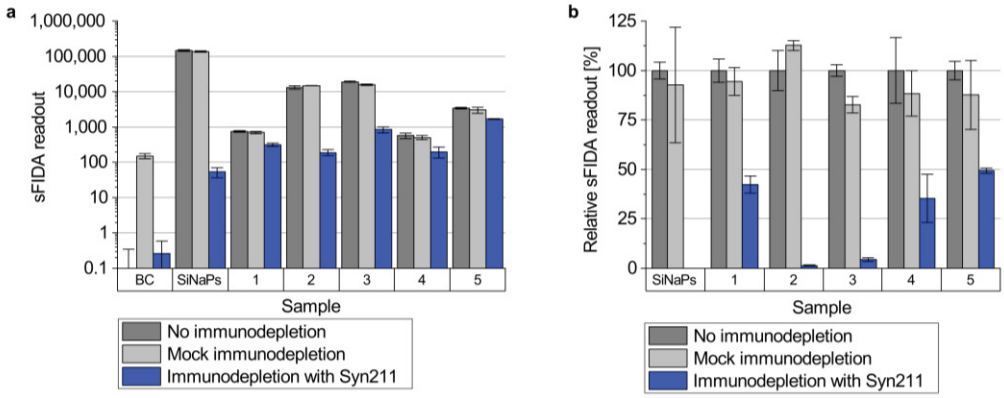


Fig. 5 Immunodepletion of α-synuclein SiNaPs and α-synuclein aggregates in stool samples. a The α-synuclein SiNaPs standard and five stool samples were immunodepleted with magnetic beads coupled to Syn211 antibodies and, as a mock immunodepletion, without coupled antibodies. Immunodepletion entirely eliminated the sFIDA readout for α-synuclein SiNaPs (100%) and reduced that for α-synuclein aggregates in stool samples on average by 73%, ranging from 51% to 99% for different samples. Mock immunodepletion did not significantly affect the sFIDA readout with a reduction of about 7% for stool samples and α-synuclein SiNaPs. **b** The relative sFIDA readout [%] value represents the percent ratio of the sFIDA readouts of (mock) depleted to non-depleted samples.

less in advanced stages, similar to decreases in CSF concentrations of $A\beta_{42}$ during the course of Alzheimer's disease[60]. One could also speculate that the α-synuclein aggregates in stool during very early disease stages may not exclusively be shed into the gastrointestinal tract by affected submucosal neurons but also by a systemic disposal mechanism for α-synuclein aggregates via liver and bile that becomes less efficient during later disease stages. This may explain why α-synuclein aggregate concentrations in stool and CSF correlate well during early disease stages but less in later stages. To better understand the dynamics of α-synuclein aggregate shedding or release into stool, concentrations in longitudinally collected stool samples of iRBD and PD patients need to be assessed.

Our data show that iRBD patients with a high risk of developing synucleinopathies have significantly higher levels of α-synuclein aggregates in stool compared to healthy controls, stressing the value of the sFIDA assay in early disease detection[13]. Stool, next to CSF, skin, and nasal mucosa, where α-synuclein aggregates accumulate in iRBD patients, is now an additional valuable and easily accessible resource with a potential for diagnostic purposes[52,61–63]. Whether iRBD patients with high concentrations of α-synuclein aggregates in stool are more likely to convert faster to PD, DLB, or MSA, or are more likely to develop a particular type of synucleinopathy remains to be determined. Interestingly, we also measured high α-synuclein aggregate concentrations in stool of some control subjects. This could be either due to prodromal iRBD/PD pathology or other factors in the gastrointestinal tract that may cause a disease-independent aggregation of α-synuclein. According to the presumption mentioned above, it could also mean that these subjects still do have a very efficient disposal system for α-synuclein aggregates into the stool. It will be essential to assess whether these individuals are showing other prodromal signs of PD and to monitor them longitudinally.

This study has several limitations. Due to the specificity of the Syn211 antibody, which recognizes epitopes 121–125 of α-synuclein, this sFIDA assay cannot detect aggregates that are solely composed of fragments missing the C-terminus with this epitope, or have this epitope masked due to posttranslational nitration or phosphorylation of tyrosine 125[44,64]. However, the abundance of α-synuclein aggregates where all α-synuclein molecules within one aggregate may be missing this particular epitope or have it masked is likely to be very small. Furthermore, more recent studies suggest that tyrosine 125 of α-synuclein may not be phosphorylated in PD and DLB[65]. Also, sFIDA does not distinguish between α-synuclein aggregates that are seeding-incompetent or harmless to neurons (off-pathway) and those that may be harmful to neurons (on-pathway)[66,67].

The sensitivity and specificity of this assay may be improved, for example, by combining measurements of aggregated α-synuclein with those of other potential biomarkers like phosphorylated α-synuclein, tau, glial fibrillary acidic protein, or neurofilament light chain that are expressed in the ENS and may be altered early in disease[68–71]. Another approach to improve this assay could be to extract and concentrate α-synuclein aggregates from stool samples, e.g., by immunoprecipitation, prior to their quantitation. Diet and the gut microbiome may likely affect the detection of α-synuclein aggregates in stool[72]. Stool has a complex matrix containing water, proteins, fatty acids, polysaccharides, bacterial biomass, undigested food residues, and bile that may inhibit antibody binding and mask α-synuclein aggregates from detection. Stool also contains proteases that may still be active during the preparation of the stool homogenates, which would mean that the measured values must be regarded as lower limits of the present α-synuclein aggregates. Also, using additional tissue and body fluid sources in combination with stool may further enhance the sensitivity and specificity of the sFIDA assay and improve diagnostic accuracy in discriminating between different patient cohorts and controls[52,61–63]. In summary, our results show that α-synuclein aggregates are excreted in stool and can be measured using the sFIDA assay, which may facilitate the diagnosis of prodromal synucleinopathies. This could be of value for developing therapies targeting early disease stages, which may result in better efficacy.

METHODS

Synthesis of protein-coated silica nanoparticles (SiNaPs)

SiNaPs were used for calibration and to test selectivity[40]. The body of the SiNaPs was synthesized via the Stöber process and the surface aminated with (3-aminopropyl)triethoxysilane. Functionalized α-synuclein peptide fragments (amino acids 115–130, Peptides and Elephants, Henningsdorf, Germany) or Aβ peptide fragments (amino acids 1–15, Peptides and Elephants, Henningsdorf, Germany) containing a cysteamine at the C-terminus were cross-linked to the surface of aminated SiNaPs functionalized with maleimidohexanoic acid, which was previously activated with 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and N-hydroxysuccinimide (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) to enable reaction of the cysteamine with the maleimide

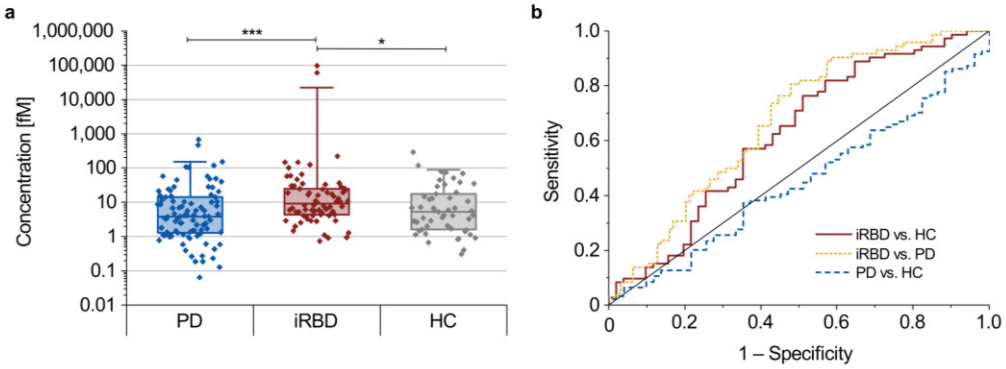


Fig. 6 Calibrated sFIDA results and receiver operating characteristic (ROC) analyses for detecting α-synuclein aggregates in stool samples. Median concentrations of α-synuclein aggregates in stool samples of iRBD patients (9.2 fM) were significantly elevated compared to those of healthy controls (HC, 5.2 fM, $p = 0.024$) or PD patients (3.8 fM, $p < 0.001$). PD patients did not significantly differ from healthy controls. Box plots indicate the lower (Q1) and upper (Q3) quartiles as boxes. Horizontal lines within boxes indicate medians. Whiskers indicate 1.5 times the interquartile range (Q3–Q1) above Q3 and below Q1. Data falling outside this range are plotted as outliers. Significant differences between groups were calculated using the Kruskal–Wallis *H* test. ***$p < 0.001$, **$0.001 \le p < 0.01$, *$0.01 \le p < 0.05$. Error bars indicate standard deviation. **b** In the ROC analyses, discrimination of PD patients versus healthy controls showed a specificity of 96.1% and a sensitivity of 6.4%, with an area under the curve (AUC) of 0.447. In comparison, discrimination of iRBD patients versus healthy controls showed a specificity of 49.0% and a sensitivity of 76.4% with an AUC of 0.622 (see Table 2 for other specificity and sensitivity values and significances).

Table 2. Results of the ROC analyses for specificity, sensitivity, and area under the curve with the respective p-value for α-synuclein aggregates in stool.

	Specificity [%]	Sensitivity [%]	AUC	*p*
iRBD vs. HC	49.0	76.4	0.622	0.021
iRBD vs. PD	52.1	80.6	0.670	1.81×10^{-4}
PD vs. HC	96.1	6.4	0.447	0.291

Parkinson's disease (PD), isolated rapid eye movement sleep behavior disorder (iRBD), healthy control (HC), area under the curve (AUC).

group. For synthesis of protein-conjugated SiNaPs, 10% of the possible binding sites were functionalized by adding protein to dispersed SiNaPs. Protein-coupled SiNaPs were subjected to ultrasonication for 10 min prior to each use. The same batches of α-synuclein or Aβ SiNaPs were used for all experiments. To serve as a calibration standard, the stock solution of α-synuclein SiNaPs was diluted in extraction buffer (EliA Calprotectin 2 Extraction Buffer (Phadia, Uppsala, Sweden) with 1× protease inhibitor cocktail (cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Basel, Switzerland)) in a half-logarithmic dilution series from 3200 to 0.1 fM.

Characterization of SiNaPs

The size and shape of the aminated SiNaPs were analyzed using transmission electron microscopy[73]. For the aminated silica core, a mean particle size of 18.5 nm was determined. Inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP-MS) was used to determine the silicon concentration. The molar concentration of the SiNaPs was calculated using the silicon concentration and the known size, density, and shape[40].

Labeling of antibodies

Fluorescent antibodies were used for microscopy-based detection of aggregates. The mouse monoclonal anti-α-synuclein Syn211 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA) was labeled with CF633 and CF488A (Biotium, Freemont, USA) and the anti-Aβ IC16 (Heinrich-Heine University, Düsseldorf, Germany) antibody was labeled with CF633 (Biotium, Freemont, USA)[40,44]. The labeling process was performed according to the manufacturer's protocol. The dyes with activated succinimidyl esters were mixed with the antibody in carbonate buffer to react covalently with the amines of the antibody. The labeled antibody was purified using a polyacrylamide bead suspension (Bio-Gel P 30 Gel, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA). The concentration and degree of labeling were determined according to the manufacturer's protocol.

Patients and healthy controls

This study was approved by the Ethics Commission of the Faculty of Medicine of the University of Cologne (19–1644). PD and iRBD patients and healthy controls were enrolled at the Department of Neurology of the University Hospital Cologne. Informed consent was obtained from all human participants. All enrolled subjects completed a basic characteristics questionnaire providing information on items, such as age, sex, handedness, years of education, and medical history. All subjects completed the validated German version of the screening questionnaire for parkinsonism originally developed by Tanner and colleagues[49], the REM sleep behavior disorder screening questionnaire (RBDSQ)[50], for which a score of six was determined as a cut-off value for detecting iRBD[74], the Cleveland Clinics Constipation Scoring System (CCCSS)[48], the Ocular Surface Disease Index (OSDI)[75], the revised Beck Depression Inventory (BDI-II)[76], the Memory Assessment Clinic Questionnaire (MAC-Q)[77], and the Functional Activities Questionnaire (FAQ)[78].

PD patients were recruited from patient charts of our outpatient clinic or the ward when patients were admitted to the hospital. Patients were diagnosed with PD ($n = 94$) according to the Movement Disorder Society Clinical Diagnostic Criteria for Parkinson's disease[79]. Clinical and demographic information, including disease duration, were acquired based on an investigator's medical reports and careful anamnesis. In addition to the basic characteristics questionnaire, PD and iRBD patients were asked to complete the Non-Motor Symptoms Scale (NMSS) questionnaire for PD[46], and the Movement Disorder Society's (MDS) Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part II (MDS-UPDRS II)[46]. Cognitive performance was assessed using DemTect[45]. Motor function was assessed with the MDS-UPDRS Part III[46]. The Hoehn and Yahr scale[51], and MDS-UPDRS Parts I and IV were rated by an investigator for each patient[46]. A smell test was performed for each subject according to a standardized procedure. Some but

not all PD patients received a DaTSCAN and a levodopa challenge test (LCT) outside of this study.

IRBD patients were part of an ongoing study ($n = 72$) recruiting a local prodromal PD cohort in Cologne through newspaper advertisements from the community. Following a structured telephone interview, subjects with a high likelihood of having iRBD were invited to undergo polysomnography (PSG). We used a mobile SOMNOscreenTM plus device for overnight PSG[80]. Visual PSG scoring was performed on 30 s epochs as well as diagnosis of iRBD according to the American Academy of Sleep Medicine's manual for the scoring of sleep and associated events, version 2.6[46].

Healthy controls ($n = 51$) were recruited by advertisement, and, in many cases, the caregivers of the PD patients agreed to participate in the study. Healthy controls were free of any neurological disease. In addition to the basic characteristics questionnaire (see above), healthy controls completed the NMSS questionnaire for PD, the RBDSQ, and a smell test. Healthy controls with an RBDSQ score greater than five were excluded from the analysis[74].

Stool samples from all subjects were collected between July 2020 and September 2021 using beakers with a screw cap and a removal spoon. Additionally, a paper towel stool catcher was used to avoid contamination. Stool samples were collected at various locations. If a stool sample was collected at home, in most cases, it was not older than two hours and stored in a plastic bag in a refrigerator until it was further processed. Pseudonymized samples were stored at −80 °C.

All patient-related data and samples were anonymized, and researchers were aware of the clinical data at the time of the sFIDA measurement. Data were subsequently tested for normal distribution (Shapiro Wilk, Lilliefors, Kolmogorov–Smirnov, Anderson Darling). A Kruskal–Wallis *H* test was used to identify differences between cohorts. If significant differences were determined, a pairwise comparison using a two-sided Mann–Whitney *U* test was conducted.

Sample preparation

Stool samples were collected at various time points using beakers with a screw cap and a removal spoon. Stool samples were thawed at room temperature (RT) for 15 min and homogenized according to the manufacturer's protocol of the EliA Stool Extraction Kit with minor changes (Phadia, Uppsala, Sweden). Using Simplix extraction tubes (Gaudlitz, Coburg, Germany), 17 mg stool were sampled and homogenized in 1300 µL cold extraction buffer through vortexing. The homogenate was centrifuged at $3000 \times g$ for 5 min at 4 °C to pellet non-soluble components. The supernatant was aliquoted and stored at −80 °C until further use.

Assay protocol

In the present study, we used SensoPlate Plus 384-well glass bottom microtiter plates (Greiner Bio-One I, Frickenhausen, Germany). The glass surface was incubated with the Syn211 antibody as capture at 7.5 µg/mL in 1x PBS buffer overnight at 4 °C. After washing five times with 80 µL TBS-T (TBS and 0.05% Tween20) and afterwards five times with TBS, the wells were blocked with 0.5% nonfat, dried milk powder in TBS-ProClin (TBS containing 0.03% ProClin) for 3 h at RT. The plate was washed again with TBS-T and TBS and 20 µL protein-conjugated SiNaPs diluted in extraction buffer, and 20 µL of the samples, thawed at RT for 15 min, were incubated for 1 h at RT. After washing five times with TBS, the wells were incubated for 1 h with the fluorescent detection antibodies Syn211-CF633 and Syn211-CF488A (each 0.625 µg/mL) in TBS-T containing 0.1% BSA, after which the wells were washed again with TBS. For measurement, the buffer in the wells was changed to TBS-ProClin. Each standard and sample were pipetted as four replicates. For detection of Aβ aggregates and Aβ SiNaPs, the NAB288 antibody (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) was used at 2.5 µg/mL in PBS buffer for capture, and the fluorescent detection antibodies IC16-CF633 and 6E10-AF488 (Biolegend, San Diego, USA) each at 0.625 µg/mL for detection. All washing steps were carried out with an automated microplate washer (405 LS Microplate Washer, BioTek, VT, USA).

Inter-assay measurements

For inter-assay measurements of the calibration curve and samples, the same assay was repeated by the same person with the same antibodies and materials. Repeatedly assayed samples were subjected to an additional freeze–thaw cycle.

Immunodepletion

Immunodepletion was performed with magnetic Dynabeads Protein G (Invitrogen, Waltham, USA) to which the Syn211 antibody was bound via the Fc region according to the manufacturer's protocol. Shortly, dynabeads were washed twice with PBS-T (PBS and 0.05% Tween20) and applied to a magnet to remove the supernatant. After washing, the beads were incubated with 0.1 mg/mL Syn211 antibody (to reach a target load of 8 µg/mL beads), shaking at 650 rpm for 100 min at RT. After two more washing steps (see above), the coated beads were diluted in PBS-T to 20 µg/mL dynabeads, respectively. To ensure that a signal loss did not result from a non-specific binding of sample components to dynabeads, we also performed a synthesis without the antibody. For immunodepletion and mock immunodepletion, we applied 0.5 mg of antibody-coated and non-coated dynabeads to a magnet and removed the supernatant. Then, 100 µL sample was added and incubated for 1 h at RT while rotating. After incubation, the dynabeads were pelleted with a magnet and the supernatant was transferred to a fresh tube. All samples were analyzed using sFIDA as described above.

Image-data acquisition and analysis

Images were taken with an IRIS confocal fluorescence microscope (In Cell Analyzer 6500HS, GE Healthcare, Chicago, USA), using a 40× magnification objective with water immersion by two-channel imaging (channel one excitation: 642 nm, emission filter: 682.5/59 nm, exposure time: 3 s; channel two excitation: 488 nm, emission filter: 524.5/48 nm; exposure time: 4 s). A total of 16 images with 2040×2040 pixels each were acquired per well, covering 16% of the total well area. The acquired images were analyzed with the in-house developed sFIDAta software tool to ensure unbiased and automated image data analysis[40]. This included automatic detection and elimination of images containing artifacts and counting aggregate labeling pixels. In addition, a min-max filtering was applied, resulting in a removal of 10% of the images with the highest and lowest sFIDA readout per well. The sFIDA readout refers to the number of colocalized pixels of both channels. To reduce the background signal and compensate for fluctuations of the absolute fluorescence intensities, intensity cutoffs were determined for each experiment based on the buffer control. The cutoff is referred to as the gray-scale value of an image at which the rate of positive versus the total number of pixels in the buffer control equals a preset value[40,81]. By choosing a cutoff value, only pixels exceeding the cutoff value were considered for analysis. Additionally, we included a calibration in each measurement and converted the sFIDA readout to a SiNaP calibration-based concentration [fM] to ensure that differences in fluorescence intensity did not influence assay results. For inter-assay measurements, a cutoff value of 0.001% and, for the analysis of the stool samples, a cutoff value of 0.0003% were chosen.

Statistics

General statistics. Statistical analyses were performed using SigmaPlot 11.0, IBM SPSS Statistics 28.0.1.1 (15), OriginPro 2020 SR1, or JASP 0.14.1. Mean and standard deviation were calculated based on the

sFIDA readout of four replicates. The intra-assay variation is described by the coefficient of variation (CV%). To determine inter-assay variation, the Spearman coefficient of correlation was calculated for the replicate measurements of the samples.

Calibration. For calculating the calibration line, only concentrations of the SiNaPs standard were included that significantly differed from the blank control and were above the LOD. To this end, a one-sided Mann-Whitney U test was carried out. After calculating the calibration range for each experiment, a universal calibration range for all experiments was established. The LOD is defined based on Eq. (1):

$$LOD\ [pixel] = sFIDA\ readout\ (blank\ control) + 3\sigma \quad (1)$$

For linear regression, the sFIDA readouts were weighted with 1/readout. The buffer control was used as a negative control for the calibration and for calculating the LOD.

ROC analysis. A receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed on the acquired dataset. The optimal combination of sensitivity and specificity for a ROC curve was calculated with a maximized Youden's index.

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

DATA AVAILABILITY

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary materials.

CODE AVAILABILITY

For image data analysis, we used the sFIDAta software application, which can be made available upon request.

Received: 2 November 2022; Accepted: 16 January 2023;
Published online: 02 February 2023

REFERENCES

1. Schweighauser, M. et al. Structures of alpha-synuclein filaments from multiple system atrophy. *Nature* **585**, 464–469 (2020).
2. Yang, Y. et al. Structures of alpha-synuclein filaments from human brains with Lewy pathology. *Nature* **610**, 791–795 (2022).
3. Spillantini, M. G. et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839–840 (1997).
4. Spillantini, M. G. et al. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci. Lett.* **251**, 205–208 (1998).
5. 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. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 6469–6473 (1998).
6. Wakabayashi, K., Yoshimoto, M., Tsuji, S. & Takahashi, H. Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci. Lett.* **249**, 180–182 (1998).
7. Fusco, G. et al. Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by alpha-synuclein oligomers. *Science* **358**, 1440–1443 (2017).
8. Cremades, N. et al. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of alpha-synuclein. *Cell* **149**, 1048–1059 (2012).
9. Wong, Y. C. & Krainc, D. alpha-synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. *Nat. Med* **23**, 1–13 (2017).
10. Heinzel, S. et al. Update of the MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **34**, 1464–1470 (2019).
11. Magalhaes, P. & Lashuel, H. A. Opportunities and challenges of alpha-synuclein as a potential biomarker for Parkinson's disease and other synucleinopathies. *NPJ Parkinsons Dis.* **8**, 93 (2022).
12. Schapira, A. H. V., Chaudhuri, K. R. & Jenner, P. Non-motor features of Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **18**, 509 (2017).
13. Postuma, R. B. et al. Risk and predictors of dementia and parkinsonism in idiopathic REM sleep behaviour disorder: a multicentre study. *Brain* **142**, 744–759 (2019).
14. 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**, 388–393 (1996).
15. Fedorova, T. D. et al. Imaging progressive peripheral and central dysfunction in isolated REM sleep behaviour disorder after 3 years of follow-up. *Parkinsonism Relat. Disord.* **101**, 99–104 (2022).
16. Iranzo, A. et al. Neurodegenerative disease status and post-mortem pathology in idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: an observational cohort study. *Lancet Neurol.* **12**, 443–453 (2013).
17. Miglis, M. G. et al. Biomarkers of conversion to alpha-synucleinopathy in isolated rapid-eye-movement sleep behaviour disorder. *Lancet Neurol.* **20**, 671–684 (2021).
18. Nam, D. et al. Detection and assessment of alpha-synuclein oligomers in the urine of Parkinson's disease patients. *J. Parkinsons Dis.* **10**, 981–991 (2020).
19. Vivacqua, G. et al. Salivary alpha-synuclein in the diagnosis of Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *Parkinsonism Relat. Disord.* **63**, 143–148 (2019).
20. Luan, M. et al. Diagnostic value of salivary real-time quaking-induced conversion in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Mov. Disord.* **37**, 1059–1063 (2022).
21. Hamm-Alvarez, S. F. et al. Levels of oligomeric alpha-Synuclein in reflex tears distinguish Parkinson's disease patients from healthy controls. *Biomark. Med* **13**, 1447–1457 (2019).
22. Wang, Z. et al. Skin alpha-synuclein aggregation seeding activity as a novel biomarker for Parkinson disease. *JAMA Neurol.* **78**, 1–11 (2020).
23. De Luca, C. M. G. et al. Efficient RT-QuIC seeding activity for alpha-synuclein in olfactory mucosa samples of patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Transl. Neurodegener.* **8**, 24 (2019).
24. Tokuda, T. et al. Detection of elevated levels of alpha-synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology* **75**, 1766–1772 (2010).
25. Kluge, A. et al. Detection of neuron-derived pathological alpha-synuclein in blood. *Brain* **145**, 3058–3071 (2022).
26. Bongianni, M. et al. Olfactory swab sampling optimization for alpha-synuclein aggregate detection in patients with Parkinson's disease. *Transl. Neurodegener.* **11**, 37 (2022).
27. Shannon, K. M. et al. Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **27**, 709–715 (2012).
28. Braak, H., de Vos, R. A., Bohl, J. & Del Tredici, K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett.* **396**, 67–72 (2006).
29. Stokholm, M. G., Danielsen, E. H., Hamilton-Dutoit, S. J. & Borghammer, P. Pathological alpha-synuclein in gastrointestinal tissues from prodromal Parkinson disease patients. *Ann. Neurol.* **79**, 940–949 (2016).
30. Hawkes, C. H., Del Tredici, K. & Braak, H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **33**, 599–614 (2007).
31. Hawkes, C. H., Del Tredici, K. & Braak, H. Parkinson's Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1170**, 615–622 (2009).
32. Woerman, A. L. & Tamgüney, G. Body-first Parkinson's disease and variant Creutzfeldt-Jakob disease—similar or different? *Neurobiol. Dis.* **164**, 105625 (2022).
33. Tamgüney, G. & Korczyn, A. D. A critical review of the prion hypothesis of human synucleinopathies. *Cell Tissue Res* **373**, 213–220 (2017).
34. Van Den Berge, N. et al. Evidence for bidirectional and trans-synaptic parasympathetic and sympathetic propagation of alpha-synuclein in rats. *Acta Neuropathol.* **138**, 535–550 (2019).
35. Arotcarena, M. L. et al. Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of synucleinopathy in non-human primates. *Brain* **143**, 1462–1475 (2020).
36. Lohmann, S. et al. Oral and intravenous transmission of alpha-synuclein fibrils to mice. *Acta Neuropathol.* **138**, 515–533 (2019).
37. Tamgüney, G. et al. Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces. *Nature* **461**, 529–532 (2009).
38. Terry, L. A. et al. Detection of prions in the faeces of sheep naturally infected with classical scrapie. *Vet. Res* **42**, 65 (2011).
39. 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. *Nat. Rev. Chem.* **5**, 277–294 (2021).
40. Blömeke, L. et al. Quantitative detection of alpha-Synuclein and Tau oligomers and other aggregates by digital single particle counting. *NPJ Parkinsons Dis.* **8**, 68 (2022).

41. Kulawik, A., Heise, H., Zafiu, C., Willbold, D. & Bannach, O. Advancements of the sFIDA method for oligomer-based diagnostics of neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* **592**, 516–534 (2018).
42. Herrmann, Y. et al. Nanoparticle standards for immuno-based quantitation of alpha-synuclein oligomers in diagnostics of Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Clin. Chim. Acta* **466**, 152–159 (2017).
43. Herrmann, Y. et al. sFIDA automation yields sub-femtomolar limit of detection for Abeta aggregates in body fluids. *Clin. Biochem.* **50**, 244–247 (2017).
44. Giasson, B. I. et al. A panel of epitope-specific antibodies detects protein domains distributed throughout human alpha-synuclein in Lewy bodies of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Res.* **59**, 528–533 (2000).
45. Kalbe, E. et al. DemTect: a new, sensitive cognitive screening test to support the diagnosis of mild cognitive impairment and early dementia. *Int J. Geriatr. Psychiatry* **19**, 136–143 (2004).
46. Goetz, C. G. et al. Movement disorder society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Process, format, and clinimetric testing plan. *Mov. Disord.* **22**, 41–47 (2007).
47. Chaudhuri, K. R. et al. The metric properties of a novel non-motor symptoms scale for Parkinson's disease: results from an international pilot study. *Mov. Disord.* **22**, 1901–1911 (2007).
48. Agachan, F., Chen, T., Pfeifer, J., Reissman, P. & Wexner, S. D. A constipation scoring system to simplify evaluation and management of constipated patients. *Dis. Colon Rectum* **39**, 681–685 (1996).
49. Pramstaller, P. P., Falk, M., Schoenhuber, R. & Poewe, W. Validation of a mail questionnaire for parkinsonism in two languages (German and Italian). *J. Neurol.* **246**, 79–86 (1999).
50. Stiasny-Kolster, K. et al. The REM sleep behavior disorder screening questionnaire–a new diagnostic instrument. *Mov. Disord.* **22**, 2386–2393 (2007).
51. Hoehn, M. M. & Yahr, M. D. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* **17**, 427–442 (1967).
52. Rossi, M. et al. Ultrasensitive RT-QuIC assay with high sensitivity and specificity for Lewy body-associated synucleinopathies. *Acta Neuropathol.* **140**, 49–62 (2020).
53. Compta, Y. et al. Correlates of cerebrospinal fluid levels of oligomeric- and total-alpha-synuclein in premotor, motor and dementia stages of Parkinson's disease. *J. Neurol.* **262**, 294–306 (2015).
54. Iranzo, A. et al. Detection of alpha-synuclein in CSF by RT-QuIC in patients with isolated rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a longitudinal observational study. *Lancet Neurol.* **20**, 203–212 (2021).
55. Hall, S. et al. Longitudinal Measurements of Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Parkinson's Disease. *Mov. Disord.* **31**, 898–905 (2016).
56. Majbour, N. K. et al. Longitudinal changes in CSF alpha-synuclein species reflect Parkinson's disease progression. *Mov. Disord.* **31**, 1535–1542 (2016).
57. Borghammer, P. & Van Den Berge, N. Brain-first versus gut-first Parkinson's disease: a hypothesis. *J. Parkinsons Dis.* **9**, S281–S295 (2019).
58. Horsager, J. et al. Brain-first versus body-first Parkinson's disease: a multimodal imaging case-control study. *Brain* **143**, 3077–3088 (2020).
59. Berg, D. et al. Prodromal Parkinson disease subtypes—key to understanding heterogeneity. *Nat. Rev. Neurol.* **17**, 349–361 (2021).
60. Mattsson, N. et al. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *J. Am. Med. Assoc.* **302**, 385–393 (2009).
61. Doppler, K. et al. Dermal phospho-alpha-synuclein deposits confirm REM sleep behaviour disorder as prodromal Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* **133**, 535–545 (2017).
62. Doppler, K. et al. Consistent skin alpha-synuclein positivity in REM sleep behavior disorder—a two center two-to-four-year follow-up study. *Parkinsonism Relat. Disord.* **86**, 108–113 (2021).
63. Stefani, A. et al. Alpha-synuclein seeds in olfactory mucosa of patients with isolated REM sleep behaviour disorder. *Brain* **144**, 1118–1126 (2021).
64. Schmid, A. W., Fauvet, B., Moniatte, M. & Lashuel, H. A. Alpha-synuclein post-translational modifications as potential biomarkers for Parkinson disease and other synucleinopathies. *Mol. Cell. Proteom.* **12**, 3543–3558 (2013).
65. Fayyad, M. et al. Investigating the presence of doubly phosphorylated alpha-synuclein at tyrosine 125 and serine 129 in idiopathic Lewy body diseases. *Brain Pathol.* **30**, 831–843 (2020).
66. Winner, B. et al. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 4194–4199 (2011).
67. Conway, K. A. et al. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 571–576 (2000).
68. Clairembault, T. et al. Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *J. Neurochem* **130**, 805–815 (2014).
69. Harapan, B. N. et al. No enhanced (p-) alpha-synuclein deposition in gastrointestinal tissue of Parkinson's disease patients. *Parkinsonism Relat. Disord.* **80**, 82–88 (2020).
70. Lionnet, A. et al. Characterisation of tau in the human and rodent enteric nervous system under physiological conditions and in tauopathy. *Acta Neuropathol. Commun.* **6**, 65 (2018).
71. Gries, M. et al. Parkinson mice show functional and molecular changes in the gut long before motoric disease onset. *Mol. Neurodegener.* **16**, 34 (2021).
72. Nerius, M., Doblhammer, G. & Tamgüney, G. GI infections are associated with an increased risk of Parkinson's disease. *Gut* **69**, 1154–1156 (2019).
73. Hulsemann, M. et al. Biofunctionalized silica nanoparticles: standards in amyloid-beta oligomer-based diagnosis of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **54**, 79–88 (2016).
74. 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. Med* **12**, 711–713 (2011).
75. Walt, J., Rowe, M. & Stern, K. Evaluating the functional impact of dry eye: the ocular surface disease index. *Drug Inf. J.* **31**, b5 (1997).
76. Beck, A. T., Steer, R. A., Ball, R. & Ranieri, W. Comparison of Beck Depression Inventories -IA and -II in psychiatric outpatients. *J. Pers. Assess.* **67**, 588–597 (1996).
77. Crook, T. H. 3rd, Feher, E. P. & Larrabee, G. J. Assessment of memory complaint in age-associated memory impairment: the MAC-Q. *Int. Psychogeriatr.* **4**, 165–176 (1992).
78. Pfeffer, R. I., Kurosaki, T. T., Harrah, C. H. Jr., Chance, J. M. & Filos, S. Measurement of functional activities in older adults in the community. *J. Gerontol.* **37**, 323–329 (1982).
79. Postuma, R. B. et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **30**, 1591–1601 (2015).
80. Doppler, C. E. J. et al. Microsleep disturbances are associated with noradrenergic dysfunction in Parkinson's disease. *Sleep* **44**, zsab040 (2021).
81. Kühbach, K. et al. Application of an amyloid beta oligomer standard in the sFIDA assay. *Front. Neurosci.* **10**, 8 (2016).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Carsten Korth for providing the IC16 antibody and Volker Nischwitz for characterizing SiNaPs. Parts of this study were supported by the Parkinson's Foundation (PF-IMP-2022), the Else Kröner-Fresenius-Stiftung (2019_EKES.02), and the Köln Fortune Program, Faculty of Medicine, University of Cologne (453/2018). GRF is funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation—Project-ID 431549029—SFB 1451).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.S., M.T.B., G.R.F., D.W., and G.T. supervised the project. S.S., H.J., M.T.B., and M.S. recruited and clinically assessed patients and control subjects, and collected patient samples. J.W. developed the sFIDAta software tool. A.C. expressed and purified protein. A.S. and M.P. developed the sFIDA assay for stool samples. A.S., M.P., and P.Ö. performed sFIDA experiments. A.S., M.P., L.B., T.B., O.B., D.W., and G.T. analyzed the data. A.S., M.S., M.T.B., and G.T. wrote the paper. All authors critically revised the paper.

FUNDING

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

COMPETING INTERESTS

D.W. and O.B. declare no competing non-financial interests but the following competing financial interests: D.W. and O.B. are shareholders of attyloid GmbH. A.S., S.S., A.S., H.J., P.Ö., M.P., L.B., A.C., J.W., T.B., G.R.R., M.S., M.T.B., and G.T. declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41531-023-00458-4.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Gültekin Tamgüney.

Reprints and permission information is available at http://www.nature.com/reprints

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2023

2.4 Urinbasierte Quantifizierung von α-Syn-Aggregaten

Titel	Elevated α-Synuclein Aggregate Levels in the Urine of Patients with isolated REM Sleep Behavoir Disorder and Parkinson`s Disease
Autoren	Laura Müller, **Pelin Özdüzenciler**, Charlotte Schedlich-Teufer, Aline Seger, Hannah Jergas, Gereon R. Fink, Dieter Willbold, Michael Sommerauer, Michael T. Barbe, Gültekin Tamgüney
Journal	**Annals of Neurology (2025)**
DOI	10.1002/ana.27250
Beitrag	**Eigener Anteil** ▪ Koordinierung der Probensammlung, Transport und Biobanking ▪ Mitwirkung bei der Probenverarbeitung ▪ Diskussion der Ergebnisse ▪ Beteiligung beim Korrigieren des Manuskripts
Ergänzende Informationen	Müller et al. Supplementary Material
Druckgenehmigung	**s. Anhang 5.7**

Elevated α-Synuclein Aggregate Levels in the Urine of Patients with Isolated REM Sleep Behavior Disorder and Parkinson's Disease

Laura Müller, MS,[1,2] Pelin Özdüzenciler, MS,[1,2] Charlotte Schedlich-Teufer, MD,[3] Aline Seger, MD,[3] Hannah Jergas, MD,[3] Gereon R. Fink, MD,[3,4] Dieter Willbold, PhD,[1,2] Michael Sommerauer, MD,[3,4,5†] Michael T. Barbe, MD,[3†] and Gültekin Tamgüney, PhD[1,2†]

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by α-synuclein aggregation in neurons. Recent advances suggest α-synuclein aggregates could serve as a biomarker for PD and related synucleinopathies. This study used surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) to measure α-synuclein aggregates in urine. Patients with PD and isolated rapid eye movement sleep behavior disorder, a precursor to PD, had elevated concentrations compared with healthy controls. Sensitivity and specificity were 83% and 65% for PD versus controls and 89% and 62% for isolated rapid eye movement sleep behavior disorder versus controls. The findings highlight sFIDA's potential for diagnosing synucleinopathies.

ANN NEUROL 2025;00:1–5

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disease characterized by the pathological aggregation of α-synuclein in neurons.[1,2] The diagnosis of PD predominantly depends on clinical evaluation and brain imaging.[3] Efforts to identify clinical and biological markers of disease heterogeneity and progression in PD are ongoing, yet a quantitative biomarker remains unavailable.[4] An emerging biomarker for PD is aggregated α-synuclein, found in cerebrospinal fluid (CSF) and other biosamples.[5] Importantly, patients with isolated rapid eye movement sleep behavior disorder (iRBD), a prodrome of PD and related synucleinopathies, also accumulate pathological α-synuclein aggregates in the nervous system.[6]

Quantifying α-synuclein aggregates in biosamples is challenging due to low concentrations and excess α-synuclein monomers.[7] To address these challenges, we recently adapted surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) to measure α-synuclein aggregates in CSF and stool and demonstrated that sFIDA is a highly sensitive assay for quantifying α-synuclein aggregates in biosamples.[8,9] The sFIDA utilizes the Syn211 antibody, which specifically targets amino acids 121 to 125 of α-synuclein to capture α-synuclein species. Because the Syn211 antibody recognizes only a single linear epitope on α-synuclein, its use as the detection antibody ensures precise quantification of aggregated α-synuclein species exclusively, as monomers with a single linear epitope are captured but remain undetected. Labeling the detection antibody with fluorophores and imaging the surface using confocal microscopy achieves near single particle sensitivity.

Considering that cellular components from the central and peripheral nervous systems can be released and distributed throughout the body and bloodstream, we hypothesized that aggregated α-synuclein species might likewise be detectable in the urine of patients with PD and iRBD.[4,8–10] The aim of this study was to detect and quantify α-synuclein aggregates in urine and, more importantly, to demonstrate their potential application in the diagnosis of patients with synucleinopathies.

From the [1]Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; [2]Institute of Biological Information Processing (Structural Biochemistry: IBI-7), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany; [3]Department of Neurology, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, Köln, Germany; [4]Cognitive Neuroscience, Institute of Neuroscience and Medicine (INM-3), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany; and [5]Center of Neurology, Department of Parkinson's, Sleep and Movement Disorders, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

Address correspondence to Dr Gültekin Tamgüney, Institute of Biological Information Processing (Structural Biochemistry: IBI-7), Forschungszentrum Jülich, Leo-Brandt-Straße, 52428 Jülich, Germany. E-mail: e.tamgueney@fz-juelich.de

Additional supporting information can be found in the online version of this article.

Received Jan 11, 2025, and in revised form Mar 18, 2025. Accepted for publication Apr 7, 2025.

View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI: 10.1002/ana.27250.

[†]These authors are senior authors.

© 2025 The Author(s). *Annals of Neurology* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of American Neurological Association. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Methods

Participants

Patients with PD and iRBD and healthy controls (HCs) were enrolled at the Department of Neurology of the University Hospital Cologne and diagnosed based on established criteria, including polysomnography for patients with iRBD.[9,11] Urine samples were collected between July 2020 and September 2021 and stored at −80°C. All patient data and samples were pseudonymized. The study was approved by the research ethics committees of the participating institutions. Participants provided written informed consent.

Sample Preparation

Urine samples were thawed at 4°C for 30 minutes, transferred to tubes coated with 3% bovine serum albumin (BSA; Applichem), and adjusted to 3% BSA and 1× Halt protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific). After centrifugation at 4000 × g for 30 minutes at 4°C, the supernatants were transferred to BSA-coated centrifugal concentrators (Sartorius) with a 10 kDa cutoff and concentrated 10-fold by centrifugation at 12,000 × g for 15 to 30 minutes at 4°C. Concentrated samples were transferred to BSA-coated tubes and stored at −80°C.

sFIDA Protocol

To capture α-synuclein aggregates, a 384-well glass-bottom microplate (Thermo Fisher Scientific) was incubated with 7.5 µg/ml of the Syn211 antibody (Santa Cruz Biotechnology) in 1× phosphate-buffered saline overnight at 4°C. Subsequently, the plate was washed 5 times with 80 µl Tris-buffered saline (TBS) with 0.05% Tween 20 (TBS-T), and then 5 times with TBS. To block free binding sites, the wells were incubated with 0.5% fat-free dried milk powder in TBS with 0.03% ProClin (Sigma Aldrich, TBS-ProClin) for 3 hours at room temperature. Next, the wells underwent 5 washes with 80 µl of TBS-T and 5 washes with TBS. The α-synuclein-coated silica nanoparticles (SiNaPs), which functioned as a standard for protein quantification, were prepared as previously described[8,9,12] and diluted with 0.1% BSA and 0.05% Tween 20 in TBS-ProClin. Four replicates of 20 µl of each SiNaP dilution or 20 µl of the 10× concentrated urine samples were added to the wells and incubated for 1 hour at room temperature. Subsequently, the plate was washed 5 times with TBS. To detect α-synuclein aggregates, the wells were incubated with the fluorescent Syn211-CF633 and Syn211-CF488A antibodies,[9] each at 0.625 µg/ml, in TBS-T containing 0.1% BSA. Finally, the plate was washed 5 times with TBS and the buffer exchanged to TBS-ProClin for measurement. An automated microtiter plate washer (405 LS Microplate Washer, BioTek) carried out all washing steps.

Image-Data Acquisition and Analysis

Images were captured using an IN Cell Analyzer 6500HS (GE Healthcare) with a 40× objective through 2-channel confocal fluorescence imaging. A total of 25 images per well, each measuring 2,040 × 2,040 pixels, were captured for each channel. The sFIDAta version 2.2.7 was utilized for the automated detection and elimination of images with artifacts, and for quantifying colocalized pixels in both channels (sFIDA readout).[9] To minimize background, a cutoff was established as the gray value at which 0.01% of all pixels in images of the buffer control were positive. Only pixels with gray values above the cutoff were analyzed. The limit of detection (LOD) was defined as the sFIDA readout of the buffer control plus 3 standard deviations. A calibration curve was fitted using sFIDA readouts of dilutions of SiNaPs of known concentration and second order polynomial regression. This calibration curve was used to calculate a concentration for each sFIDA readout.

Results

Descriptive Analysis of the Patient and Control Groups

We collected urine samples of 93 patients with PD and 72 patients with iRBD and 52 HCs. Demographic, clinical, and statistical information for these cohorts is available in the Table and Supplementary Table S1 and Supplementary Figure S1. There was a gender bias toward men in the patient cohorts, and a slight bias toward women in the control group. HCs were, on average, 10 to 12 years younger than the patients. We did not observe significant differences in the duration of education. The cognitive performance (DemTect score) of the HCs was significantly higher than that of the patients.[13] The patients with PD scored significantly higher than patients with iRBD on the Movement Disorder Society's Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part III.[14] On average, patients with PD scored 3.0 ± 0.9 on the Hoehn and Yahr scale and improved 42 ± 19% on the levodopa challenge test.[15] The patients with PD scored significantly higher on the Non-Motor Symptoms Scale for PD than the patients with iRBD or the HCs.[16] Based on the Cleveland Clinic Constipation Scoring System, patients with PD were not more constipated than the patients with iRBD and the HCs.[17] The patients with PD also suffered more from hyposmia, reflected in a significantly lower olfactory testing score, than the patients with iRBD or the HCs. In addition, patients with PD scored significantly higher in the screening questionnaire for parkinsonism compared with patients with iRBD and the HCs.[18] The results of the RBD screening questionnaire also showed significant differences between patients with iRBD and

TABLE. Demographic and Clinical Information on Patients and Controls That Donated Urine Samples

	Group			*p* Value		
	PD	iRBD	HC	PD vs. HC	PD vs. iRBD	iRBD vs. HC
Number	93	72	52	N/A	N/A	N/A
Female, number (percentage)	29 (31.2)	10 (13.9)	31 (59.6)	$p < 0.001$	$p < 0.01$	$p < 0.0001$
Age, yr ± SD	64.3 ± 9.7	66.3 ± 6.4	54.8 ± 16.8	$p < 0.01$	n.s.	$p < 0.001$
Education, yr ± SD	15.4 ± 4.1	15.9 ± 4.0	16.0 ± 3.3	n.s.	n.s.	n.s.
Disease duration, yr ± SD	9.0 ± 5.8	7.4 ± 5.4	N/A	N/A	n.s.	N/A
DemTect, score ± SD	14.0 ± 3.1	14.8 ± 2.3	16.1 ± 2.0	$p < 0.0001$	n.s.	$p < 0.01$
MDS-UPDRS III, score ± SD	23.7 ± 14.6	4.0 ± 2.7	N/A	N/A	$p < 0.0001$	N/A
Non-Motor Symptoms Scale, score ± SD	30.3 ± 22.8	16.2 ± 18.0	11.0 ± 11.0	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	n.s.
CCCSS, score ± SD	4.1 ± 4.0	2.8 ± 2.7	2.4 ± 2.5	n.s.	n.s.	n.s.
Olfactory testing, score ± SD	5.4 ± 2.5	6.6 ± 2.7	10.3 ± 1.8	$p < 0.0001$	$p < 0.05$	$p < 0.0001$
Screening questionnaire for parkinsonism, score ± SD	5.6 ± 2.2	0.3 ± 0.8	0.3 ± 0.7	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	n.s.
RBD screening questionnaire, score ± SD	4.9 ± 3.0	9.0 ± 2.7	2.1 ± 2.2	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$
Hoehn and Yahr, score ± SD	3.0 ± 0.9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Improvement of MDS-UPDRS III on Levodopa challenge test, % ± SD	42 ± 19	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

CCCSS = Cleveland Clinic Constipation Scoring System; HC = healthy control; iRBD = isolated rapid eye movement sleep behavior disorder; MDS-UPDRS III = Movement Disorder Society's Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part III; n.s. = not significant; N/A = not available; PD = Parkinson's disease; RBD = rapid eye movement sleep behavior disorder; SD = standard deviation.

patients with PD or the HCs, as well as between patients with PD and the HCs.[19]

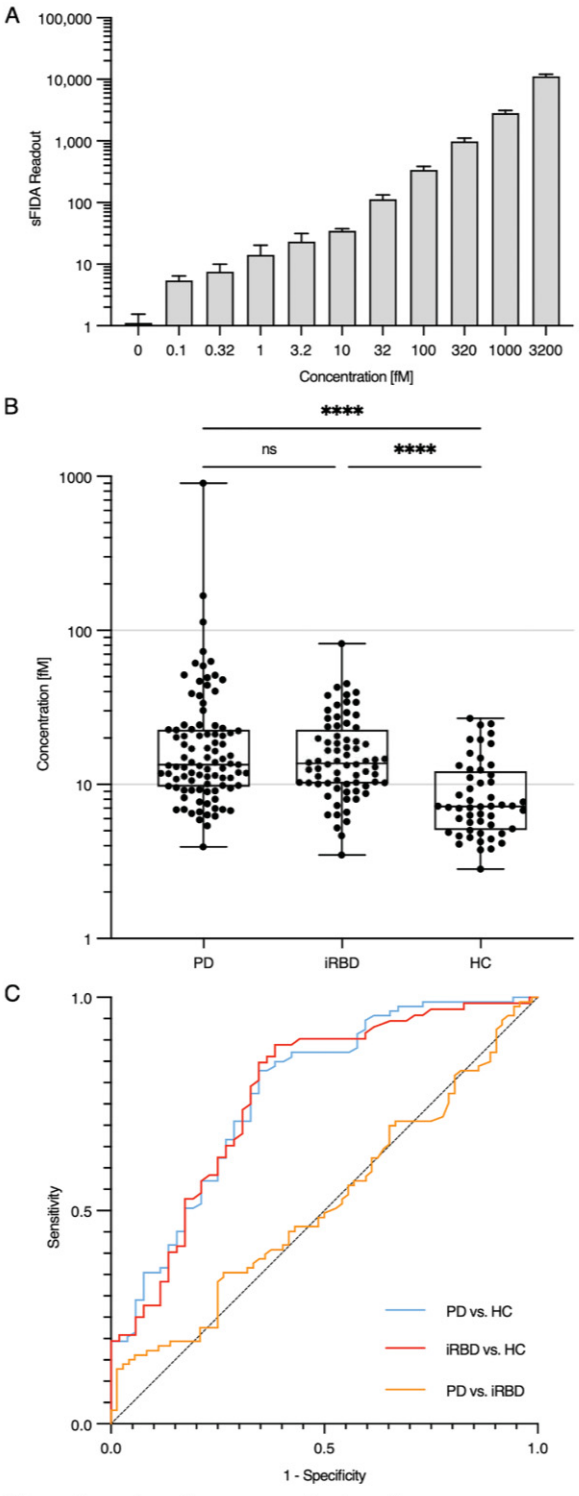
sFIDA Measurements of α-Synuclein-Coated Silica Nanoparticles

To establish a standard for signal calibration, we utilized dilutions of α-synuclein-coated silica nanoparticles (SiNaPs) ranging from 0.1 to 3,200 fM (Fig A).[12] The mean intra-assay coefficient of variation (CV%) was determined based on the sFIDA readout of 4 replicates of each dilution of the SiNaPs standard, yielding a value of 19.9% (Supplementary Table S2). The sFIDA readout of 3,200 fM SiNaPs without a capture antibody was reduced by 99.7%. Based on the buffer control, the LOD was determined to be 0.74 fM.

α-Synuclein Aggregate Concentrations Are Elevated in the Urine of patients with PD and patients with iRBD

We used sFIDA to measure α-synuclein aggregate concentrations in the urine of HCs and patients with PD and iRBD. Urea and other urine components could potentially confound sFIDA performance. However, urea concentrations between 100 and 800 mM did not affect the sFIDA readout (Supplementary Fig S2). We used SiNaPs to calibrate the sFIDA readouts and calculate the concentrations of α-synuclein aggregates (Fig B, Supplementary Table S1). The median concentration of α-synuclein aggregates in 10× concentrated urine samples from patients with PD (13.5 fM) and patients with iRBD (13.7 fM) was significantly elevated ($p < 0.0001$) compared with those from the HCs (7.2 fM) using the Kruskal-Wallis test. Including only HCs over 50 years old, with a median age of 64.4 ± 7.6 years, closely matched the median ages of the PD (64.3 ± 9.7 years) and iRBD (66.3 ± 6.4 years) cohorts while preserving the statistically significant differences observed in urinary α-synuclein fibril concentrations. We observed no significant difference between patients with PD and patients with iRBD. The receiver operating characteristic (ROC) curves (Fig C) revealed an 83% sensitivity and 65% specificity for patients with PD versus the HCs, and an 89% sensitivity and 62% specificity for patients

with iRBD versus the HCs. We observed no correlation between α-synuclein aggregate concentrations in urine and other disease-relevant scores (Supplementary Table S3).



(Figure legend continues on next column.)

Discussion

We demonstrated that α-synuclein aggregate concentrations are significantly ($p < 0.0001$) elevated in the urine of patients with PD and patients with iRBD compared to the HCs. This study provides the first detection of urinary α-synuclein aggregates in patients with iRBD that typically progress to defined parkinsonism within a few years.[20] Notably, the concentrations in patients with iRBD matched those we observed in patients with PD, possibly due to an initiation of α-synuclein pathology in the peripheral nervous system in patients with iRBD.[21] These findings corroborate and expand on a previous study reporting higher ($p < 0.05$) urinary α-synuclein aggregate concentrations in 21 patients with PD compared with 11 HCs.[22] Whereas sFIDA for urine is nearly as sensitive as the seed amplification assay for detecting α-synuclein aggregates in CSF samples of various synucleinopathies, it is less specific.[4] We also observed α-synuclein aggregates in the urine of some control subjects, possibly because sFIDA cannot differentiate between seeding-competent aggregates, which are neurotoxic, and alternate seeding-incompetent forms that may be present in healthy individuals.[23] Alternatively, some control subjects may be in the clinical prodromal stage of PD. The origin of urinary α-synuclein aggregates remains uncertain but may be linked to blood or peripheral nerves.[5] In summary, our results demonstrate that pathological α-synuclein aggregates are excreted in urine and can be quantified using sFIDA, highlighting its potential for diagnosing synucleinopathies in their early stages.

FIGURE: Concentration of α-synuclein aggregates in urine samples and receiver operating characteristics (ROC) curves. (A) sFIDA measurements of dilutions of α-synuclein-coated silica nanoparticles (SiNaPs) were utilized as a standard for signal calibration. (B) The median concentration of α-synuclein aggregates in 10× concentrated urine of patients with Parkinson's disease (PD; 13.5 fM) and isolated rapid eye movement sleep behavior disorder (iRBD; 13.7 fM) was significantly (**$p < 0.0001$) higher than in the urine of the healthy controls (HCs; 7.2 fM). The sFIDA readouts were converted to concentrations using sFIDAta version 2.2.7. Significance was determined using GraphPad Prism version 10.4.0 and the Kruskal-Wallis test (ns = non-significant). (C) A comparison of patients with PD with healthy controls revealed a sensitivity of 83% at a specificity of 65% with an area under the curve (AUC) of 0.7763 ($p < 0.0001$). A comparison between patients with iRBD and healthy controls yielded a sensitivity of 89% and a specificity of 62% with an AUC of 0.7743 ($p < 0.0001$). The ROC analyses were performed using GraphPad Prism version 10.4.0. The optimal combination of sensitivity and specificity was calculated with a maximized Youden's index.**

Acknowledgments

Parts of this study were supported by the Else Kröner-Fresenius-Stiftung (2019_EKES.02, MS), Koeln Fortune (HJ), FMMED (HJ), and EIT Health (HJ), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation – Project-ID 431549029 – SFB 1451, GRF), and the Ilselore-Luckow-Stiftung (GT). Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Author Contributions

M.S., M.T.B., G.R.F., D.W., and G.T. contributed to the conception and design of the study; C.S.T., A.S., H.J., L.M., P.Ö., M.S., M.T.B., and G.T. contributed to the acquisition and analysis of data; L.M., G.R.F., D.W., M.S., M.T.B., and G.T. contributed to drafting the text or preparing the figures.

Potential Conflicts of Interest

D.W. is co-founder of attyloid GmbH, which is commercializing the sFIDA assay. All other authors have nothing to report.

Data Availability

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary materials.

References

1. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature 1997;388:839–840.
2. Yang Y, Shi Y, Schweighauser M, et al. Structures of alpha-synuclein filaments from human brains with Lewy pathology. Nature 2022;610: 791–795.
3. Heinzel S, Berg D, Gasser T, et al. Update of the MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. Mov Disord 2019;34: 1464–1470.
4. Siderowf A, Concha-Marambio L, Lafontant D-E, et al. Assessment of heterogeneity among participants in the Parkinson's progression markers initiative cohort using α-synuclein seed amplification: a cross-sectional study. Lancet Neurol 2023;22:407–417.
5. Magalhaes P, Lashuel HA. Opportunities and challenges of alpha-synuclein as a potential biomarker for Parkinson's disease and other synucleinopathies. NPJ Parkinsons Dis 2022;8:93.
6. Miglis MG, Adler CH, Antelmi E, et al. Biomarkers of conversion to alpha-synucleinopathy in isolated rapid-eye-movement sleep behaviour disorder. Lancet Neurol 2021;20:671–684.
7. Kulenkampff K, Wolf Perez A-M, Sormanni P, et al. Quantifying misfolded protein oligomers as drug targets and biomarkers in Alzheimer and Parkinson diseases. Nat Rev Chem 2021;5:277–294.
8. Blömeke L, Pils M, Kraemer-Schulien V, et al. Quantitative detection of alpha-Synuclein and tau oligomers and other aggregates by digital single particle counting. NPJ Parkinsons Dis 2022;8:68.
9. Schaffrath A, Schleyken S, Seger A, et al. Patients with isolated REM-sleep behavior disorder have elevated levels of alpha-synuclein aggregates in stool. NPJ Parkinsons Dis 2023;9:14.
10. Kuzkina A, Rossle J, Seger A, et al. Combining skin and olfactory alpha-synuclein seed amplification assays (SAA)-towards biomarker-driven phenotyping in synucleinopathies. NPJ Parkinsons Dis 2023; 9:79.
11. Seger A, Ophey A, Heitzmann W, et al. Evaluation of a structured screening assessment to detect isolated rapid eye movement sleep behavior disorder. Mov Disord 2023;38:990–999.
12. Herrmann Y, Bujnicki T, Zafiu C, et al. Nanoparticle standards for immuno-based quantitation of alpha-synuclein oligomers in diagnostics of Parkinson's disease and other synucleinopathies. Clin Chim Acta 2017;466:152–159.
13. Kalbe E, Kessler J, Calabrese P, et al. DemTect: a new, sensitive cognitive screening test to support the diagnosis of mild cognitive impairment and early dementia. Int J Geriatr Psychiatry 2004;19: 136–143.
14. Goetz CG, Fahn S, Martinez-Martin P, et al. Movement Disorder Society-sponsored revision of the unified Parkinson's disease rating scale (MDS-UPDRS): process, format, and clinimetric testing plan. Mov Disord 2007;22:41–47.
15. Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. Neurology 1967;17:427–442.
16. Chaudhuri KR, Martinez-Martin P, Brown RG, et al. The metric properties of a novel non-motor symptoms scale for Parkinson's disease: results from an international pilot study. Mov Disord 2007;22:1901–1911.
17. Agachan F, Chen T, Pfeifer J, et al. A constipation scoring system to simplify evaluation and management of constipated patients. Dis Colon Rectum 1996;39:681–685.
18. Pramstaller PP, Falk M, Schoenhuber R, Poewe W. Validation of a mail questionnaire for parkinsonism in two languages (German and Italian). J Neurol 1999;246:79–86.
19. Stiasny-Kolster K, Mayer G, Schafer S, et al. The REM sleep behavior disorder screening questionnaire--a new diagnostic instrument. Mov Disord 2007;22:2386–2393.
20. Postuma RB, Iranzo A, Hu M, et al. Risk and predictors of dementia and parkinsonism in idiopathic REM sleep behaviour disorder: a multicentre study. Brain 2019;142:744–759.
21. Horsager J, Borghammer P. Brain-first vs. body-first Parkinson's disease: an update on recent evidence. Parkinsonism Relat Disord 2024;122:106101.
22. Nam D, Lee JY, Lee M, et al. Detection and assessment of alpha-Synuclein oligomers in the urine of Parkinson's disease patients. J Parkinsons Dis 2020;10:981–991.
23. Winner B, Jappelli R, Maji SK, et al. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108:4194–4199.

2.5 Urinbasierte Quantifizierung von α-Syn-Aggregaten: Zukunftsperspektiven und Limitationen

Titel	Reply to “Urinary α-Synuclein for Parkinson’s Detection: Key Limitations and Future Directions”
Autoren	Laura Müller, **Pelin Özdüzenciler**, Charlotte Schedlich-Teufer, Aline Seger, Hannah Jergas, Gereon R. Fink, Dieter Willbold, Michael Sommerauer, Michael T. Barbe, Gültekin Tamgüney
Journal	**Annals of Neurology (2025)**
DOI	10.1002/ana.70023
Beitrag	**Eigener Anteil** ▪ Koordinierung der Probensammlung, Transport und Biobanking ▪ Mitwirkung bei der Probenverarbeitung ▪ Diskussion der Ergebnisse ▪ Beteiligung beim Korrigieren des Manuskripts
Ergänzende Informationen	**/**
Druckgenehmigung	**s. Anhang 5.8**

Reply to "Urinary α-Synuclein for Parkinson's Detection: Key Limitations and Future Directions"

Laura Müller,[1,2] Pelin Özdüzenciler,[1,2]
Charlotte Schedlich-Teufer, MD,[3] Aline Seger, MD,[3]
Hannah Jergas, MD,[3] Gereon R. Fink, MD,[3,4]
Dieter Willbold, PhD,[1,2] Michael Sommerauer, MD,[3,4,5†]
Michael T. Barbe, MD,[3†] and
Gültekin Tamgüney, PhD[1,2]

Dear Editor,

We thank Dr. Ma, Dr. Deng, and Dr. Liu for their thoughtful and constructive comments on our recent publication investigating elevated urinary α-synuclein aggregate levels in patients with isolated rapid eye movement (REM) sleep behavior disorder (iRBD) and Parkinson's disease (PD).[1] We appreciate the opportunity to respond to the concerns raised.

Regarding the timing of urine collection, samples in our study were obtained between 8:00 AM and 4:00 PM. We acknowledge that diurnal variation can influence the concentration of urinary biomarkers, including α-synuclein aggregates. However, the specific impact of collection time on α-synuclein levels in concentrated urine remains to be fully elucidated. We agree that future studies may benefit from either standardizing the timing of collection or stratifying analyses based on collection time to improve reproducibility and comparability.

We also concur with the observation that α-synuclein levels may fluctuate over the course of disease progression, reflecting the heterogeneous stages of PD and iRBD among patients. In response to this important point, we are about to undertake a longitudinal study with serial urine samples collected from patients and healthy controls. This will allow us to investigate temporal changes in urinary α-synuclein levels and evaluate the impact of potential external modulators.

With regard to demographic matching, we are mindful of the age and sex differences between patient and control cohorts. As noted in our study, we performed a subgroup analysis including only healthy controls over the age of 50 (median age 64.4 ± 7.6 years), which closely matched the median ages of the PD (64.3 ± 9.7 years) and iRBD (66.3 ± 6.4 years) groups.[1] The significant differences in urinary α-synuclein fibril concentrations remained consistent in these analyses. Additionally, when stratified by sex—comparing only male PD and iRBD patients to male healthy controls (Fig A), and only female patients to female controls (Fig B)—the statistical significance of observed differences was preserved. We acknowledge, however, that prospective recruitment strategies aimed at minimizing age and sex disparities, such as stratified random sampling or tighter age-matching protocols, may reduce residual confounding in future investigations. The use of multivariable statistical models incorporating age and sex as covariates is another valuable approach to adjust for demographic differences and strengthen the robustness of biomarker comparisons.

Last, we note that the primary aim of our study was to quantify urinary α-synuclein aggregates and assess their diagnostic potential in synucleinopathies. While the inclusion of additional biomarkers may

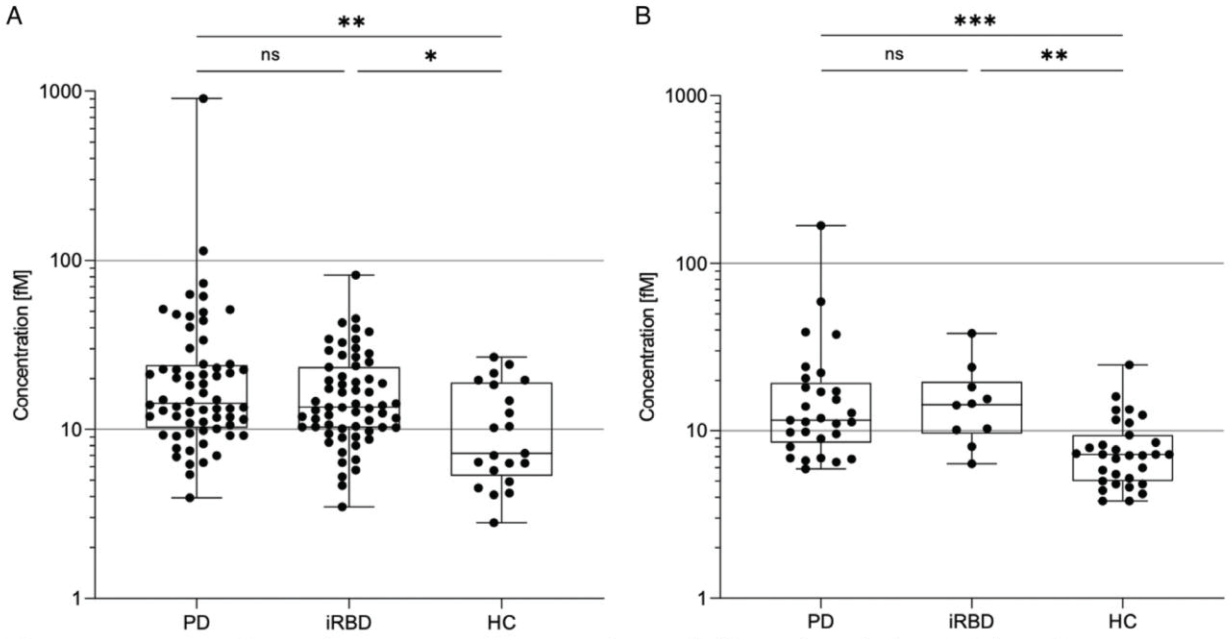


FIGURE: Concentration of α-synuclein aggregates in urine samples stratified by gender and cohort. (A) The median concentration of α-synuclein aggregates in 10× concentrated urine of male patients with Parkinson's disease (PD) (14.3 fM, $^{**}p < 0.01$, n = 64) and isolated rapid eye movement sleep behavior disorder (iRBD) (13.5 fM, $^{*}p < 0.05$, n = 62) was significantly higher than in the urine of the male healthy controls (HC) (7.2 fM, n = 21). (B) The median concentration of α-synuclein aggregates in 10× concentrated urine of female patients with PD (11.5 fM, $^{***}p < 0.001$, n = 29) and iRBD (14.4 fM, $^{**}p < 0.01$, n = 10) was significantly higher than in the urine of the female HCs (7.2 fM, n = 31). Surface-based fluorescence intensity distribution analysis (sFIDA) readouts were converted to concentrations using sFIDAta version 2.2.7. Significance was determined using GraphPad Prism version 10.4.0 and the Kruskal–Wallis test together with Dunn's test as a post hoc test (ns = non-significant).

further enhance diagnostic precision, such analyses were beyond the scope of the current work and are planned for future studies.

Acknowledgments

This study was supported by the Else Kröner-Fresenius-Stiftung (2019_EKES.02, MS), Koeln Fortune (H.J.), FMMED (H.J.), and EIT Health (H.J.), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation – Project-ID 431549029 – SFB 1451, G.R.F.), and the Ilselore-Luckow-Stiftung (G.T.).

Author Contributions

Laura Müller: Methodology; investigation; validation; formal analysis; data curation; software; visualization. **Pelin Özdüzenciler:** Writing – review and editing. **Charlotte Schedlich-Teufer:** Writing – review and editing. **Aline Seger:** Writing – review and editing. **Hannah Jergas:** Writing – review and editing. **Gereon R. Fink:** Writing – review and editing. **Dieter Willbold:** Writing – review and editing. **Michael Sommerauer:** Writing – review and editing; conceptualization; project administration; resources; funding acquisition. **Michael T. Barbe:** Writing – review and editing; conceptualization; project administration; resources; funding acquisition. **Gültekin Tamgüney:** Conceptualization; writing – review and editing; writing – original draft; supervision; project administration; funding acquisition.

Potential Conflicts of Interest

D.W. is co-founder of attyloid, which is commercializing the sFIDA assay. All other authors have nothing to report.

[1]*Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Physikalische Biologie, Düsseldorf, Germany*
[2]*Institute of Biological Information Processing (Structural Biochemistry: IBI-7), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany*
[3]*Department of Neurology, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, Köln, Germany*
[4]*Cognitive Neuroscience, Institute of Neuroscience and Medicine (INM-3), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany*
[5]*Center of Neurology, Department of Parkinson's, Sleep and Movement Disorders, University Hospital Bonn, Bonn, Germany*

Address correspondence to Dr Tamgüney, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Physikalische Biologie, Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf, Germany. E-mail: e.tamgueney@fz-juelich.de

[†]Indicates senior authors.

Reference

1. Müller L, Özdüzenciler P, Schedlich-Teufer C, et al. Elevated alpha-synuclein aggregate levels in the urine of patients with isolated REM sleep behavior disorder and Parkinson's disease. Ann Neurol 2025; 98:147–151.

DOI: 10.1002/ana.70023

2.6 Entwicklung eines innovativen Moleküls zur Detektion amyloidogener Proteinaggregate

Titel	Utilization of a Branched Late-Stage Clickable Biotinylated Chassis on the Example of a Pittsburgh B Analogue
Autoren	T. Moritz Weber, **Pelin Özdüzenciler**, Gültekin Tamgüney, Jörg Pietruszka
Journal	**Organic Letters (2024)**
DOI	10.1021/acs.orglett.4c02527
Beitrag	**Eigener Anteil** ▪ Durchführung der Spektralmessungen ▪ Validierung der α-Syn Bindung mittels ELISA ▪ Diskussion der Ergebnisse ▪ Beteiligung beim Korrigieren des Manuskripts
Ergänzende Informationen	Weber et al. Supplementary Material / s. Anhang 5.3
Druckgenehmigung	**s. Anhang 5.9**

OL | Organic Letters

pubs.acs.org/OrgLett

Letter

Open Access

This article is licensed under CC-BY 4.0

Utilization of a Branched Late-Stage Clickable Biotinylated Chassis on the Example of a Pittsburgh B Analogue

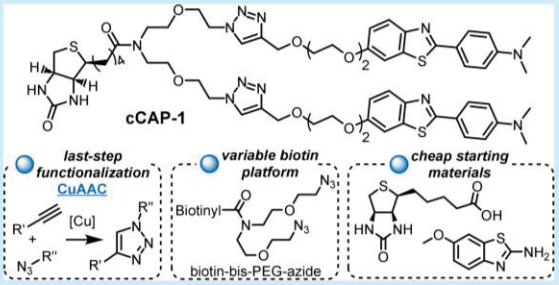
T. Moritz Weber, Pelin Özdüzenciler, Gültekin Tamgüney, and Jörg Pietruszka*

Cite This: *Org. Lett.* 2024, 26, 6771−6775

Read Online

ACCESS | Metrics & More | Article Recommendations | Supporting Information

ABSTRACT: Biotinylation is probably the most frequent and practically useful modification of molecules to facilitate selective and highly affine binding to (strept)avidin for immobilization, enrichment, and purification for further (bio)chemical or (bio)-physical investigations. We present a protecting-group-free synthesis of a branched biotin bis-azide that enables dual-payload late-stage functionalization with arbitrary alkynes via click chemistry. Utility of the chassis is briefly showcased on the example of a valuable Pittsburgh B analogue, which binds pathological protein aggregates, commonly found in neurodegenerative diseases.

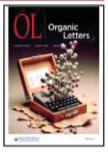


The highly selective interaction between biotin and the protein (strept)avidin is the most stable noncovalent bond found in nature, characterized by a dissociation constant of 10^{-15} M.[1] Thus, the interaction is among the most commonly exploited tools in chemistry, biology, and biophysics for surface immobilization, enrichment, and purification.[2−5] The practical significance of terminally functionalized and activated biotins with flexible polyethylene glycol (PEG) linkers for this purpose is emphasized by the vast number of mostly linear and single-substituted commercial substances. A yet underrepresented group are biotins with bis- or tris-substituted multiarm linkers, displaying multiple units of targetable functional groups. Especially in the field of bioorthogonal click chemistry, symmetrical and unsymmetrical functionalization with non-natural substituents, such as organic azides, terminal alkynes, and cyclooctynes can be used for studies *in vivo* without interfering with the cell's metabolites.[6,7] Thus, reliable chemical access to reactive and structurally diverse biotinylated chassis is quite important to study the architecture,[8] cellular localization,[2] or interaction partners of molecules in an isolated or cellular context.[9]

A recent innovation in bis-functionalized biotinylated molecular probes was the synthesis of the capture molecule for amyloid precipitation (CAP-1, cf. Figure 1) that utilizes the interaction of biotin/streptavidin to selectively precipitate amyloid fibrils from complex biofluids by streptavidin-coated magnetic beads and employs a rarely met bifurcated amide linker to display two probes per biotin unit and increase the strength of interaction.[1,10] The *N*-methylated probe is akin to Pittsburgh compound B (PiB, **1**) and is derived from the benzothiazole family. Benzothiazole-containing probes emerged in the late 1990s as potent molecules to selectively bind and detect biomarkers of progressive neurodegenerative diseases with no cure,[11] such as Alzheimer's (AD) or Parkinson's disease (PD).[12−14] In 2004, Pittsburgh compound B was introduced as a novel amyloid-imaging positron emission tomography (PET) tracer to visualize amyloid beta (Aβ) plaques in AD brain tissue.[15] Furthermore, PiB was shown to bind Lewy body derived α-synuclein (α-syn) fibrils,[16] which is a pathogenic hallmark of synucleinopathies (e.g., PD and multiple system atrophy), too.[17] However, brain imaging as a diagnostic tool is expensive and is not ubiquitously available. Because amyloid fibrils are also present in cerebrospinal fluid (CSF), blood, stool, and other biofluids, methods for selectively enriching amyloid fibrils from these more readily accessible sources are being developed as a cheaper and more universal way to diagnose amyloid diseases and monitor their progression and the effectiveness of therapeutic interventions.[18−21]

Inspired by the design of CAP-1, we intend to overcome two important limitations and cost drivers of the presented route by Rodrigues et al.:[10] As the dual probe is attached to the Boc-protected linker in an early stage of the synthesis, followed by deprotection and late-stage amide coupling with plain D-biotin, the yield over three steps including the valuable benzothiazole probe is 10%, only. However, the *N*-methylated probe is not commercially available, and the Pittsburgh compound B is very pricey (CAS 566169-93-5). Adhering to this, the late-stage attachment of biotin to the probe-decorated linker does not

Received: July 10, 2024
Revised: July 18, 2024
Accepted: July 19, 2024
Published: July 25, 2024



ACS Publications

© 2024 The Authors. Published by American Chemical Society

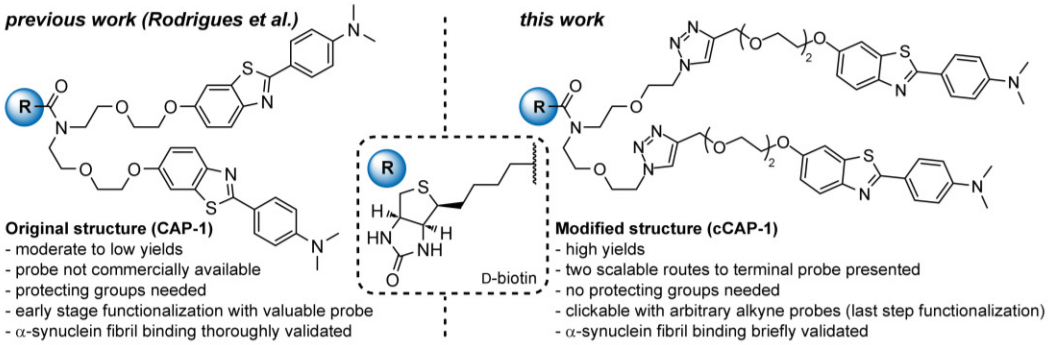
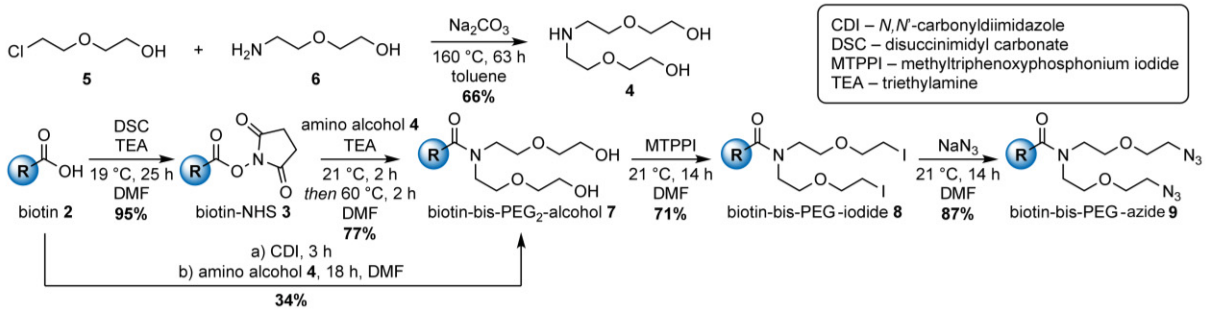


Figure 1. Same but different. A Y-shaped biotin anchor for benzothiazole-based structure specific precipitation of amyloid fibrils.

Scheme 1. Synthesis of the Y-Shaped Bis-azide-Functionalized Biotin Linker 9 from D-Biotin (2)

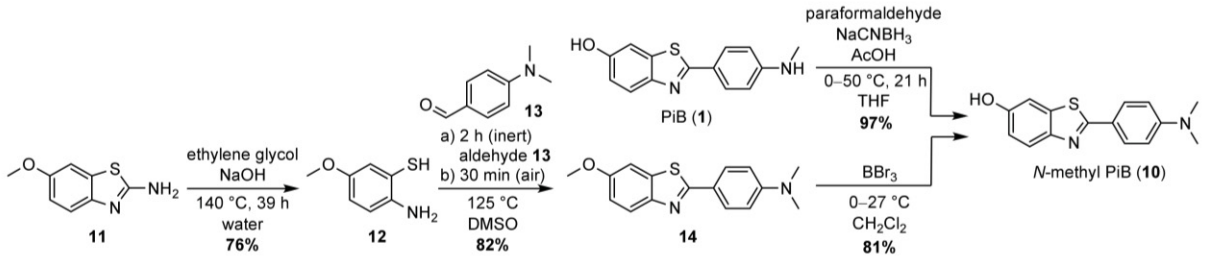


allow simple exchange of the probe and requires a three-step procedure for every additional target molecule, which would prohibit a streamlined preparation of large biotinylated compound libraries for screenings and precludes bioorthogonal application. These downsides prompted us to redesign the CAP-1 molecule, retaining the same benzothiazole probe and the multiarm Y-shaped biotin for utilization of the highly selective biotin−streptavidin interaction for immobilization on streptavidin-functionalized surfaces. In contrast to the synthesis of CAP-1, we chose an approach that provides a symmetrical and ubiquitously usable bifurcated biotin-bis-PEG-azide, derived from a protecting-group-free synthesis. By independent transformations on the biotin and the benzothiazole moiety, both functional units are mergeable in a reliable and commutable last-step copper-catalyzed click reaction, and give rise to the biotin bis-azide chassis, suitable for bioorthogonal applications.

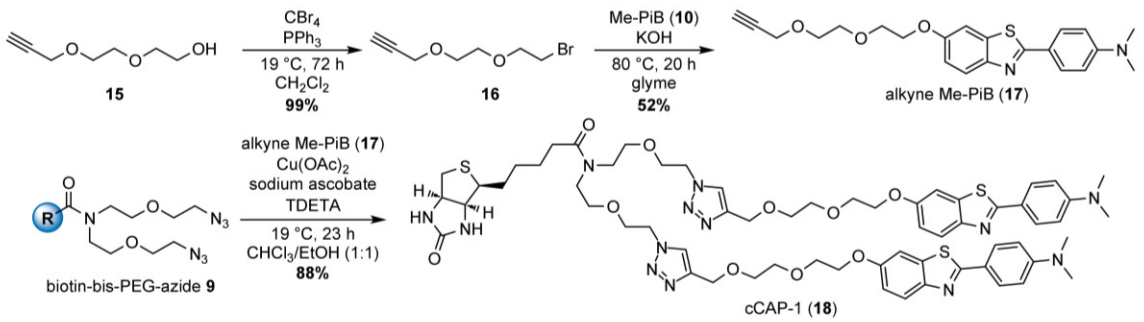
Starting from cheap D-biotin (**2**), the terminal acid was transformed into the corresponding *N*-hydroxy succinimide (NHS) ester for carbonyl activation. The reaction with disuccinimidyl carbonate (DSC) provided the NHS-activated biotin **3** in 95% yield without the need of chromatographic purification (Scheme 1).[22] The symmetric amino alcohol linker **4** was synthesized in a one-step procedure from 2-(2-chloroethoxy)ethanol (**5**) and an excess of 2-(2-aminoethoxy)-ethanol (**6**) in the presence of anhydrous sodium carbonate in refluxing toluene.[23] Distillation of the residue gave amino alcohol **4** in 66% yield, ready for coupling with activated biotin. Due to the early stage amide coupling, the formation of the tertiary amine reduces the inherent nucleophilicity of the linker nitrogen and redundantizes an additional protecting group strategy, as employed by Rodrigues et al. or in the patented synthesis of biotin-bis-PEG$_3$-azide by Esko et al.[10,24,25] The reaction between the unprotected amino alcohol **4** and NHS-biotin **3** was carried out using triethylamine (TEA) as base, yielding 77% of the bis-hydroxy-functionalized biotin **7** as sticky oil, which was only soluble in DMSO, MeOH, or DMF, limiting the solvent options for further transformations. A direct approach from D-biotin to bis-hydroxybiotin **7** with *in situ* activation of biotin using *N*,*N*′-carbonylide imidazole (CDI) led to product formation in 34% yield. As the terminal hydroxyl groups cannot be transformed directly into the corresponding azide, activation via intermediate alkyl halide or (pseudo)halide was necessary. Typical transformations to the alkyl bromide (Appel reaction) with CBr_4 and PPh_3 or alkyl mesylate with mesyl chloride failed or produced several side products. While searching for alternative halogenating reagents, we stumbled over the neglected methyltriphenoxyphosphonium iodide (MTPPI), which can be prepared in gram scale by the reaction of triphenyl phosphite and methyl iodide under solvent-free conditions.[26] Conversion of bis-hydroxy-biotin **7** with MTPPI provided the desired bis-iodide-biotin **8** in a good yield of 71% as a colorless oil. Lastly, halide substitution with sodium azide gave access to the clickable Y-shaped bis-azide-biotin **9** (biotin-bis-PEG-azide) as a colorless glass in 87% yield. The apparent advantage of our presented protecting-group-free synthesis is easy access to all three biotin derivatives with branched linker architecture (biotin-bis-PEG$_2$-alcohol **7**, -PEG-iodide **8**, and -PEG-azide **9**) with synthetically interesting functional groups, as they can be used for further functional group interconversions. This advantage is not given in the published synthesis of biotin-bis-PEG$_3$-azide.[24,25] As the azide moiety is attached to the biotin unit, click chemistry with alkyne-functionalized probes is not limited to copper-catalyzed CuAAC, but it can also be extended to the strain-promoted SPAAC reactions.

https://doi.org/10.1021/acs.orglett.4c02527
Org. Lett. 2024, 26, 6771−6775

Scheme 2. Synthesis of *N*-Methyl PiB 10 from Pittsburgh B (1) and 2-Amino-6-methyoxybenzothiazol (11)



Scheme 3. Synthesis of the Clicked Amyloid Capture Molecule cCAP-1 (18)



With the terminal probe of CAP-1 not being commercially available, we sought two individual and reliable approaches, giving rise to *N*-methyl PiB **10** in good yields and with low purification effort. First, commercially available PiB **1** was *N*-methylated in an Eschweiler–Clarke reaction using a modified procedure of Kaur et al. for differently substituted benzothiazoles and of Reed et al. for anilines (Scheme 2).[27,28] Therefore, PiB **1** was reacted with sodium cyanoborohydride and paraformaldehyde under acidic conditions to give *N*-methyl PiB **10** in 97% yield, with a simple extraction and washing of the solid product. Although this procedure is simple to perform and the product is contrivable in excellent yields, the high cost of PiB **1** is a significant disadvantage of this route.

Second, we aimed to synthesize *N*-methyl PiB **10** from cheap and available sources to offer alternative routes to the valuable probe. As a consequence, 6-methoxybenzothiazol-2-ylamine (**11**, CAS 1747-60-0) was chosen as the starting material and subjected to basic ring opening with NaOH in aqueous solution (Scheme 2). Although the obtained yields varied between 60 and 90%, careful handling under inert atmosphere including utilization of degassed solvent was a prerequisite for a reliable outcome of the reaction, as otherwise the oxygen-induced competing disulfide formation took place (black product instead of bright-yellow). Based on aminothiol **12**, the benzothiazole scaffold was built in an optimized two-step procedure, involving a condensation of 2-amino-5-methoxybenzenethiol (**12**) and 4-(dimethylamino)-benzaldehyde (**13**), followed by an intramolecular cyclization and oxidation reaction. The best results in terms of yield and impurities were obtained when aminothiol **12** and aldehyde **13** were forced to form the dihydrobenzo[*d*]thiazole structure under inert atmosphere at 125 °C first, before brief oxidation under air furnished the oxidized benzothiazole **14** in 82% yield, while direct exposure to air led to more undesired side products. In general, we found that the more reactive aldehyde **13** is the superior coupling partner for aminothiol **12**, as the yield drops to 35% when the aldehyde is replaced by the corresponding acid as reported by Huang et al.[29] Final demethylation of the methoxy group with boron tribromide yielded 81% of *N*-methyl PiB **10** as an amorphous solid in gram quantities without the need of chromatographic purification in any of the presented steps in Scheme 2.

Initially, we aimed to use bis-iodide-biotin **8** for the etherification reaction with PiB **1** or Me-PiB **10** to reproduce the original structure of CAP-1 or an engineered derivative thereof. However, both attempts were not productive and thus dismissed. Instead, click chemistry for last-step functionalization of bis-azide-biotin **9** was selected. The installation of a suitable alkyne tail for the conjunction of the biotin and Me-PiB moieties via click chemistry was based on a diethylene glycol acetylene linker. The precursor **15** was first brominated in quantitative yield in an Appel reaction by substitution of the terminal hydroxy group (Scheme 3). In the following step, the *N*-methylated PiB **10** was *O*-functionalized with the described brominated alkyne linker **16**, similar to the PiB-functionalization of Diner et al.[30] Etherification of the dummy substrate PiB **1** with alkyne bromide **16** turned out to be challenging because many solvent/base combinations either led to no conversion, low conversion, or undesired side products. The best solution was a heterogenic reaction system of KOH in dry glyme at 80 °C, which was the only combination suitable to render near-full conversion and to present alkyne Me-PiB **17** in a yield of 52%. By utilizing the recently published Cu(I)/Cu(II) ligand TDETA [tris((dimethylethyl)triazolyl)amine; for structure see Supporting Information, Figure S1],[31] the modified clicked capture molecule cCAP-1 **18** was synthesized in 88% yield from bis-azide-functionalized biotin **9** and the alkyne Me-PiB **17** in a copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) under reducing conditions.

With the biotinylated dual-payload probe cCAP-1 **18** being available for further testing, we first characterized the intrinsic

https://doi.org/10.1021/acs.orglett.4c02527
Org. Lett. 2024, 26, 6771–6775

fluorescence in the presence or absence of α-syn fibrils, as fluorescence enhancement upon fibril binding is a common feature of benzothiazoles (e.g., thioflavin T and CAP-1) and can be utilized for imaging purposes of fibrillar protein aggregates or their quantification.[10,11,15,30,32,33] Upon binding of the *in vitro* generated α-syn fibrils, a 2.8-fold increase of absorption and a 2.9-fold fluorescence enhancement were observed for cCAP-1 **18**, accompanied by a Stokes shift of 52 nm (Figure S2A, Supporting Information). Furthermore, we could show a linear increase of fluorescence of cCAP-1 **18** in a range from 0 to 200 nM in phophate-buffered saline (Figure S2B, Supporting Information), proving comparable fluorescence and solubility properties to the original CAP-1 structure.[10] A highly specific and affine interplay between streptavidin and biotin or functional biotin moieties is a key prerequisite in several pull-down strategies aiming for purification or quantification of target molecules.[1,10,34−36] We highlighted the interaction of streptavidin-coated polystyrene plates with preincubated cCAP-1 **18** and purified α-syn fibrils to selectively accumulate α-syn fibrils in comparison to a cCAP-1-free control *in vitro* (Figure S2C, Supporting Information).

In conclusion, we generated a reliable and high yielding synthesis toward branched biotinylated-bis-PEG-azide chassis **9** suitable for late-stage functionalization and rapid library preparation with arbitrary alkyne probes via (bioorthogonal) click chemistry (CuAAC and SPACC). On the example of and inspired by the previously reported compound CAP-1, we showcased the potential of the novel chassis by providing the clicked capture molecule for amyloid precipitation cCAP-1 **18** with dual probe loading as a synthetically more tractable and economic alternative for the detection of protein fibrils associated with neurodegenerative diseases, exemplified on α-synuclein. Furthermore, we were able to present two independent routes leading to the noncommercially available Me-PiB **10** probe, either starting from commercially available but yet expensive PiB **1**, or from cheap and available 6-methoxybenzothiazol-2-ylamine (**11**). Consequently, biochemical in-depth characterization of cCAP-1 will be needed to fully comprehend amyloid- and streptavidin-binding of biotinylated cCAP-1 in combination with complex biofluids and in comparison to well-characterized CAP-1.

■ ASSOCIATED CONTENT

Data Availability Statement

The data underlying this study are available in the published article and its Supporting Information.

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.orglett.4c02527.

Complete experimental procedures and compound characterization (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Jörg Pietruszka − *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Bioorganische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich, 52428 Jülich, Germany; Institut für Bio- und Geowissenschaften 1 (IBG-1: Biotechnologie), Forschungszentrum Jülich, 52428 Jülich, Germany;* orcid.org/0000-0002-9819-889X; Email: j.pietruszka@fz-juelich.de

Authors

T. Moritz Weber − *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Bioorganische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich, 52428 Jülich, Germany;* orcid.org/0000-0003-3085-2290

Pelin Özdüzenciler − *Institut für Biologische Informationsprozesse 7 (IBI-7: Strukturbiochemie), Forschungszentrum Jülich, 52428 Jülich, Germany; Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany;* orcid.org/0000-0002-9235-2147

Gültekin Tamgüney − *Institut für Biologische Informationsprozesse 7 (IBI-7: Strukturbiochemie), Forschungszentrum Jülich, 52428 Jülich, Germany; Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany*

Complete contact information is available at: https://pubs.acs.org/10.1021/acs.orglett.4c02527

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Jürgen Manchot Foundation for project funding (doctoral scholarship to T.M.W.), the Heinrich Heine University Düsseldorf as well as the Forschungszentrum Jülich (FZJ) for their ongoing support, and Alexandra Leyens (FZJ) for initial experiments.

■ REFERENCES

(1) Weber, P. C.; Ohlendorf, D. H.; Wendoloski, J. J.; Salemme, F. R. 'Structural Origins of High-Affinity Biotin Binding to Streptavidin. *Science* **1989**, *243*, 85−88.

(2) Elia, G. 'Biotinylation reagents for the study of cell surface proteins. *Proteomics* **2008**, *8*, 4012−4024.

(3) Ganji, M.; Shaltiel, I. A.; Bisht, S.; Kim, E.; Kalichava, A.; Haering, C. H.; Dekker, C. Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin. *Science* **2018**, *360*, 102−105.

(4) Welcher, A. A.; Torres, A. R.; Ward, D. C. Selective enrichment of specific DNA, cDNA and RNA sequences using biotinylated probes, avidin and copper-chelate agarose. *Nucleic Acids Res* **1986**, *14*, 10027−10044.

(5) de Boer, E.; Rodriguez, P.; Bonte, E.; Krijgsveld, J.; Katsantoni, E.; Heck, A.; Grosveld, F.; Strouboulis, J. Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 7480−7485.

(6) Kenry; Liu, B. Bio-orthogonal Click Chemistry for In Vivo Bioimaging. *Trends Chem* **2019**, *1*, 763−778.

(7) Baskin, J. M.; Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Click Chemistry: Covalent Labeling in Living Systems. *QSAR Comb. Sci* **2007**, *26*, 1211−1219.

(8) Park, S. R.; Hauver, J.; Zhang, Y.; Revyakin, A.; Coleman, R. A.; Tjian, R.; Chu, S.; Pertsinidis, A. A Single-Molecule Surface-Based Platform to Detect the Assembly and Function of the Human RNA

Polymerase II Transcription Machinery. *Structure* **2020**, *28*, 1337−1343.
(9) Oslund, R. C.; Reyes-Robles, T.; White, C. H.; Tomlinson, J. H.; Crotty, K. A.; Bowman, E. P.; Chang, D.; Peterson, V. M.; Li, L.; Frutos, S.; Vila-Perelló, M.; Vlerick, D.; Cromie, K.; Perlman, D. H.; Ingale, S.; O' Hara, S. D.; Roberts, L. R.; Piizzi, G.; Hett, E. C.; Hazuda, D. J.; Fadeyi, O. O. Detection of cell−cell interactions via photocatalytic cell tagging. *Nat. Chem. Biol.* **2022**, *18*, 850−858.
(10) Rodrigues, M.; Bhattacharjee, P.; Brinkmalm, A.; Do, D. T.; Pearson, C. M.; De, S.; Ponjavic, A.; Varela, J. A.; Kulenkampff, K.; Baudrexel, I.; Emin, D.; Ruggeri, F. S.; Lee, J. E.; Carr, A. R.; Knowles, T. P. J.; Zetterberg, H.; Snaddon, T. N.; Gandhi, S.; Lee, S. F.; Klenerman, D. Structure-specific amyloid precipitation in biofluids. *Nat. Chem.* **2022**, *14*, 1045−1053.
(11) LeVine, H., III In *Methods Enzymol*; Elsevier, 1999; Vol. *309*, pp 274−284.
(12) Serrano-Pozo, A.; Frosch, M. P.; Masliah, E.; Hyman, B. T. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **2011**, *1*, a006189.
(13) Scheres, S. H. W.; Ryskeldi-Falcon, B.; Goedert, M. Molecular pathology of neurodegenerative diseases by cryo-EM of amyloids. *Nature* **2023**, *621*, 701−710.
(14) Willbold, D.; Strodel, B.; Schröder, G. F.; Hoyer, W.; Heise, H. Amyloid-type Protein Aggregation and Prion-like Properties of Amyloids. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 8285−8307.
(15) Klunk, W. E.; Engler, H.; Nordberg, A.; Wang, Y.; Blomqvist, G.; Holt, D. P.; Bergström, M.; Savitcheva, I.; Huang, G. F.; Estrada, S.; Ausén, B.; Debnath, M. L.; Barletta, J.; Price, J. C.; Sandell, J.; Lopresti, B. J.; Wall, A.; Koivisto, P.; Antoni, G.; Mathis, C. A.; Långström, B. Imaging Brain Amyloid in Alzheimer's Disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann. Neurol.* **2004**, *55*, 306−319.
(16) Fodero-Tavoletti, M. T.; Smith, D. P.; McLean, C. A.; Adlard, P. A.; Barnham, K. J.; Foster, L. E.; Leone, L.; Perez, K.; Cortés, M.; Culvenor, J. G.; Li, Q.-X.; Laughton, K. M.; Rowe, C. C.; Masters, C. L.; Cappai, R.; Villemagne, V. L. *In Vitro* Characterization of Pittsburgh Compound-B Binding to Lewy Bodies. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 10365−10371.
(17) Meade, R. M.; Fairlie, D. P.; Mason, J. M. Alpha-synuclein structure and Parkinson's disease−lessons and emerging principles. *Mol. Neurodegener.* **2019**, *14*, 29.
(18) Siderowf, A.; Concha-Marambio, L.; Lafontant, D.-E.; Farris, C. M.; Ma, Y.; Urenia, P. A.; Nguyen, H.; Alcalay, R. N.; Chahine, L. M.; Foroud, T.; Galasko, D.; Kieburtz, K.; Merchant, K.; Mollenhauer, B.; Poston, K. L.; Seibyl, J.; Simuni, T.; Tanner, C. M.; Weintraub, D.; Videnovic, A.; Choi, S. H.; Kurth, R.; Caspell-Garcia, C.; Coffey, C. S.; Frasier, M.; Oliveira, L. M. A.; Hutten, S. J.; Sherer, T.; Marek, K.; Soto, C. Assessment of heterogeneity among participants in the Parkinson's Progression Markers Initiative cohort using α-synuclein seed amplification: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* **2023**, *22*, 407−417.
(19) Okuzumi, A.; Hatano, T.; Matsumoto, G.; Nojiri, S.; Ueno, S.-i.; Imamichi-Tatano, Y.; Kimura, H.; Kakuta, S.; Kondo, A.; Fukuhara, T.; Li, Y.; Funayama, M.; Saiki, S.; Taniguchi, D.; Tsunemi, T.; McIntyre, D.; Gérardy, J.-J.; Mittelbronn, M.; Kruger, R.; Uchiyama, Y.; Nukina, N.; Hattori, N. Propagative α-synuclein seeds as serum biomarkers for synucleinopathies. *Nat. Med.* **2023**, *29*, 1448−1455.
(20) Schaffrath, A.; Schleyken, S.; Seger, A.; Jergas, H.; Özdüzenciler, P.; Pils, M.; Blömeke, L.; Cousin, A.; Willbold, J.; Bujnicki, T.; Bannach, O.; Fink, G. R.; Willbold, D.; Sommerauer, M.; Barbe, M. T.; Tamgüney, G. Patients with isolated REM-sleep behavior disorder have elevated levels of alpha-synuclein aggregates in stool. *NPJ. Parkinsons Dis* **2023**, *9*, 14.
(21) Concha-Marambio, L.; Pritzkow, S.; Shahnawaz, M.; Farris, C. M.; Soto, C. Seed amplification assay for the detection of pathologic alpha-synuclein aggregates in cerebrospinal fluid. *Nat. Protoc.* **2023**, *18*, 1179−1196.
(22) Siewert, B.; Langerman, M.; Pannwitz, A.; Bonnet, S. Synthesis and Avidin Binding of Ruthenium Complexes Functionalized with a Light-Cleavable Free Biotin Moiety. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2018**, *2018*, 4117−4124.
(23) Bordunov, A. V.; Hellier, P. C.; Bradshaw, J. S.; Dalley, N. K.; Kou, X.; Zhang, X. X.; Izatt, R. M. Synthesis of New Pyridinoazacrown Ethers Containing Aromatic and Heteroaromatic Proton Ionizable Substituents. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6097−6102.
(24) Esko, J. D.; Tor, Y. Assisted Enzyme Replacement Therapy. World Patent WO 2011/034951 A2, 2011.
(25) Esko, J. D.; Tor, Y. Assisted Enzyme Replacement Therapy. U.S. Patent US 2018/0311321 A1, 2018.
(26) Verheyden, J. P. H.; Moffatt, J. G. Halo Sugar Nucleosides. I. Iodination of the Primary Hydroxyl Groups of Nucleosides with Methyltriphenoxyphosphonium Iodide. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 2319−2326.
(27) Kaur, I.; Shivani; Kaur, P.; Singh, K. 2-(2′-Hydroxyphenyl)-benzothiazole derivatives: Emission and color tuning. *Dyes Pigm.* **2020**, *176*, 108198.
(28) Reed, H.; Paul, T. R.; Chain, W. J. Synthesis of Halogenated Anilines by Treatment of *N,N*-Dialkylaniline *N*-Oxides with Thionyl Halides. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 11359−11368.
(29) Huang, Y.; Cho, H.-J.; Bandara, N.; Sun, L.; Tran, D.; Rogers, B. E.; Mirica, L. M. Metal-chelating benzothiazole multifunctional compounds for the modulation and ^{64}Cu PET imaging of Aβ aggregation. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 7789−7799.
(30) Diner, I.; Dooyema, J.; Gearing, M.; Walker, L. C.; Seyfried, N. T. Generation of Clickable Pittsburgh Compound B for the Detection and Capture of β-Amyloid in Alzheimer's Disease Brain. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 2627−2637.
(31) Weber, T. M.; Pietruszka, J. Synthesis of a Water-Soluble Tridentate (Dimethylamino)ethyl Cu(I)/Cu(II)-Ligand. *Synthesis* **2023**, *55*, 2128−2133.
(32) Xue, C.; Lin, T. Y.; Chang, D.; Guo, Z. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *R. Soc. Open Sci.* **2017**, *4*, 160696.
(33) Lopresti, B. J.; Klunk, W. E.; Mathis, C. A.; Hoge, J. A.; Ziolko, S. K.; Lu, X.; Meltzer, C. C.; Schimmel, K.; Tsopelas, N. D.; DeKosky, S. T.; Price, J. C. Simplified Quantification of Pittsburgh Compound B Amyloid Imaging PET Studies: A Comparative Analysis. *J. Nucl. Med.* **2005**, *46*, 1959−1972.
(34) Dundas, C. M.; Demonte, D.; Park, S. Streptavidin−biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 9343−9353.
(35) Rybak, J. N.; Scheurer, S. B.; Neri, D.; Elia, G. Purification of biotinylated proteins on streptavidin resin: a protocol for quantitative elution. *Proteomics* **2004**, *4*, 2296−2299.
(36) Jain, A.; Liu, R.; Ramani, B.; Arauz, E.; Ishitsuka, Y.; Ragunathan, K.; Park, J.; Chen, J.; Xiang, Y. K.; Ha, T. Probing cellular protein complexes using single-molecule pull-down. *Nature* **2011**, *473*, 484−488.

■ NOTE ADDED AFTER ASAP PUBLICATION

Scheme 1 was corrected on July 25, 2024 shortly after its original publication.

https://doi.org/10.1021/acs.orglett.4c02527
Org. Lett. 2024, 26, 6771−6775

2.7 Krankheitsmodifizierende PD-Immunisierung mittels HET-s-basierter Kombinationsvakzinierung

Titel	Vaccination with structurally adapted fungal protein fibrils induces immunity to Parkinson's disease
Autoren	Verena Pesch, José Miguel Flores-Fernandez, Sara Reithofer, Liang Ma, **Pelin Özdüzenciler**, Yannick Busch, Aishwarya Sriraman, YongLiang Wang, Sara Amidian, Chiara V M Kroepel, Laura Müller, Yi Lien, Olivia Rudtke, Benedikt Frieg, Gunnar F Schröder, Holger Wille, Gültekin Tamgüney
Journal	**Brain (2024)**
DOI	10.1093/brain/awae061
Beitrag	**Eigener Anteil** ▪ Durchführung RT-QuIC Messungen ▪ Herstellung und Aufreinigung des α-Syn-Proteins ▪ Diskussion der Ergebnisse ▪ Beteiligung beim Korrigieren des Manuskripts
Ergänzende Informationen	Pesch et al. Supplementary Material / s. Anhang 5.4
Druckgenehmigung	**s. Anhang 5.10**

https://doi.org/10.1093/brain/awae061 BRAIN 2024: 147; 1644–1652 | 1644

BRAIN
REPORT

Vaccination with structurally adapted fungal protein fibrils induces immunity to Parkinson's disease

Verena Pesch,[1,†] José Miguel Flores-Fernandez,[2,†,‡] Sara Reithofer,[1,†] Liang Ma,[1,†] Pelin Özdüzenciler,[1] Yannick Busch,[1] Aishwarya Sriraman,[2] YongLiang Wang,[2,3] Sara Amidian,[2] Chiara V. M. Kroepel,[1] Laura Müller,[1] Yi Lien,[1] Olivia Rudtke,[1] Benedikt Frieg,[1] Gunnar F. Schröder,[1,4] Holger Wille[2,5] and Gültekin Tamgüney[1,6]

[†]These authors contributed equally to this work.
[‡]Deceased.

See Kinoshita *et al.* (https://doi.org/10.1093/brain/awae115) for a scientific commentary on this article.

The pathological misfolding and aggregation of soluble α-synuclein into toxic oligomers and insoluble amyloid fibrils causes Parkinson's disease, a progressive age-related neurodegenerative disease for which there is no cure. HET-s is a soluble fungal protein that can form assembled amyloid fibrils in its prion state. We engineered HET-s(218–298) to form four different fibrillar vaccine candidates, each displaying a specific conformational epitope present on the surface of α-synuclein fibrils. Vaccination with these four vaccine candidates prolonged the survival of immunized TgM83$^{+/-}$ mice challenged with α-synuclein fibrils by 8% when injected into the brain to model brain-first Parkinson's disease or by 21% and 22% when injected into the peritoneum or gut wall, respectively, to model body-first Parkinson's disease. Antibodies from fully immunized mice recognized α-synuclein fibrils and brain homogenates from patients with Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy. Conformation-specific vaccines that mimic epitopes present only on the surface of pathological fibrils but not on soluble monomers, hold great promise for protection against Parkinson's disease, related synucleinopathies and other amyloidogenic protein misfolding disorders.

1 Institut für Biologische Informationsprozesse, Strukturbiochemie (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, 52425 Jülich, Germany
2 Department of Biochemistry and Centre for Prions and Protein Folding Diseases, University of Alberta, Edmonton, AB T6G 2M8, Canada
3 Department of Cell Biology and Anatomy, University of Calgary, Calgary, AB T2N 1N4, Canada
4 Physics Department, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany
5 Neuroscience and Mental Health Institute, University of Alberta, Edmonton, AB T6G 2M8, Canada
6 Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

Correspondence to: Gültekin Tamgüney
Institut für Biologische Informationsprozesse, Strukturbiochemie (IBI-7), Forschungszentrum Jülich,
Wilhelm-Johnen-Straße, 52425 Jülich, Germany
E-mail: e.tamgueney@fz-juelich.de

Correspondence may also be addressed to: Dr Holger Wille
Department of Biochemistry and Centre for Prions and Protein Folding Diseases, University of Alberta, 110C Brain and

Received August 14, 2023. Revised January 05, 2024. Accepted February 10, 2024. Advance access publication March 1, 2024
© The Author(s) 2024. Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Aging Research Building (BARB), Edmonton, AB T6G 2M8, Canada
E-mail: wille@ualberta.ca

Keywords: alpha-synuclein; amyloid; conformation; immunization; fibril; vaccine

Introduction

α-Synuclein (α-syn) is a cytosolic protein that under physiological conditions is soluble. Pathologic aggregation of α-syn into toxic oligomers and insoluble amyloid fibrils causes Parkinson's disease (PD), Lewy body dementia (LBD), multiple system atrophy (MSA) and other age-related progressive neurodegenerative diseases for which there is no cure.[1-3] These diseases are characterized by deposits of pathological α-syn aggregates known as Lewy bodies in PD and LBD, and as glial cytoplasmic inclusions in MSA.

Pathological aggregates of α-syn have prion-like properties because they can spread from diseased to unaffected neurons and there seed *de novo* aggregation of α-syn by recruiting monomeric α-syn into growing fibrils. Large fibrils fracture and give rise to smaller seeds that feed this vicious cycle. Transmission of pathological α-syn aggregates between neurons has been found to be transsynaptic and may involve multiple mechanisms.[4] Studies show that α-syn pathology can spread within the nervous system.[5,6] The rostro-caudal spread of α-syn pathology within the CNS in PD is described by the Braak staging system.[6] Additional evidence shows that α-syn pathology can spread from the enteric nervous system (ENS), which innervates the gastrointestinal tract, to the CNS, along peripheral nerves or in the blood.[7-11]

Because α-syn is a self-antigen, the immune system does not mount a sufficiently protective response to pathological α-syn aggregates. Advances in solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and electron cryo-microscopy (cryo-EM) have helped to solve the structures of synthetic[12,13] and *ex vivo* α-syn fibrils isolated from patients' brains.[14,15] Here, we designed a quadrivalent vaccine to induce an immune response against pathological α-syn fibrils by molecular grafting of conformational epitopes present on α-syn fibrils onto the carrier molecule HET-s(218–289), the prion domain of HET-s found in the filamentous fungus *Podospora anserina*.[16] We show in mouse models of PD that vaccination with this quadrivalent vaccine induces antibodies that recognize α-syn fibrils and protect against PD-like symptoms, resulting in improved motor performance and prolonged survival.

Materials and methods

Full details of the methods are provided in the Supplementary material.

Results

HET-s can be modified to engineer fibrillar vaccine candidates that mimic pathological α-syn fibrils

The C-terminal residues 218–289 of HET-s are unstructured in solution and can form self-propagating fibrils that regulate heterokaryon incompatibility.[17] Fibrillar HET-s(218–289) (Fig. 1A) consists of four β-strands that form two windings of a left-handed β-solenoid (Fig. 1B and C).[18,19] Based on two structures of synthetic α-syn fibrils solved by solid-state NMR[12] and cryo-EM,[13] we introduced selected amino acid residues in human α-syn, which form distinct conformational surface epitopes only present in the fibrillar state (Fig. 1D–G) into HET-s(218–289) by mutagenesis to obtain the four vaccine candidates α-SC3 (Fig. 1D), α-SC6 (Fig. 1E), α-SC8 (Fig. 1F) and α-SC9 (Fig. 1G). Transmission electron microscopy revealed that purified proteins from all four vaccine candidates formed fibrils (Supplementary Fig. 1). To ensure that modified HET-s(218–289) fibrils bearing conformational surface epitopes of α-syn fibrils are safe and would not seed aggregation of α-syn in animals or humans after vaccination due to a partial similarity to α-syn fibrils, we assessed the ability of each vaccine candidate to seed aggregation of monomeric α-syn in a real-time quaking induced conversion (RT-QuIC) assay. In contrast to synthetic *N*-acetylated human α-syn fibrils (Supplementary Fig. 2), none of the four HET-s-derived fibrils induced aggregation of monomeric α-syn (Supplementary Fig. 3).[20] We also evaluated the ability of the four vaccine candidates to seed α-syn aggregation in HEK293T cells expressing human α-syn with the familial A53T mutation fused to enhanced yellow fluorescent protein (α-synA53T-YFP; Supplementary Fig. 4).[21] In this cell assay, transfection with synthetic human α-syn fibrils (Supplementary Fig. 2) seeded aggregation of α-syn A53T-YFP, but transfection with either one of the four vaccine candidates did not. The inability to seed aggregation of monomeric α-syn in the RT-QuIC assay and in cells suggested that the four vaccine candidates would be safe to use in mice overexpressing human α-syn without inadvertently inducing disease by seeding the aggregation of α-syn.

α-Syn fibrils for vaccine candidate development and challenge are structurally nearly identical

Cryo-EM analysis of the full-length *N*-acetylated human wild-type α-syn fibrils used in our study to challenge TgM83$^{+/-}$ mice revealed fibrils [Protein Data Bank (PDB) ID 8OQ1] that were structurally nearly identical to fibrils formed by non-acetylated and C-terminally truncated α-syn (PDB ID 6H6B; Fig. 2, Supplementary Fig. 5 and Supplementary Tables 1 and 2). Since the 6H6B fibril was considered in the design of vaccine candidates α-SC6, α-SC8 and α-SC9, the similarity between the α-syn fibrils used in this study and those used in the design of three of our vaccine candidates (PDB ID 6H6B) suggested that they could induce protective immunity in TgM83$^{+/-}$ mice. Furthermore, structural similarities between the grafted conformational epitopes used in our vaccine candidates (Fig. 1D–G) and those present in *ex vivo* fibrils from patients with synucleinopathies also suggested that immunization with these vaccines could induce antibodies able to recognize patient brain homogenates (Supplementary Fig. 6).[14,15]

Vaccination prolongs survival in brain-first and body-first mouse models of Parkinson's disease

Hemizygous TgM83$^{+/-}$ mice express human α-syn with the familial A53T mutation but do not naturally develop any neuropathology or disease for up to 650 days.[10,22] Injection of patient-derived and synthetic α-syn fibrils induces a PD-like neuropathology and disease in

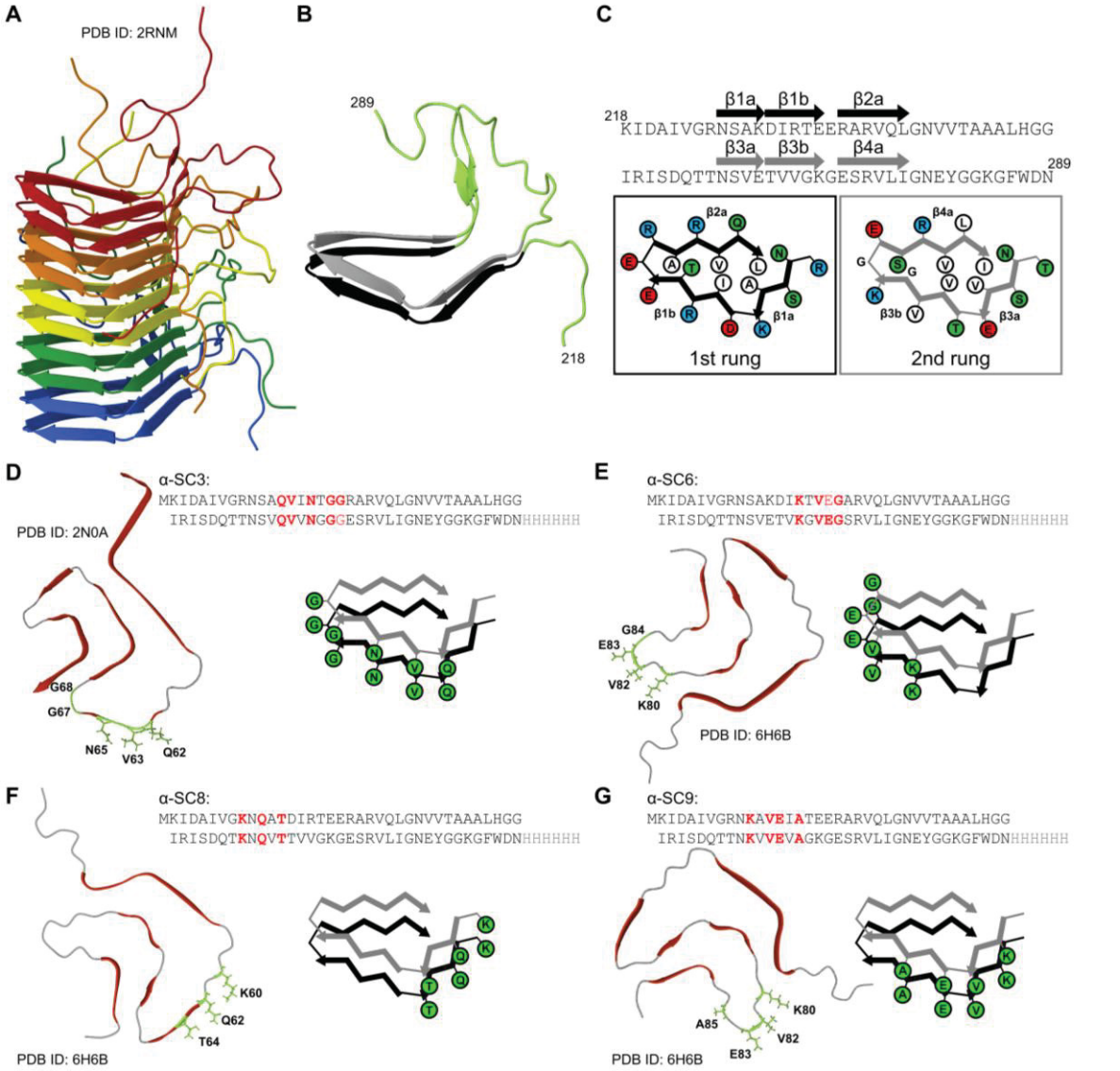


Figure 1 HET-s-based vaccine candidates display conformational epitopes present on α-synuclein (α-syn) fibrils. (**A**) HET-s(218–289) forms fibrils *in vitro*, shown here as a heptamer [protein data bank (PDB) ID: 2RNM].[18] (**B**) In fibrillar HET-s(218–289) eight β-strands form two windings of a left-handed β solenoid. Six β-strands form a two-rung (black and grey) triangular hydrophobic core. (**C**) Polar, hydrophobic, negatively charged and positively charged residues are coloured green, white, red and blue, respectively. (**D**) In α-SC3, K229, D230, R232, E234 and E235 in the first rung, and E265, T266, V268, K270 and G271 in the second rung, of HET-s were replaced by Q62, V63, N65, G67 and G68 of α-syn to model a fold in fibrillar α-syn with PDB ID 2N0A.[12] (**E**) In α-SC6, R232, E234, (E235) and R236 in the first rung, and V268, K270, G271 and E272 in the second rung, of HET-s were replaced by K80, V82, E83 and G84 of α-syn to model a fold in fibrillar α-syn with PDB ID 6H6B.[13] (**F**) In α-SC8, R225, S227 and K229 in the first rung, and T261, S263 and E265 in the second rung, of HET-s were replaced by K60, Q62 and T64 of α-syn to model a fold in fibrillar α-syn with PDB ID 6H6B. (**G**) In α-SC9, S227, K229, D230 and R232 in the first rung, and S263, E265, T266 and V268 in the second rung, of HET-s were replaced by K80, V82, E83 and A85 of α-syn to model a fold in fibrillar α-syn with PDB ID 6H6B.

these mice with variable incubation times depending on the dose and the route of injection.[10,23] To determine whether vaccination with a quadrivalent mixture of α-SC3, α-SC6, α-SC8 and α-SC9 fibrils could induce immunity to misfolded α-syn and protect against the neuropathology and disease it causes, we injected adult TgM83$^{+/-}$ mice intraperitoneally with the quadrivalent mixture every 2 weeks for a total of four times (Fig. 3A). To monitor the immune response of TgM83$^{+/-}$ mice, we collected plasma once before and every 2 weeks after the vaccine was administered and stored it for later analysis (Fig. 3A).

Recent evidence from human and animal studies suggests that PD patients can be subtyped into those in whom the α-syn pathology associated with prodromal PD first develops in either the CNS or the ENS, referred to as brain-first and body-first PD, respectively.[24] Subsequently, α-syn pathology may spread in a prion-like manner from the CNS to the peripheral nervous system in brain-first PD or

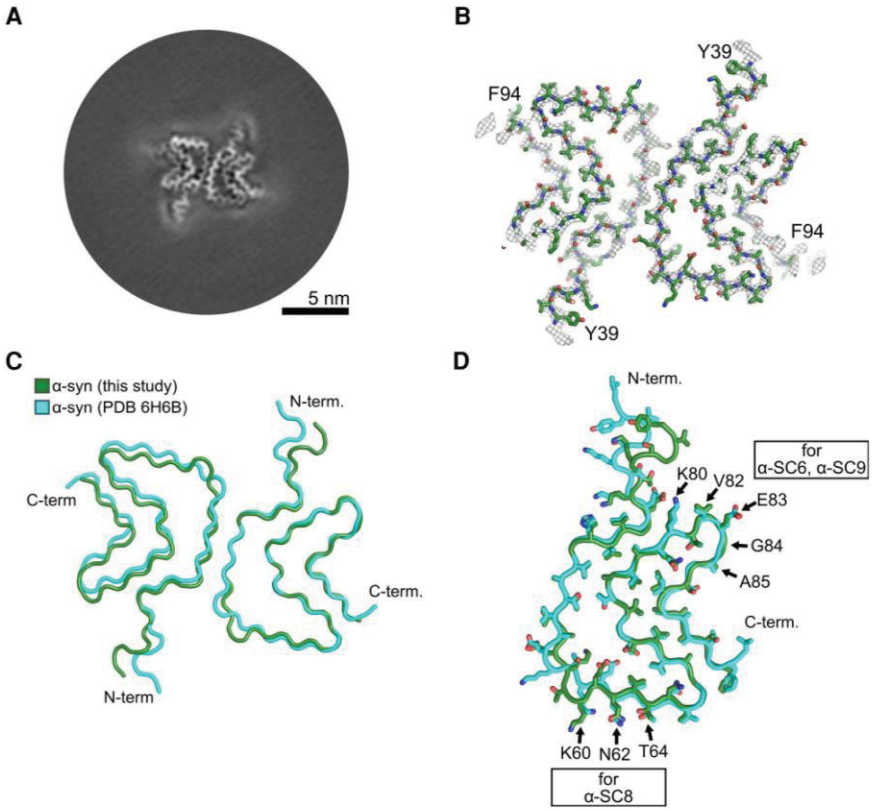


Figure 2 Cryo-EM analysis shows a high similarity between α-synuclein (α-syn) fibrils used to develop vaccine candidates and those used to challenge TgM83$^{+/-}$ mice (Protein Data Bank ID 8OQ1). (**A**) A cross-section through the reconstructed density map. (**B**) Superposition of the final density map (grey mesh) and the atomic model (green sticks). The labels indicate the N- and C-terminal residues. (**C**) Superposition of two opposing subunits or only a single chain (**D**) extracted from the atomic model of the *N*-acetylated human α-syn fibril and a previously determined wild-type α-syn fibril (shown in green) with Protein Data Bank (PDB) ID 6H6B (shown in cyan). Residues selected to model the vaccine candidates α-SC6, α-SC8 and α-SC9 are labelled.

from the ENS to the CNS in body-first PD, resulting in a late stage disease that is very similar in both PD subtypes. To model brain-first PD, we intracerebrally injected fully vaccinated TgM83$^{+/-}$ mice with synthetic α-syn fibrils (Fig. 2 and Supplementary Fig. 5) to induce synucleinopathy starting in the brain (Fig. 3B). Immunization significantly ($P < 0.05$) prolonged median survival from 154 days in unvaccinated control mice ($n = 20$) to 166 days (8%) in vaccinated mice. To model body-first PD, we injected vaccinated TgM83$^{+/-}$ mice with α-syn fibrils either into the peritoneum (Fig. 3C) or into the wall of the stomach and pylorus (Fig. 3D). In intraperitoneally challenged mice, immunization significantly ($P < 0.01$) extended median survival from 223 days in unvaccinated control mice to 271 days (22%) in vaccinated mice. In mice injected with α-syn fibrils into the gut wall, immunization significantly ($P < 0.05$) extended median survival from 231 days in unvaccinated control mice to 280 days (21%) in vaccinated mice. In general, mice injected with α-syn fibrils into the peritoneum or gut wall died later than mice injected into the brain because of the additional time it takes for pathologic α-syn to spread from the ENS to the CNS. We confirmed neurological disease in diseased mice (Supplementary Fig. 7) either by immunohistochemistry or immunofluorescence staining for deposits of pathologic α-syn in the brainstem, which was accompanied by microgliosis and astrogliosis, or by biochemistry for accumulation of pathological α-syn aggregates in brain homogenates. In conclusion, vaccination prolonged the median survival of TgM83$^{+/-}$ mice and delayed the onset of PD-like neuropathological mechanisms in the CNS.

Vaccination protects against weight loss and motor performance deficits

We monitored TgM83$^{+/-}$ mice challenged with α-syn fibrils for weight loss and decline in motor performance, both of which are early surrogate markers of neurological disease. Both immunized and non-immunized TgM83$^{+/-}$ mice challenged with α-syn fibrils initially gained weight before losing weight (Supplementary Fig. 8) and developing neurological disease. In all three models of brain-first and body-first PD, immunized mice gained weight for longer periods of time than non-immunized mice (Fig. 3E). All TgM83$^{+/-}$ mice injected with α-syn fibrils into the brain were still gaining weight 2 months after challenge. At 3 months post challenge, this decreased to 90% for immunized and 82% for non-immunized mice. At 4 months post challenge, only 46% of immunized and 37% of non-immunized mice were still gaining weight. All TgM83$^{+/-}$ mice injected with α-syn fibrils into the peritoneum or intestinal wall still gained weight at 5 months after challenge. For intraperitoneally challenged mice, this decreased to 91% for immunized and 58% for non-immunized mice at 7 months post challenge. Among these, only 55% of the immunized and 21% of

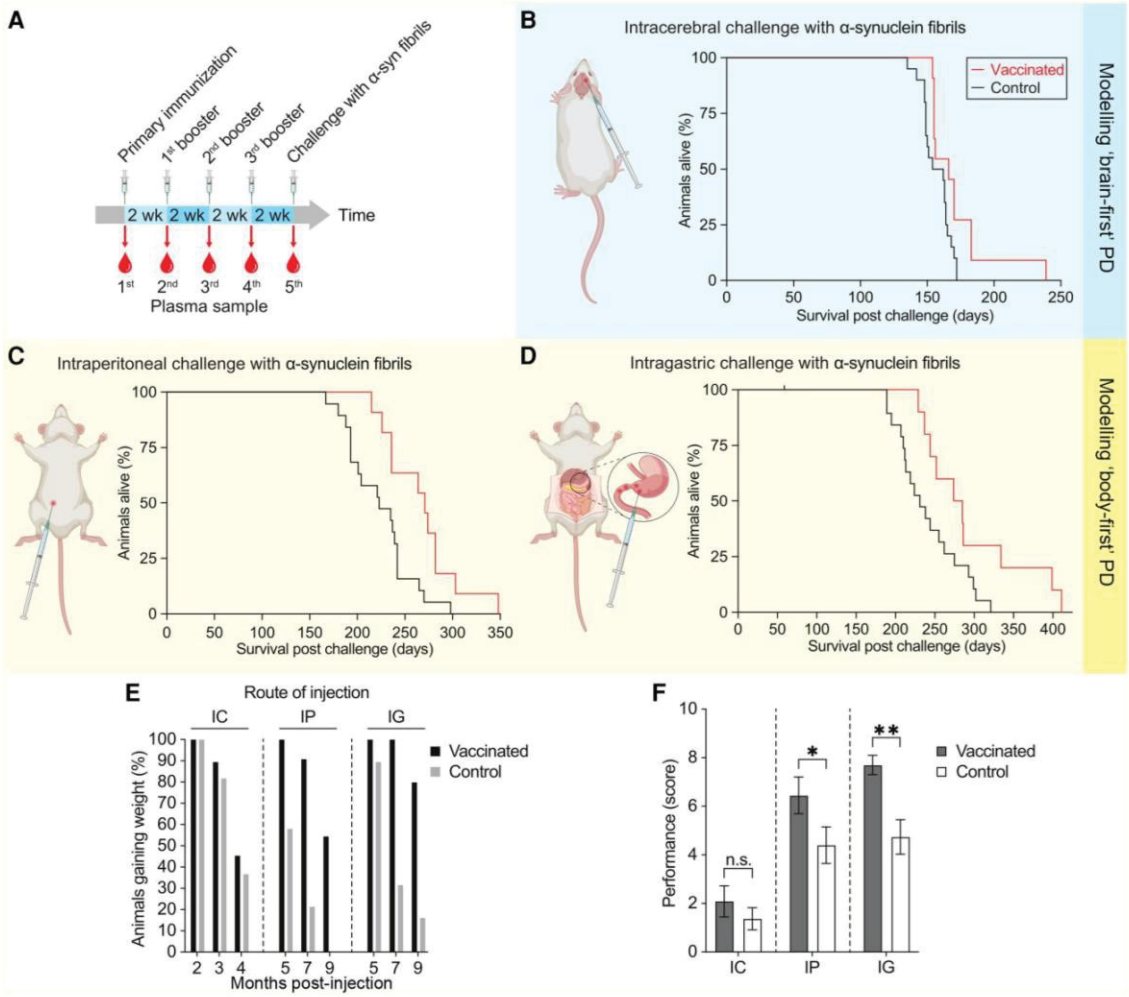


Figure 3 Vaccination prolongs the survival of challenged TgM83$^{+/-}$ mice and protects against motor dysfunction. (**A**) TgM83$^{+/-}$ mice were immunized intraperitoneally with a mixture of four vaccine candidates every 2 weeks for a total of four doses. To monitor the immune response, plasma was collected once before and every 2 weeks after administration of the quadrivalent vaccine. (**B**) TgM83$^{+/-}$ mice were intracerebrally injected with α-synuclein (α-syn) fibrils to induce a synucleinopathy starting in the brain to model brain-first Parkinson's disease (PD). Immunization significantly ($P < 0.05$) prolonged median survival from 154 days in unimmunized control mice ($n = 20$) to 166 days in fully vaccinated mice ($n = 11$). (**C** and **D**) To model body-first PD, mice were injected with α-syn fibrils into (**C**) the peritoneum or (**D**) the intestinal wall. (**C**) In intraperitoneally challenged mice, vaccination significantly ($P < 0.01$) extended median survival from 223 days in non-immunized control mice ($n = 19$) to 271 days in fully immunized mice ($n = 11$). (**D**) In mice injected with α-syn fibrils into the intestinal wall, vaccination significantly ($P < 0.05$) prolonged median survival from 231 days in non-immunized control mice ($n = 20$) to 280 days in fully immunized mice ($n = 10$). Survival was analysed using Kaplan–Meier curves and the log-rank (Mantel–Cox) test. (**E**) TgM83$^{+/-}$ mice challenged with α-syn fibrils initially gained weight to a maximum before they began to lose weight and develop neurological disease. In all three models of brain-first and body-first PD, immunized animals gained weight for longer periods of time than non-immunized animals. For mice injected intracerebrally with α-syn fibrils, the percentage of animals gaining weight is shown at 2, 3 and 4 months post challenge, and for animals injected intraperitoneally or into the intestinal wall at 5, 7 and 9 months post challenge. (**F**) The motor performance of immunized and non-immunized TgM83$^{+/-}$ mice was assessed at different time points after challenge with α-syn fibrils using the rotarod, grip strength and the pole test assays. In animals injected intracerebrally with α-syn fibrils, the cumulative performance score of immunized animals was higher than that of non-immunized animals but did not reach significance at 5 months post challenge. For animals injected intraperitoneally or into the intestinal wall with α-syn fibrils, the cumulative performance score of immunized animals was significantly higher than that of non-immunized animals at 7 months post challenge. Bars represent the mean ± SEM. Welch's *t*-test. *$P < 0.05$, **$P < 0.01$. IC = intracerebral; IG = into the gut wall; IP = intraperitoneal.

the non-immunized mice were still gaining weight at 9 months post challenge. In mice injected with α-syn fibrils into the intestinal wall, 100% of the immunized mice and 90% of the non-immunized still gained weight 7 months after challenge. At 9 months post challenge, this was reduced to 80% in immunized mice and 32% in non-immunized. Overall, we observed a slower weight loss in all immunized animals after challenge with α-syn fibrils, regardless of the route of challenge. Since the disease progressed more rapidly in animals challenged intracerebrally than in those challenged peripherally, also weight loss progressed more quickly in animals challenged intracerebrally than in those challenged peripherally.

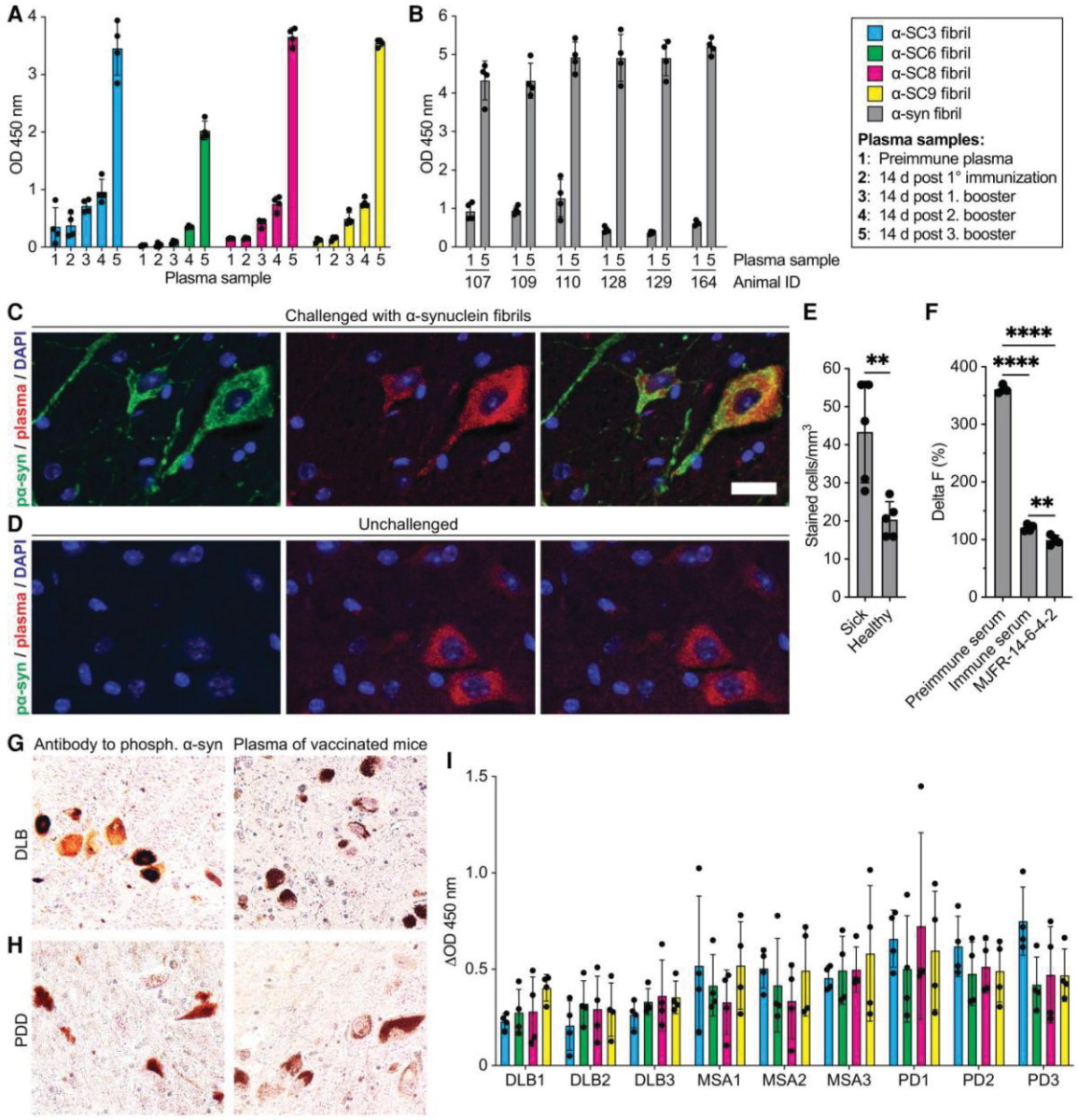


Figure 4 Vaccination of TgM83$^{+/-}$ mice with HET-s-derived vaccine candidates induces antibodies targeting pathologic α-synuclein. (**A**) The immune response to each of the four fungal fibrils increased progressively with each booster vaccination. d = days; OD = optical density. (**B**) Antibodies from fully vaccinated mice recognized α-synuclein (α-syn) fibrils better than antibodies from unvaccinated mice. (**C**) Immunofluorescence staining of brainstem sections from diseased TgM83$^{+/-}$ mice with an antibody against α-syn phosphorylated at serine 129 (pα-syn, green) revealed somatic and neuritic deposits of pathologic α-syn that largely colocalized with deposits detected by antibodies from immunized mice (red) as shown in the merged image on the *right*. (**D**) In brainstem sections from healthy control mice, pα-syn (green) was not detected, but antibodies from immunized mice (red) detected some monomeric α-syn. Cell nuclei were stained with DAPI. The scale bar represents 20 µm. (**E**) The staining results indicate a significantly ($P < 0.01$) higher number of stained cells in brainstem sections of sick mice compared with healthy mice. (**F**) Time-resolved fluorescence resonance energy transfer (FRET) quantification was used to measure oligomeric and aggregated α-syn in brain homogenates of sick mice after immunoprecipitation with plasma antibodies coupled to magnetic beads. The results showed that vaccinated mice had α-syn recognizing antibodies in their plasma in contrast to non-vaccinated mice. The MJFR-14-6-4-2 antibody, which recognizes α-syn aggregates, was used as a positive control. The Delta F (%) value is calculated by dividing the difference between the ratio of the sample and the ratio of the negative control by the ratio of the negative control, and then multiplying the result by 100. (**G** and **H**) Immunohistochemical staining was performed on human brain tissue sections from a patient with dementia with Lewy bodies (DLB) (**G**) and one with Parkinson's disease with dementia (PDD) (**H**). The results showed that the pSyn#64 antibody to α-syn phosphorylated at serine 129 (*left*) and plasma of fully vaccinated mice (*right*) were both able to detect pathologic α-syn. (**I**) In a competitive ELISA, antibodies from fully immunized animals ($n = 4$) recognized brain homogenates from patients with DLB ($n = 3$), multiple system atrophy (MSA, $n = 3$) or Parkinson's disease ($n = 3$) better than brain homogenates from healthy controls ($n = 5$). Bars represent mean ± standard deviation. $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.0001$.

We evaluated the behavioural performance of immunized and non-immunized TgM83$^{+/-}$ mice at different time points after challenge with α-syn fibrils using the rotarod, grip strength, and pole-test assays and used them to calculate a cumulative performance score (Fig. 3F). In animals challenged intracerebrally with α-syn fibrils, the cumulative performance score of immunized animals was higher (2.09 ± 2.12) than that of non-immunized animals (1.37 ± 1.98) but did not reach significance at 5 months post-challenge because many animals in both immunized and non-immunized cohorts were already ill at that time. If we had selected an earlier time point, such as 4 months after the intracerebral challenge, we may have been able to detect a difference in motor performance. In animals injected intraperitoneally with α-syn fibrils, immunized animals had a significantly ($P < 0.05$) higher cumulative performance score (6.45 ± 2.50) than non-immunized animals (4.40 ± 3.35) at 7 months after challenge with α-syn fibrils. In animals injected with α-syn fibrils into the intestinal wall, the cumulative performance score of immunized animals (7.70 ± 1.25) was also significantly higher ($P < 0.001$) than that of non-immunized animals (4.74 ± 3.11) 7 months after challenge with α-syn fibrils. Overall, immunized animals showed better motor function for longer periods of time after challenge with α-syn fibrils.

Vaccination induces antibodies that recognize pathologic α-syn

Analysis of plasma collected from immunized mice by ELISA showed that the primary and three subsequent booster vaccinations had induced a progressive increase in antibody titres recognizing the four vaccine candidates, reaching a 10- to 70-fold increase in detection in fully immunized animals (Fig. 4A and Supplementary Fig. 9). Importantly, immunization with the vaccine candidates also increased immune recognition of α-syn fibrils (50 nM monomer equivalent) (Fig. 4B). Antibodies from fully immunized mice also recognized deposits of pathologic α-syn in the CNS of diseased mice and, to a lesser extent, monomeric α-syn in the CNS of healthy control animals, as detected by immunofluorescence staining (Fig. 4D and E). To demonstrate the presence of antibodies that recognize α-syn in the plasma of fully vaccinated mice, we immunoprecipitated α-syn from the brain homogenate of a sick mouse using preimmune serum, serum from fully vaccinated mice (immune serum) and the MJFF-14-6-4-2 antibody to misfolded α-syn coupled to protein G-coated magnetic beads. We then measured the amount of α-syn aggregates in the cleared brain homogenate using time-resolved fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis (Fig. 4F). Immunohistochemical staining was performed on sections of the substantia nigra from a patient with dementia with Lewy bodies (DLB) (Fig. 4G) and one with PD with dementia (Fig. 4H and Supplementary Table 3). The plasma of fully vaccinated mice was found to contain antibodies detecting pathologic α-syn. In a competitive ELISA, antibodies from fully immunized animals also recognized pathologic α-syn in brain homogenates from patients (Supplementary Table 4) with DLB ($n = 3$), MSA ($n = 3$) or PD ($n = 3$) when tested against brain homogenates from five healthy controls (Fig. 4I and Supplementary Fig. 10). While all four vaccine candidates induced antibodies that recognized patient brain homogenates of all three synucleinopathies better than the healthy control brain homogenates, the four vaccine candidates showed different efficacy against different disease-derived fibrils. For example, α-SC3 and α-SC8 induced a significantly ($P < 0.05$) stronger antibody response for PD than for MSA or DLB compared to α-SC6 and α-SC9 (Supplementary Fig. 11).

Discussion

The identification of the structures of α-syn fibrils has enabled us to engineer novel conformation-specific vaccines by epitope grafting onto a carrier molecule that can elicit a targeted immune response to pathogenic α-syn assemblies with a significant delay of disease onset times in one mouse model of brain-first PD and two mouse models of body-first PD. Previous vaccination strategies that have entered clinical trials have used modified, 8–12 amino acid C-terminal peptide fragments of α-syn to induce immune responses directed against its pathological form.[25-30] The quadrivalent vaccine developed here induced an antibody response that not only recognized synthetic α-syn fibrils and pathologic α-syn from TgM83$^{+/-}$ mice but also from patients suggesting that it may also provide protection against synucleinopathies in humans. Considering that PD, LBD and MSA are primarily age-related diseases, even relatively short extensions of disease onset times would translate to significant health benefits and an improved quality of life for the ageing population. The vaccine candidates designed and tested here were modelled after a few conformational epitopes present on only two structures of synthetic α-syn fibrils, and yet provided considerable protection from disease. We only used a limited selection of possible conformational epitopes from a larger conformational space to design the vaccine candidates tested here. It is conceivable that other conformational epitopes could confer better immunity and protection from disease. Also, the recent availability of *ex vivo* structures of α-syn fibrils isolated from patients with synucleinopathies should enable the design of disease-specific and, thus, more potent vaccine candidates.[14,15] There may be an overlap of conformational epitopes between these vaccines and those found in α-syn fibrils in patients with PD, DLB and MSA. This overlap may explain why antibodies from immunized mice recognize pathologic α-syn in patient brains and could also explain differences in the induced antibody response (Supplementary Figs 6 and 11).

Importantly, conformational epitope engineering is suitable for the development of vaccines against a broad spectrum of pathogenic protein structures and amyloids, such as amyloid beta and tau in Alzheimer's disease, islet amyloid polypeptide (IAPP) in type II diabetes and others causing protein misfolding diseases. Lastly, fibrillar vaccines are structurally stable at room temperature for long periods of time, facilitating their storage, transport and distribution.

Data availability

All data are available in the manuscript or the Supplementary material. The cryo-EM map has been deposited in the Electron Microscopy Data bank (EMDB) under the accession number EMD-17111 and the corresponding atomic model in the Protein Data Bank (PDB) under the accession number 8OQI. Additional data will be available from the corresponding authors upon reasonable request. Materials can be made available with a material transfer agreement.

Acknowledgements

We thank the staff of the animal facility at the Forschungszentrum Jülich for excellent animal care. Molecular graphics and analyses were performed using UCSF ChimeraX, developed by the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, with support from National Institutes of Health R01-GM129325 and the Office of Cyber Infrastructure and Computational Biology, National Institute of Allergy and Infectious

Diseases. B.F. and G.F.S. gratefully acknowledge the electron microscopy training, imaging and access time provided by the life science EM facility of the Ernst-Ruska Centre at the Forschungszentrum Jülich. B.F. and G.F.S. are grateful for the computational support and infrastructure provided by the Zentrum für Informations- und Medientechnologie (ZIM) at the Heinrich-Heine University Düsseldorf and for the computing time provided by the Forschungszentrum Jülich on the supercomputer JURECA-DC at the Jülich Supercomputing Centre (JSC).

Funding

This study was supported by The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research (MJFF-009841) and the Weston Brain Institute (RR191051). J.M.F.-F. acknowledges a postdoctoral fellowship from the Parkinson Association of Alberta. We gratefully acknowledge support by the Alberta Ministry of Technology and Innovation through SPP-ARC (Striving for Pandemic Preparedness - The Alberta Research Consortium) (to H.W.).

Competing interests

J.M.F.-F. and H.W. filed an international patent application with the title 'Innocuous, structured scaffolds for structure-based amyloid disease vaccines and antigens' that covers, in part, the inventions that were described in this publication. No other competing interests exist. B.F. is now an AstraZeneca employee.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

References

1. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388:839-840.
2. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, Goedert M. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett*. 1998;251:205-208.
3. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M. Goedert M. Alpha-synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:6469-6473.
4. Peng C, Trojanowski JQ, Lee VM. Protein transmission in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2020;16:199-212.
5. Luk KC, Kehm V, Carroll J, et al. Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science*. 2012;338:949-953.
6. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24:197-211.
7. Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett*. 2006;396:67-72.
8. Kim S, Kwon SH, Kam TI, et al. Transneuronal propagation of pathologic alpha-synuclein from the gut to the brain models Parkinson's disease. *Neuron*. 2019;103:627-641.
9. Arotcarena ML, Dovero S, Prigent A, et al. Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of synucleinopathy in non-human primates. *Brain*. 2020;143:1462-1475.
10. Lohmann S, Bernis ME, Tachu BJ, Ziemski A, Grigoletto J, Tamgüney G. Oral and intravenous transmission of alpha-synuclein fibrils to mice. *Acta Neuropathol*. 2019;138:515-533.
11. Van Den Berge N, Ferreira N, Gram H, et al. Evidence for bidirectional and trans-synaptic parasympathetic and sympathetic propagation of alpha-synuclein in rats. *Acta Neuropathol*. 2019;138:535-550.
12. Tuttle MD, Comellas G, Nieuwkoop AJ, et al. Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human alpha-synuclein. *Nat Struct Mol Biol*. 2016;23:409-415.
13. Guerrero-Ferreira R, Taylor NMI, Mona D, et al. Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils. *Elife*. 2018;7:e36402.
14. Schweighauser M, Shi Y, Tarutani A, et al. Structures of alpha-synuclein filaments from multiple system atrophy. *Nature*. 2020;585:464-469.
15. Yang Y, Shi Y, Schweighauser M, et al. Structures of alpha-synuclein filaments from human brains with Lewy pathology. *Nature*. 2022;610:791-795.
16. Coustou V, Deleu C, Saupe S, Begueret J. The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus podospora anserina behaves as a prion analog. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:9773-9778.
17. Balguerie A, Dos Reis S, Ritter C, et al. Domain organization and structure-function relationship of the HET-s prion protein of podospora anserina. *EMBO J*. 2003;22:2071-2081.
18. Wasmer C, Lange A, Van Melckebeke H, Siemer AB, Riek R, Meier BH. Amyloid fibrils of the HET-s(218–289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science*. 2008;319:1523-1526.
19. Ritter C, Maddelein ML, Siemer AB, et al. Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion. *Nature*. 2005;435:844-848.
20. Bernis ME, Babila JT, Breid S, Wüsten KA, Wüllner U, Tamgüney G. Prion-like propagation of human brain-derived alpha-synuclein in transgenic mice expressing human wild-type alpha-synuclein. *Acta Neuropathol Commun*. 2015;3:75.
21. Woerman AL, Stohr J, Aoyagi A, et al. Propagation of prions causing synucleinopathies in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:E4949-E4958.
22. Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron*. 2002;34:521-533.
23. Breid S, Bernis ME, Babila JT, Garza MC, Wille H, Tamgüney G. Neuroinvasion of alpha-synuclein prionoids after intraperitoneal and intraglossal inoculation. *J Virol*. 2016;90:9182-9193.
24. Berg D, Borghammer P, Fereshtehnejad SM, et al. Prodromal Parkinson disease subtypes - key to understanding heterogeneity. *Nat Rev Neurol*. 2021;17:349-361.
25. Mandler M, Valera E, Rockenstein E, et al. Next-generation active immunization approach for synucleinopathies: Implications for Parkinson's disease clinical trials. *Acta Neuropathol*. 2014;127:861-879.
26. Mandler M, Rockenstein E, Overk C, et al. Effects of single and combined immunotherapy approach targeting amyloid beta protein and alpha-synuclein in a dementia with Lewy bodies-like model. *Alzheimers Dement*. 2019;15:1133-1148.
27. Volc D, Poewe W, Kutzelnigg A, et al. Safety and immunogenicity of the alpha-synuclein active immunotherapeutic

PD01A in patients with Parkinson's disease: A randomised, single-blinded, phase 1 trial. *Lancet Neurol*. 2020;19:591-600.
28. Poewe W, Volc D, Seppi K, et al. Safety and tolerability of active immunotherapy targeting alpha-synuclein with PD03A in patients with early Parkinson's disease: A randomized, placebo-controlled, phase 1 study. *J Parkinsons Dis*. 2021;11:1079-1089.
29. Nimmo JT, Smith H, Wang CY, et al. Immunisation with UB-312 in the Thy1SNCA mouse prevents motor performance deficits and oligomeric alpha-synuclein accumulation in the brain and gut. *Acta Neuropathol*. 2022;143:55-73.
30. Yu HJ, Thijssen E, van Brummelen E, et al. A randomized first-in-human study with UB-312, a UBITh(R) alpha-synuclein peptide vaccine. *Mov Disord*. 2022;37:1416-1424.

2.8 Krankheitsmodifizierende PD-Immunisierung durch monovalente HET-s-basierte Vakzination

Titel	Vaccines mimicking conformational epitopes on α-synuclein fibrils provide immunity to Parkinson's disease
Autoren	Liang Ma, Sara Reithofer, Verena Pesch, José Miguel Flores-Fernandez, Aishwarya Sriraman, Caleb Duckering, Sara Amidian, **Pelin Özdüzenciler**, Laura Müller, Holger Wille, Gültekin Tamgüney
Journal	**Brain (2026)**
DOI	10.1093/brain/awag010
Beitrag	**Eigener Anteil** ▪ Herstellung und Aufreinigung des α-Syn-Proteins ▪ Diskussion der Ergebnisse ▪ Beteiligung beim Korrigieren des Manuskripts
Ergänzende Informationen	Ma et al. Supplementary Material
Druckgenehmigung	**s. Anhang 5.11**

https://doi.org/10.1093/brain/awag010 BRAIN 2026: 00; 1–13 | 1

BRAIN
ORIGINAL ARTICLE

Vaccines mimicking conformational epitopes on α-synuclein fibrils provide immunity to Parkinson's disease

Liang Ma,[1,2,†] Sara Reithofer,[1,2,†] Verena Pesch,[1,2,†] José Miguel Flores-Fernandez,[3,‡] Aishwarya Sriraman,[3] Caleb Duckering,[3] Sara Amidian,[3] Pelin Özdüzenciler,[1,2] Laura Müller,[1,2] Holger Wille[3,4] and Gültekin Tamgüney[1,2]

[†]These authors contributed equally to this work.
[‡]Deceased.

The progressive age-related aggregation of soluble α-synuclein into toxic oligomers and insoluble amyloid fibrils causes Parkinson's disease, Lewy body dementia and multiple system atrophy, all of which are neurodegenerative diseases without a cure. Because α-synuclein is a self-antigen, pathogenic α-synuclein aggregates do not elicit a strong immune response. Recent advances in structural biology elucidating the structure of α-synuclein fibrils have allowed us to design engineered protein fibrils that model conformational epitopes present on the surface of α-synuclein fibrils.

HET-s is a soluble fungal protein capable of forming amyloid fibrils. We used HET-s(218-298) fibrils and four modified derivatives, each displaying a selected conformational epitope present on the surface of α-synuclein fibrils, to vaccinate TgM83$^{+/-}$ mice, a model for Parkinson's disease-like synucleinopathies.

Fibrillar vaccine candidates significantly extended the survival of immunized TgM83$^{+/-}$ mice by ≤38% after intraperitoneal challenge and ≤42% after intragastric challenge with α-synuclein fibrils. Fully immunized mice developed antibodies that recognized α-synuclein fibrils and brain homogenates from patients with dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy and Parkinson's disease.

Fibrillar vaccine candidates that mimic conformational epitopes on the surface of pathological α-synuclein fibrils have the ability to induce immunity and protection against Parkinson's disease and other synucleinopathies.

1 Institut für Physikalische Biologie, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf 40225, Germany
2 Institut für Biologische Informationsprozesse, Strukturbiochemie (IBI-7), Forschungszentrum Jülich, Jülich 52425, Germany
3 Department of Biochemistry & Centre for Prions and Protein Folding Diseases, University of Alberta, Edmonton, AB T6G 2M8, Canada
4 Neuroscience and Mental Health Institute, University of Alberta, Edmonton, AB T6G 2M8, Canada

Correspondence to: Gültekin Tamgüney
Institut für Biologische Informationsprozesse—Strukturbiochemie (IBI-7)
Forschungszentrum Jülich, Wilhelm-Johnen-Straße, Jülich 52425, Germany
E-mail: e.tamgueney@fz-juelich.de

Keywords: α-synuclein; amyloid; conformation; disease; fibril; immunization; vaccine

Received July 16, 2025. Revised November 24, 2025. Accepted December 09, 2025. Advance access publication January 9, 2026
© The Author(s) 2026. Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Parkinson's disease (PD), Lewy body dementia (LBD) and multiple system atrophy (MSA) are incurable synucleinopathies that are caused by the misfolding and aggregation of soluble α-synuclein (α-syn) protein into oligomers and insoluble amyloid fibrils that are toxic to neurons and cause progressive neurodegeneration with characteristic motor impairment and additional non-motor symptoms.[1-3]

Pathological accumulations of α-syn have prion-like properties in that they have the ability to propagate from afflicted to unaffected, healthy neurons, thereby seeding *de novo* aggregation of α-syn by recruiting its monomers into oligomers and growing fibrils. Subsequently, these growing fibrils undergo fragmentation, yielding smaller seed species that perpetuate this deleterious cycle. The transmission of pathological α-syn aggregates between neurons has been shown to occur via trans-synaptic routes, possibly mediated by various mechanisms, such as vesicular trafficking, receptor-mediated endocytosis, tunnelling nanotubes and simple diffusion.[4] Investigations in both human subjects and animal models provide empirical support for the dissemination of α-syn pathology over large anatomical distances within the nervous system over time.[5,6] The rostrocaudal spread of α-syn pathology within the CNS in PD is described by the Braak staging system.[6] In addition, accumulating evidence underscores the ability of α-syn pathology to propagate from the enteric nervous system, which innervates the gastrointestinal tract, to the CNS, either via peripheral nerves or through the bloodstream.[7-11]

Until recently, synucleinopathies could be distinguished clinically based on their neurological presentation and, more precisely, neuropathologically, based on the cell types involved, which are neuronal in PD and LBD and mostly oligodendrocytic in MSA.[1,2,12,13] Advances in the structural analysis of synthetic and pathological α-syn fibrils isolated from patient brains now show that differences in these diseases are encoded at the molecular level, with specific conformations of α-syn fibrils causing specific synucleinopathies.[14-17] In PD and LBD, α-syn forms a single protofilament fibril with a Lewy-type fold, whereas in MSA, α-syn forms asymmetrically paired filaments with an MSA type I or II fold. These pathological α-syn fibrils, which are at the root of synucleinopathies, are a promising target for therapeutic intervention that could provide a cure or protection against these diseases.

Previously, we showed that an engineered quadrivalent vaccine mimicking α-syn fibrils induces an immune response against pathological α-syn fibrils by molecular grafting of conformational epitopes present on the surface of α-syn fibrils onto the inert carrier molecule HET-s(218–289) (PDB IDs: 2RNM), the prion domain of the HET-s protein found in the filamentous fungus *Podospora anserina*.[18] Residues 218–289 in the C-terminus of HET-s are unstructured in solution and the non-prion state and can form biologically functional amyloid fibrils when the prion state is adopted.[19] HET-s(218–289) fibrils are assemblies of four β-strands forming two coils of a left-handed β-solenoid.[20,21] Based on the known structure of two synthetic α-syn fibrils (PDB IDs: 2N0A and 6H6B), we mutated selected amino acid residues in HET-s(218–289) to design four vaccine candidates α-SC3, α-SC6, α-SC8 and α-SC9 (Fig. 1), all of which form amyloid fibrils.[14,15,22] Importantly, these vaccines were safe, because none of them seeded α-syn aggregation in seed amplification assays or in α-synA53T-YFP biosensor cells.[23] We have shown in mouse models of PD that vaccination with a quadrivalent vaccine that combined α-SC3, α-SC6, α-SC8 and α-SC9 induced antibodies that recognize α-syn fibrils and protected against PD-like symptoms, resulting in improved motor performance and prolonged survival. Specifically, immunization with this quadrivalent vaccine resulted in a modest 8% increase in survival in a mouse model of brain-first PD after intracerebral challenge with α-syn fibrils, and a significant 21% and 22% increase in survival in two mouse models of body-first PD after intraperitoneal or intragastric challenge with α-syn fibrils, respectively.[23]

Here, we investigated the effect of each of the four vaccine candidates and HET-s fibrils individually on survival in two mouse models of body-first PD. We quadrupled the vaccine dose and demonstrated that each of the four vaccine candidates and HET-s fibrils, individually protected against weight loss and motor impairment and significantly prolonged survival by ≤42%.

Materials and methods

Animals

B6;C3-Tg(*Prnp*-SNCA*A53T)83Vle/J mice (TgM83$^{+/-}$ mice) hemizygous for a transgene encoding human α-syn with the familial A53T mutation were acquired from The Jackson Laboratory and crossed with wild-type C57BL/6J mice to obtain hemizygous offspring. Animals were genotyped by real-time PCR. Group sizes were determined *a priori* to allow for the detection of significant differences in motor function and survival. No animals were excluded during the experiment. Animals were housed in the same location and randomly assigned to treatment groups based on birth and availability. The authors L.M., V.P., S.R. and G.T. were aware of the group assignments at all times. All studies involving animals were approved by the animal protection committee of the North Rhine-Westphalia State Environment Agency (LANUV). All applicable national and institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Preparation of HET-s-based fibrils

DNA encoding HET-s, α-SC3, α-SC6, α-SC8 and α-SC9 had been subcloned into the pET-21a vector (Novagen) for expression in *Escherichia coli* BL21(DE3).[23] Starter cultures were grown in 25 ml of 2YT medium at 37°C and 250 rpm overnight and were used to inoculate 500 ml of 2YT medium with 100 µg/ml ampicillin, which was grown to an optical density of 0.8 at 600 nm. The culture was cooled down to 25°C, induced with 1 mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), and grown overnight at 37°C and 250 rpm. Cells were harvested at 6500*g* and 4°C for 25 min, and frozen for ≥30 min. Pellets were resuspended in 20 ml IB buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0) with 0.5% Triton X-100, 1 mg/ml lysozyme (Sigma-Aldrich), and 1× complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche). After incubation at room temperature for 30 min, the lysed cells were sonicated (Sonifier 250; Branson Ultrasonics) for five cycles (1 min on and 1 min off) at an output voltage of 50 V with a 50% duty cycle at 4°C. Subsequently, 3 U/ml benzonase (Merck) was added for each 1 ml of the original culture, and the homogenates were incubated for 20 min, then centrifuged at 15 557*g* and 4°C for 30 min. The supernatants were discarded, and pellets containing the expressed proteins as inclusion bodies were frozen for ≥30 min. The pellets were resuspended in IB buffer containing 0.5% Triton X-100, 1 mg/ml lysozyme and 1× complete EDTA-free protease inhibitor cocktail, and were then incubated for 20 min at room temperature. After another sonication and centrifugation step as described above, the process was repeated twice and the homogenates centrifuged at 15 557*g*, 4°C for 30 min. Finally,

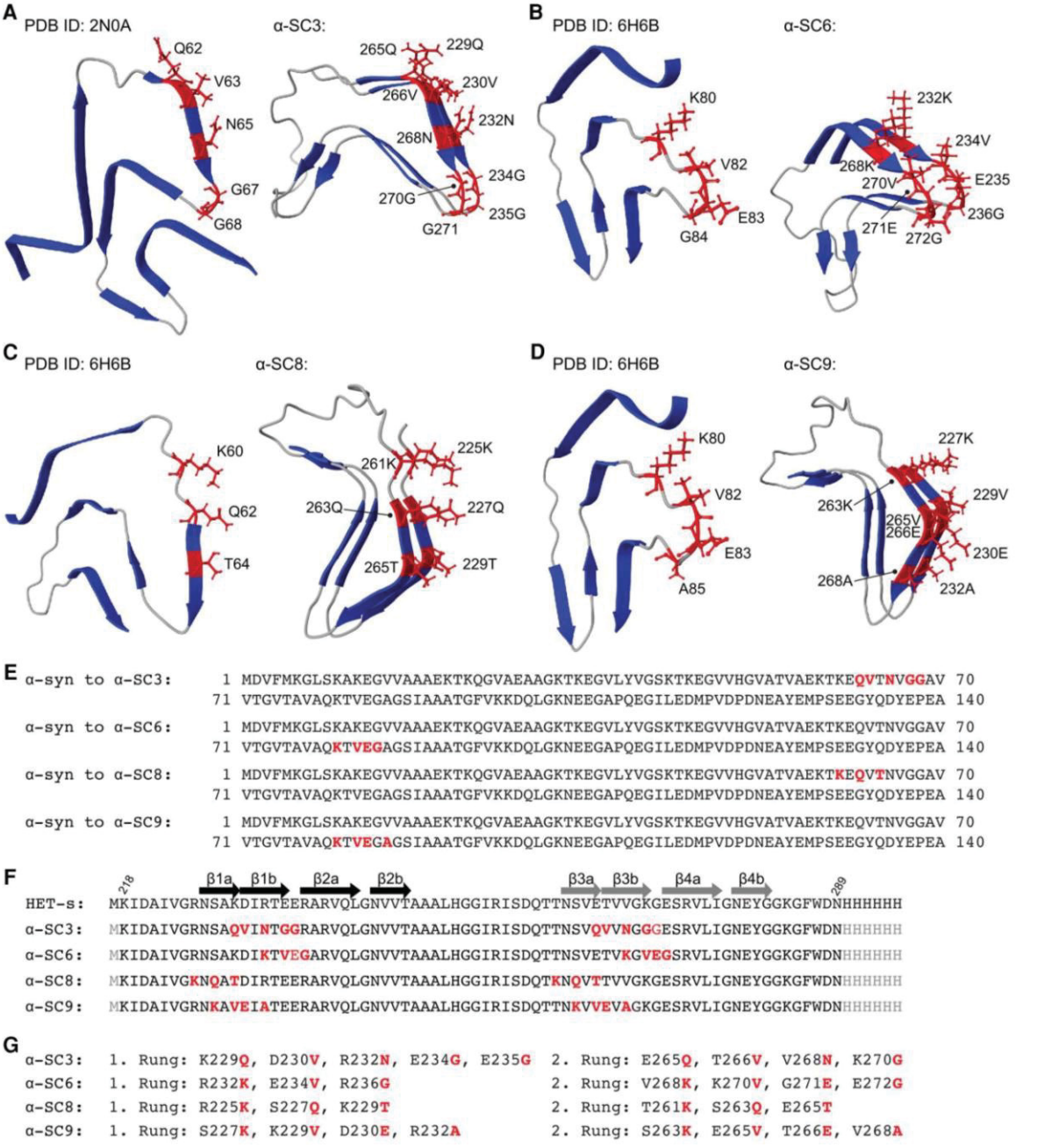


Figure 1 HET-s-based vaccine candidates with conformational epitopes that mimic the surface of α-syn fibrils. (**A**–**D**) Based on the structure of two synthetic α-syn fibrils, Protein Data Bank Identification codes (PDB IDs) 2N0A (**A**) and 6H6B (**B**–**D**), we identified selected amino acid residues (red) that form conformational epitopes on the surface of these fibrils.[14,15] We mutated HET-s(218–289), PDB ID 2RNM, to express the selected amino acid residues (red) in a structurally similar context, yielding four different vaccine candidates: α-SC3, α-SC6, α-SC8 and α-SC9.[20] (**E**) Primary structure of α-syn with selected amino acid residues (red) that form distinct conformational epitopes in α-syn fibrils introduced into HET-s(218–289) to yield vaccine candidates α-SC3, α-SC6, α-SC8 and α-SC9. (**F**) Primary structure of HET-s(218–289) and its derived vaccine candidates α-SC3, α-SC6, α-SC8 and α-SC9 showing amino acid residues (red) mimicking continuous surface epitopes in α-syn fibrils. In fibrillar HET-s(218–289), eight β strands form two coils in a left-handed β solenoid, with each coil having four β strands. (**G**) Mutations introduced into HET-s(218–289) to yield vaccine candidates α-SC3, α-SC6, α-SC8 and α-SC9.

the pellets containing purified inclusion bodies were resuspended in IB buffer and stored at −20°C. Inclusion bodies of recombinant proteins were solubilized in 6 M guanidine hydrochloride, 20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl at pH 8.0, and stirred at room temperature for 45 min. The homogenates were clarified by ultracentrifugation at 235 000*g* for 35 min at 4°C. Recombinant proteins were

purified in denaturing conditions by affinity chromatography using a BioLogic DuoFlow chromatography system (Bio-Rad Laboratories). HisTrap HP columns (GE Healthcare Life Sciences) were equilibrated with equilibrium buffer (8 M urea, 20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl and 10 mM imidazole, pH 8.0) until the absorbance at 280 nm was stable. The columns were loaded with the clarified lysates, then washed with equilibrium buffer until the absorbance at 280 nm was stable again. Bound proteins were eluted using a linear gradient from 10 to 500 mM imidazole in equilibrium buffer. Peaks containing recombinant protein were automatically collected with a BioFrac fraction collector (Bio-Rad Laboratories) when the absorbance at 280 nm was >0.05. Subsequently, the buffer was exchanged to 175 mM acetic acid at pH 2.8 using HiTrap desalting columns (GE Healthcare Life Sciences). The purified, desalted and denatured proteins were fibrillized by increasing the pH to 7.5 with 3 M Tris base (pH 13.0) and stirring at 600 rpm at room temperature for 5 days. Prior to immunization, vaccine candidates were sonicated on ice using a Sonoplus Mini20 (Bandelin) ultrasonic homogenizer equipped with an MS 1.5 microtip. Samples were subjected to a single 12 s pulse at 50% amplitude to increase the uniformity of the inoculum.

Vaccinations and plasma collection

Adult mice (n = 10–12 per group) at an age of 6–8 weeks were anaesthetized with 2%–3% isoflurane and injected intraperitoneally with 200 µl of 100 µg antigen, composed of either HET-s, α-SC3, α-SC6, α-SC8 or α-SC9 fibrils, diluted 1:1 in alum (Alhydrogel adjuvant 2%, InvivoGen) using a 26-gauge needle. Each animal was given four vaccine injections, each spaced 2 weeks apart. Blood samples of 50 µl were obtained from the tail vein of each mouse immediately before each injection and 2 weeks after the final injection. These samples were diluted 1:1 with 5% sodium citrate. The blood was then centrifuged at 500*g* for 10 min at 4°C, and the resulting plasma was collected and stored at −80°C.

Synthesis of α-syn monomers and fibrils

N-Terminally acetylated human wild-type α-synuclein was expressed in *E. coli* BL21(DE3) cells containing the pT7 vector for codon-optimized α-synuclein and the pNatB vector for the N-terminal acetyltransferase B complex from *Schizosaccharomyces pombe*. The bacteria were grown overnight in 120 ml of lysogeny broth (LB) medium with 100 µg/ml ampicillin and 34 µg/ml chloramphenicol at 37°C and 120 rpm. The next day, the optical density at 600 nm was measured, and the culture was diluted to an optical density of 0.1 in 1 l of LB medium. The culture was incubated with 100 µg/ml ampicillin and 34 µg/ml chloramphenicol at 37°C until the optical density reached 1.0–1.2. Expression was induced with 1 mM IPTG. After 4.5 h, the cells were pelleted at 5000*g* and 4°C. The pellets were resuspended in 20 mM Tris (pH 8.0) containing a protease inhibitor (Roche) and boiled for 2 × 15 min, followed by centrifugation at 20 000*g* and 4°C for 30 min. Ammonium sulfate precipitation was performed by adding 0.45 g/ml of $(NH_4)_2SO_4$ crystals to the supernatant over 5 min and stirring for 15 min. After centrifugation, the pellet was resuspended in 50 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 8.0). α-Syn was purified using a HiPrep QFF 16/10 anion exchange chromatography column with a linear gradient from 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) to 1 M NaCl in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) on an ÄKTA pure chromatography system (GE Healthcare). The ammonium sulfate precipitation was repeated, and the pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.2). Further purification was carried out using a HiLoad 16/60 Superdex 75 pg size exclusion column (Cytiva) over 1.5 column volumes. NaCl was added to achieve a final concentration of 50 mM Tris-HCl and 150 mM NaCl. The protein was concentrated to 5 mg/ml using a Vivaspin concentrator (Sartorius). The α-synuclein monomer was fibrillized by incubation at 37°C and 1000 rpm on a Thermomixer (Eppendorf) for 7 days. Fibrils were sonicated in four 15-s steps with 2 min pauses between each step using a Sonoplus Mini20 (Bandelin) and an MS 1.5 microtip.

Challenge of TgM83$^{+/-}$ mice with α-syn fibrils

For intraperitoneal challenge, 50 µg of sonicated α-syn fibrils in 20 µl PBS were injected into the peritoneum of TgM83$^{+/-}$ mice (n = 11–12 per group) anaesthetized with isoflurane, using a 30-gauge disposable hypodermic needle. For gut wall injections of α-syn fibrils in TgM83$^{+/-}$ mice (n = 10–12 per group), an aseptic laparotomy was performed. The mice received a subcutaneous injection of buprenorphine (0.05 mg/kg, Bayer) for analgesia, followed by anaesthesia with isoflurane. The abdomen was shaved, disinfected, and a small incision was made with a scalpel. α-Syn fibrils were injected into the wall of the pylorus and duodenum at four points, spaced 0.5 cm apart, using a 10 µl Hamilton syringe. Each site received an injection of 6.25 µg (2.5 µl) of α-syn fibrils. The abdominal wall was sutured, and the skin was closed with wound clips, which were removed 2 weeks later. After surgery, the animals received a single subcutaneous dose of carprofen (5 mg/kg) and were provided with a mix of metamizole (0.5 mg/ml, WDT) and 10% (w/v) sucrose in their drinking water for 3 days. The animals were monitored daily for general health and three times a week for signs of neurological disease, including reduced grooming, ataxia, tremor, bradykinesia, akinesia, lethargy, circling, tail rigidity, paraparesis, paralysis, kyphosis and other symptoms. Body weight was recorded weekly. For immunohistochemical analysis, diseased mice were euthanized with ketamine/xylazine and underwent transcardial perfusion with PBS followed by 4% formalin (Sigma) in PBS. The brains were dissected and stored in 4% formalin in PBS for later processing. For biochemical analysis, diseased mice were euthanized by cervical dislocation, and the brains were snap-frozen on dry ice and stored at −80°C for later processing. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 10.

Extraction of α-synuclein filaments

Sarkosyl-insoluble material was extracted from fresh-frozen caudate putamen of individuals with PD, DLB and MSA. Briefly, tissues were homogenized on ice in 20 volumes (v/w) of extraction buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.8 M NaCl, 10% sucrose and 1 mM EGTA. Homogenates were adjusted to 2% sarkosyl and incubated for 1 h at 37°C. Following centrifugation at 10 000*g* for 10 min at 4°C, the supernatants were centrifuged at 100 000*g* for 60 min at 4°C. Resulting pellets were resuspended in 1 ml/g extraction buffer and centrifuged at 5000*g* for 5 min at 4°C. Supernatants were then diluted 3-fold in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 0.15 M NaCl, 10% sucrose and 0.2% sarkosyl, and centrifuged at 100 000*g* for 30 min at 4°C. Final sarkosyl-insoluble pellets were resuspended in 100 µl/g of 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 50 mM NaCl.

Immunoprecipitations

Plasma samples of 50 µl were incubated with 16.7 µl magnetic Dynabeads Protein G (Invitrogen) for 1 h with rotation at room temperature. The conformation-specific anti-α-syn aggregate antibody

MJFR-14-6-4-2 (Abcam) served as a positive control, and 0.625 µg was incubated with 16.7 µl of magnetic beads in 50 µl of PBS and 0.02% Tween 20 for 1 h with rotation at room temperature. The beads were washed three times with 50 µl of PBS, resuspended in 49.5 µl of 1× lysis buffer, supplemented with 0.5 µl of extracted α-synuclein filaments, and incubated overnight with rotation at 4°C. After magnetic pull-down of the beads, cleared supernatants of the extracts were used for further analysis.

Time-resolved fluorescence resonance energy transfer

Quantification of α-syn filaments in sarkosyl extracts of brain homogenates before and after immunoprecipitations was performed using the HTRF α-synuclein aggregation detection kit (Revvity) for time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) measurements. Briefly, 10 µl samples of the cleared extracts were supplemented with 10 µl of a premixed antibody solution containing anti-h-α-Synuclein-d2 (acceptor) and anti-h-α-Synuclein-Tb-Cryptate (donor). Samples were transferred to an HTRF 96-well low-volume plate (Revvity), covered with a plate sealer, and incubated for 20 h at room temperature. Fluorescence emission was measured at 665 nm for FRET-dependent acceptor fluorescence and at 620 nm for FRET-independent donor fluorescence using a CLARIOstar microplate reader (BMG Labtech). The ratio of both fluorescence emission values, multiplied by 10 000, is directly proportional to the amount of human α-synuclein oligomers and aggregates in each sample. The ΔF (%) value, a measure of the signal-to-background ratio, was calculated by dividing the difference between the ratio of the sample and the ratio of the negative control by the ratio of the negative control, then multiplying the result by 100. GraphPad Prism version 10 was used for statistical analysis.

ELISA

In brief, 96-well high-binding ELISA plates (Corning) were coated overnight at 4°C with 100 µl per well of a 5 µg/ml solution of sonicated fibrils, with gentle agitation. The plates were then washed twice with PBS containing 0.1% Tween 20 (PBST) and once with PBS. They were blocked with 200 µl per well of a blocking buffer [5% (w/v) milk powder in PBS] and washed again five times with PBST and once with PBS. Next, 100 µl of serum was added to each well, and the plates were incubated overnight at 4°C. To detect the vaccine candidates or HET-s fibrils, plasma from one mouse collected at five different time points was tested at a 1:330 000 dilution in PBS. To detect α-syn fibrils, both preimmune and immune plasma samples were diluted 1:1000 in PBS. After five washes with PBST and one with PBS, the plates were incubated for 2 h at room temperature with 100 µl per well of an anti-mouse horseradish peroxidase-linked secondary antibody (Invitrogen) at a 1:5000 dilution. Following five washes with PBST and one with PBS, 100 µl per well of TMB substrate solution (Pierce TMB Substrate Kit, Thermo Fisher Scientific) was added. The colour reaction was stopped after 50 min with 2 M sulfuric acid, and the absorbance was measured at 450 nm using a CLARIOstar microplate reader (BMG Labtech).

Competitive ELISA

A competitive ELISA protocol was used to assess the recognition of α-syn aggregates in patient brain homogenates by the plasma of fully immunized mice. A 96-well high-binding ELISA plate (Corning) was coated overnight at 4°C with 100 µl per well of a 5 µg/ml solution of sonicated HET-s-derived fibrils, with gentle agitation. The plate was then blocked with 3% bovine serum albumin in PBS for 90 min and washed twice with PBST and once with PBS. Separately, on a 96-well low-binding cell culture plate, 75 µl per well of a 1:330 000 dilution of serum was mixed with 66.67 µg/ml of brain homogenate [DLB, MSA, PD, or non-neurological (healthy) control] and incubated overnight at 4°C. Next, 100 µl per well of the mixture was transferred to the fibril-coated and blocked ELISA plates and incubated overnight at 4°C. Afterwards, the plates were washed twice with PBST and once with PBS, followed by the addition of 100 µl per well of an anti-mouse horseradish peroxidase-linked secondary antibody at a 1:5000 dilution and incubation at room temperature for 2 h. The plates were then washed four times with PBST and once with PBS. Subsequently, 100 µl per well of TMB substrate solution was added. The colour reaction was stopped after 30 min with 2 M sulfuric acid, and absorbance was measured at 450 nm using a CLARIOstar microplate reader.

Grip strength analysis

Unvaccinated and vaccinated animals were tested at 3 and 7 months after challenge.[23] To measure grip strength, mice were allowed to grasp a grid attached to a grip strength meter (Ugo Basile) with all four paws. They were then gently pulled by the tail until they released the grid. Grip strength was measured three times, with 15 min breaks between each test. The average of the three trials was recorded as the performance of the animal for that day. Relative grip strength was calculated as the percentage of the mean performance at the later time point compared with the performance at the earlier time point. GraphPad Prism version 10 was used for statistical analysis. Outliers were identified and removed using the ROUT function with Q set to 2%.

Results

Vaccination prolongs survival in two body-first mouse models of Parkinson's disease

Hemizygous TgM83$^{+/-}$ mice expressing human α-syn with the familial A53T mutation develop PD-like neuropathology and disease when injected with synthetic or patient-derived α-syn fibrils. In contrast, unchallenged TgM83$^{+/-}$ mice remain free of neurological disease and neuropathology at least up to an age of 650 days.[10,23-26] To determine whether HET-s-derived vaccine candidates mimicking α-synuclein fibrils elicit immunity to PD and related synucleinopathies and delay the onset of neurological disease, we vaccinated separate groups of adult TgM83$^{+/-}$ mice via intraperitoneal injections. In a previous study, we had vaccinated animals with a quadrivalent mixture of α-SC3, α-SC6, α-SC8 and α-SC9 fibrils (Fig. 1).[23] In contrast to our previous study, here we vaccinated groups of animals with either unmodified HET-s fibrils or with only one of the four HET-s-derived fibrillar vaccine candidates, α-SC3, α-SC6, α-SC8 or α-SC9, to assess the level of protection conferred by each vaccine candidate individually (Fig. 1 and Supplementary Fig. 1). Furthermore, in contrast to our previous study, in which we used 25 µg doses of each vaccine, we used 100 µg doses here, representing a 4-fold increase in the dose administered.[23] The animals were vaccinated at 2-week intervals for a total of four times (Fig. 2A). Unvaccinated mice injected with α-syn fibrils from our previous study also served in this study as controls, because all experiments were initiated at approximately the same time.[23] To analyse the vaccine-induced antibody

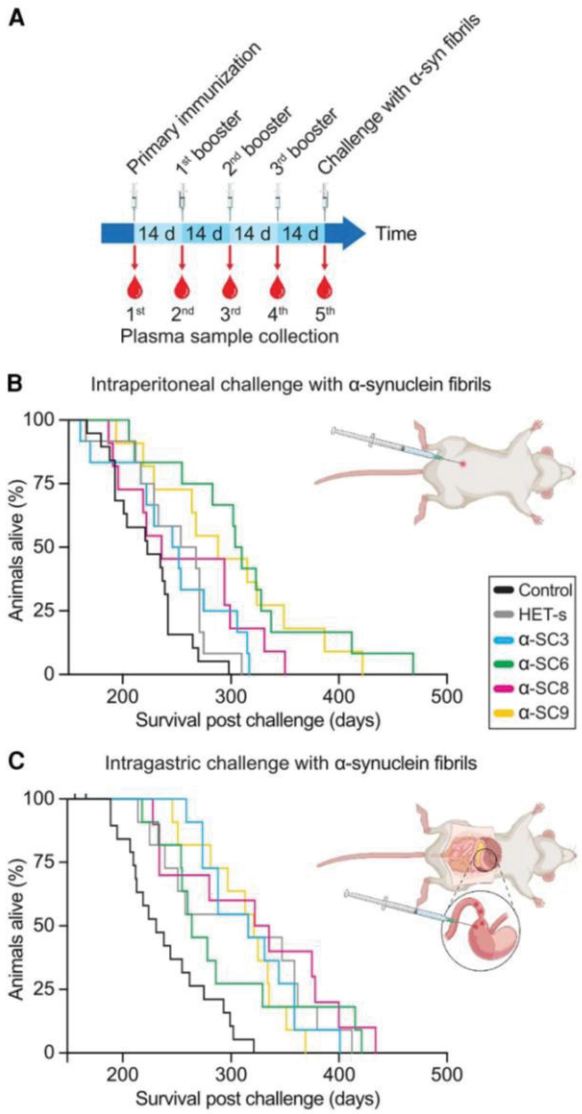


Figure 2 Vaccination prolongs survival of TgM83$^{+/-}$ mice after challenge with α-syn fibrils. (**A**) Groups of TgM83$^{+/-}$ mice were immunized intraperitoneally with either HET-s fibrils or one of its four engineered derivatives, α-SC3, α-SC6, α-SC8 or α-SC9 fibrils, every 2 weeks, with a total of four doses of 100 µg each. Blood plasma was collected once before and every 2 weeks after administration of each vaccine candidate. To model body-first PD, mice were injected with α-syn fibrils into the peritoneum (**B**) or the intestinal wall (**C**). (**B**) In intraperitoneally challenged mice, vaccination prolonged median survival from 223 days in non-immunized control mice to 261 days ($P < 0.05$) for HET-s fibrils, 249 days ($P < 0.05$) for α-SC3 fibrils, 307 days ($P < 0.001$) for α-SC6 fibrils, 236 days (n.s.) for α-SC8 fibrils and 288 days ($P < 0.01$) for α-SC9 fibrils in fully immunized mice. (**C**) In mice injected with α-syn fibrils into the intestinal wall, vaccination prolonged median survival from 231 days in unimmunized control mice to 316 days ($P < 0.01$) for HET-s fibrils, 316 days ($P < 0.001$) for α-SC3 fibrils, 264 days ($P < 0.05$) for α-SC6 fibrils, 328.5 days ($P < 0.01$) for α-SC8 fibrils and 321 days ($P < 0.001$) for α-SC9 fibrils in fully immunized mice. Survival was analysed using Kaplan–Meier curves and the log-rank (Mantel–Cox) test. Figure partially created in BioRender. Tamgüney, G. (2025) https://BioRender.com/qyi8gmt.

response of TgM83$^{+/-}$ mice, we collected plasma once before and every 2 weeks after each vaccine dose was administered (Fig. 2A).

Recent findings suggest that PD might originate in either the CNS (brain-first PD) or the enteric nervous system (body-first PD), followed by a prion-like spread of pathology either from the brain to the body or from the body to the brain, respectively, resulting in an end-stage pathology that is not well distinguishable between the two subtypes of PD.[27] In this study, we modelled body-first PD by challenging fully vaccinated TgM83$^{+/-}$ mice with injections of synthetic α-syn fibrils either into the peritoneum or into the wall of the stomach and pylorus, which seeds α-syn aggregation in the enteric nervous system first. Biologically, the two routes model distinct stages of peripheral disease: the intragastric route recapitulates the initial emergence of seeds within the enteric nervous system, whereas the intraperitoneal route reflects the dissemination of seeds from the enteric nervous system into the broader peripheral compartment. For intraperitoneally challenged mice, immunization with all vaccine candidates, with the exception of α-SC8 fibrils (236 days, $P = 0.063$), significantly prolonged survival in comparison to unvaccinated control mice with a median survival of 223 days (Fig. 2B and Table 1). Survival was most prolonged, by 38%, in mice immunized with α-SC6 fibrils (307 days, $P < 0.0001$). It is noteworthy that vaccination with unmodified HET-s fibrils (261 days, $P < 0.05$) also significantly protected mice from disease upon challenge, with a slightly more pronounced effect than that observed with α-SC3 fibrils (249 days, $P < 0.05$). We observed the most effective protection of vaccination in mice challenged with α-syn fibrils via the intragastric route (Fig. 2C and Table 1). In comparison to unvaccinated mice with a median survival of 231 days, vaccination with α-SC8 fibrils (328.5 days, $P < 0.01$) and α-SC9 fibrils (321 days, $P < 0.001$) prolonged survival by 42% and 39%, respectively. Furthermore, vaccination with α-SC3 fibrils (316 days, $P < 0.001$) and HET-s fibrils (316 days, $P < 0.01$) resulted in a 37% increase in survival.

Vaccination protects against weight loss and decline in motor performance

Weight loss and a decline in motor performance are early surrogate markers of neurological disease, which we monitored in TgM83$^{+/-}$ mice challenged with α-syn fibrils. After challenge with α-syn fibrils, TgM83$^{+/-}$ mice exhibited a period of continued weight gain before entering a phase of weight loss (Supplementary Fig. 2), followed by the development of neurological disease. In both body-first models of PD, immunization with any of the four HET-s-derived vaccine candidates and with HET-s fibrils protected immunized mice from early weight loss (Fig. 3A and B). All TgM83$^{+/-}$ mice that were injected with α-syn fibrils into the peritoneum or intestinal wall exhibited continued weight gain at 2 months post-challenge. We selected 5, 7 and 9 months post-challenge to visualize that immunization with all vaccine candidates and HET-s fibrils protected against early weight loss. In mice challenged intraperitoneally, α-SC6 and α-SC9 fibrils demonstrated the most efficacious protection (Fig. 3A). In mice injected with α-syn fibrils into the intestinal wall, all vaccine candidates, including HET-s fibrils, conferred comparable protection against weight loss, with α-SC9 fibrils being more protective at 9 months post-challenge (Fig. 3B).

As an indicator of motor performance, we measured the grip strength of immunized and non-immunized TgM83$^{+/-}$ mice at 3 and 7 months after challenge with α-syn fibrils and calculated the

Table 1 Survival data

Route of challenge	Unvaccinated control[23]	Quadrivalent vaccine[23]	HET-s	α-SC3	α-SC6	α-SC8	α-SC9
Intraperitoneal							
Censored animals (*n*)	0	0	0	0	0	0	0
Animals (*n*)	19	11	12	12	12	11	11
Median survival (days)	223	271	261	249	307	236	288
Survival extension (%)	N.A.	22	17	12	38	6	29
P (log-rank)	N.A.	<0.01	<0.05	<0.05	<0.0001	n.s.	<0.01
Intragastric							
Censored animals (*n*)	1	0	1	0	1	0	0
Animals (*n*)	19	10	11	11	11	10	11
Median survival (days)	231	279.5	316	316	264	328.5	321
Survival extension (%)	N.A.	21	37	37	14	42	39
P (log-rank)	N.A.	<0.05	<0.01	<0.001	<0.05	<0.01	<0.001

N.A. = not applicable; n.s. = not significant.

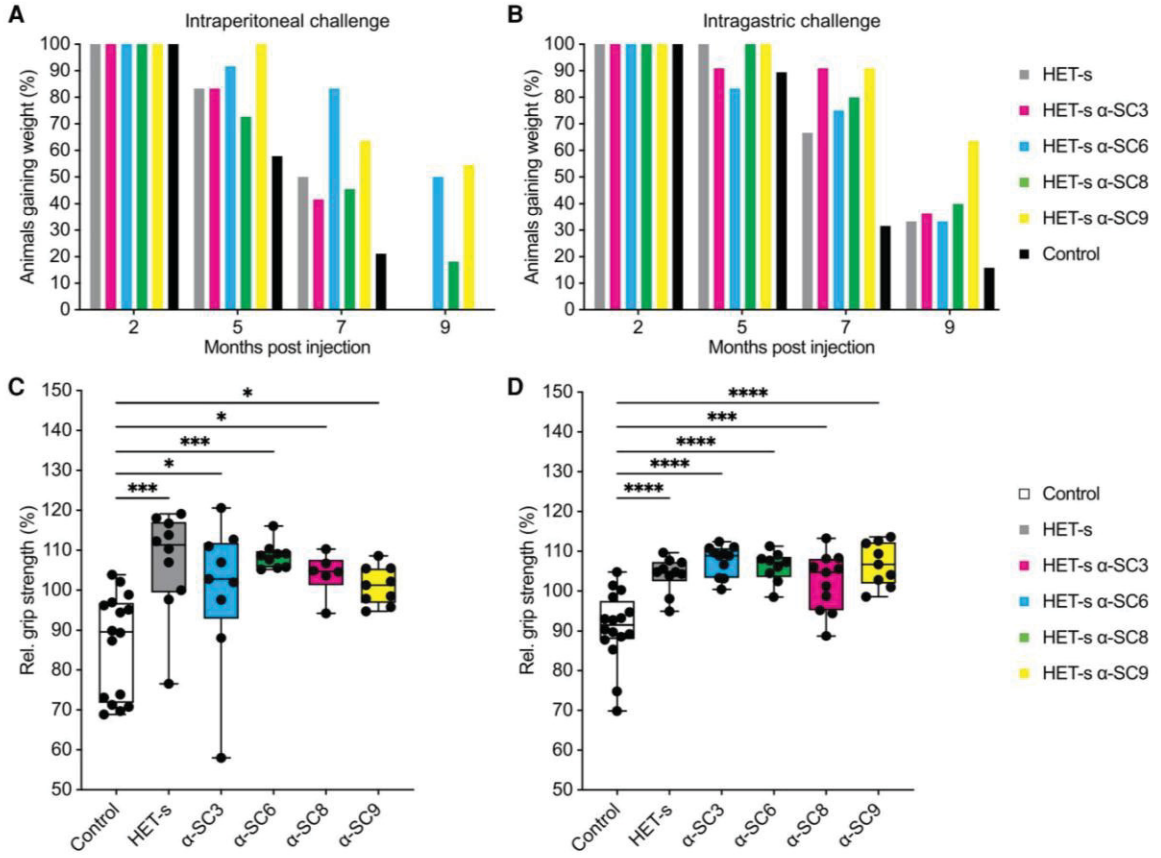


Figure 3 Vaccination protects TgM83$^{+/-}$ mice challenged with α-syn fibrils against early weight loss and motor deficits. (**A** and **B**) All TgM83$^{+/-}$ mice challenged with α-syn fibrils initially gained weight before they began to lose weight and develop neurological disease. The percentage of animals that gained weight at 2, 5, 7 and 9 months following intraperitoneal challenge (**A**) and following intragastric challenge (**B**) is shown. In both models of body-first PD, animals immunized with HET-s (grey), α-SC3 (magenta), α-SC6 (blue), α-SC8 (green) or α-SC9 (yellow) fibrils gained weight for longer periods of time than non-immunized controls (black). (**C** and **D**) Grip strength of immunized and non-immunized TgM83$^{+/-}$ mice was assessed at 3 and 7 months following challenge with α-syn fibrils, as an indicator of motor performance. In animals injected intraperitoneally (**C**) or into the gut wall (**D**) with α-syn fibrils, the relative grip strength of animals immunized with HET-s (grey), α-SC3 (magenta), α-SC6 (blue), α-SC8 (green) or α-SC9 (yellow) fibrils was significantly higher than that of non-immunized control animals (white). Significance was assessed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. Boxes represent 25th to 75th percentiles. Lines in the centre of the boxes indicate the median. Whiskers indicate minimum and maximum values. *$P < 0.05$, ***$P < 0.001$ and ****$P < 0.0001$.

Table 2 Grip strength data

Route of challenge	Vaccine candidate	Mean relative grip strength (%)	*P*-value
Intraperitoneal	N.A.	86	N.A.
	HET-s fibrils	107	<0.001
	α-SC3 fibrils	100	<0.05
	α-SC6 fibrils	109	<0.001
	α-SC8 fibrils	104	<0.05
	α-SC9 fibrils	101	<0.05
Intragastric	N.A.	91	N.A.
	HET-s fibrils	104	<0.0001
	α-SC3 fibrils	108	<0.0001
	α-SC6 fibrils	106	<0.0001
	α-SC8 fibrils	102	<0.001
	α-SC9 fibrils	107	<0.0001

N.A. = not applicable.

relative grip strength (Fig. 3C and D and Table 2). In animals injected intraperitoneally with α-syn fibrils, all immunized animals exhibited a significantly higher relative grip strength (100%–109%) than non-immunized animals (86%). Likewise, in animals injected with α-syn fibrils into the intestinal wall, the relative grip strength of immunized animals (102%–108%) was also significantly greater than that of non-immunized animals (91%). In conclusion, following challenge with α-syn fibrils, immunized animals demonstrated a sustained increase in grip strength throughout the disease process, indicating a vaccine-induced protection and improvement in motor function.

Vaccination reduces the rate of degeneration in the CNS

We confirmed the presence of neurological disease in the brainstem of diseased mice by immunohistochemistry with an antibody to α-syn phosphorylated at serine 129 (Supplementary Fig. 3), which demonstrated the presence of deposits of pathological α-syn in neurons. We observed by immunofluorescence staining for α-syn phosphorylated at serine 129 and for ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1) that neurons harbouring large deposits of pathological α-syn in the brainstem were surrounded by activated microglia (Supplementary Fig. 4A). Likewise, we detected by immunofluorescence staining for α-syn phosphorylated at serine 129 and for glial fibrillary acidic protein (GFAP) the recruitment of numerous astrocytes to the vicinity of neurons with α-syn deposits (Supplementary Fig. 4B). The findings demonstrate that the aggregation of α-syn in neurons of diseased mice had resulted in a neuroinflammatory response, as indicated by microgliosis and astrogliosis in brain areas with neuronal α-syn aggregation and deposition. Furthermore, we confirmed the presence of pathological α-syn aggregates in brain homogenates of diseased mice also by biochemical analysis (Supplementary Fig. 5). To quantify the differences in the amount of accrued neuropathology in the brains of vaccinated and unvaccinated mice, we measured α-syn aggregates in brain homogenates of sick mice by TR-FRET (Supplementary Fig. 6). The amount of brain-associated α-syn aggregates in sick mice was not significantly different regardless of their immunization status, whether vaccinated or not, or the route of challenge, intraperitoneal (Supplementary Fig. 6A) or intragastric (Supplementary Fig. 6B). In conclusion, administration of α-syn fibrils via injections into the peritoneum or the wall of the gastrointestinal tract seeded a progressive synucleinopathy in all challenged mice, regardless of their immune status. Within each group, all mice exhibited signs of neurological disease when comparable amounts of α-syn aggregates were present in the brain. This suggests that vaccination protected mice and enabled their longer survival by slowing down the accumulation of detrimental amounts of α-syn aggregates in the brain.

Vaccination induces a robust immune response to the vaccine candidates

We analysed plasma samples collected from non-immunized and immunized mice via an ELISA and demonstrated that the primary vaccination and three subsequent booster vaccinations had induced a progressive increase in the antibody titres recognizing the HET-s, α-SC3, α-SC6, α-SC8 and α-SC9 fibrils that were used for immunization (Fig. 4A). The four vaccine candidates exhibited varying degrees of immunogenicity, as did the unmodified HET-s fibrils, resulting in a 3-fold difference in the magnitude of the induced antibody titres (α-SC9 > α-SC3 = HET-s > α-SC6 > α-SC8). The α-SC9 fibrils induced relatively high antibody titres following the first booster, whereas HET-s fibrils induced a strong response only following the final booster.

Vaccination induces the production of antibodies that recognize pathological α-synuclein

To ascertain whether immunization had induced antibodies to synthetic α-syn fibrils, we used ELISA to measure the presence of antibodies in plasma samples from mice that had been immunized and those that had not (Fig. 4B). We observed that each of the four HET-s-derived vaccine candidates, in addition to HET-s fibrils, induced antibodies that recognized synthetic α-syn fibrils. The immune responses induced by HET-s, α-SC6, α-SC8 and α-SC9 fibrils were comparable to each other. Nevertheless, antibodies induced by α-SC3 fibrils demonstrated a slight superiority in recognizing synthetic α-syn fibrils when compared with those induced by α-SC6 ($P < 0.01$), α-SC8 ($P < 0.01$) and α-SC9 fibrils ($P < 0.001$).

Vaccination induces antibodies that recognize pathological α-synuclein in patient brain homogenates

In a competitive ELISA (Supplementary Fig. 7), we tested antibodies in plasma from mice immunized with HET-s (Fig. 4C), α-SC3 (Fig. 4D), α-SC6 (Fig. 4E), α-SC8 (Fig. 4F) and α-SC9 fibrils (Fig. 4G) for their ability to recognize pathological α-syn in brain homogenates from patients with DLB ($n = 3$), MSA ($n = 3$) or PD ($n = 3$) when tested against five brain homogenates from non-neurological (healthy) controls (Supplementary Table 1). It is noteworthy that HET-s and α-SC3 fibrils did not appear to induce antibodies against α-syn aggregates present in the brains of patients with DLB. The α-SC3 fibrils induced a mild ($\Delta OD_{450\,nm} = 2$) to intermediate ($\Delta OD_{450\,nm} = 4$) antibody response, and the HET-s fibrils induced only a mild response to α-syn aggregates in the brains of patients with MSA and PD. The α-SC6 and α-SC9 fibrils induced a robust ($\Delta OD_{450\,nm} \geq 4$) immune response to α-syn aggregates in the brains of patients with PD, a mild to intermediate response to α-syn aggregates in the brains of patients with MSA, and a mild response to those in the brains of patients with DLB. The α-SC8 fibrils exhibited a mild to intermediate response to α-syn aggregates in the brains of patients with MSA, and a mild response to α-syn aggregates in the brains of patients with DLB and PD.

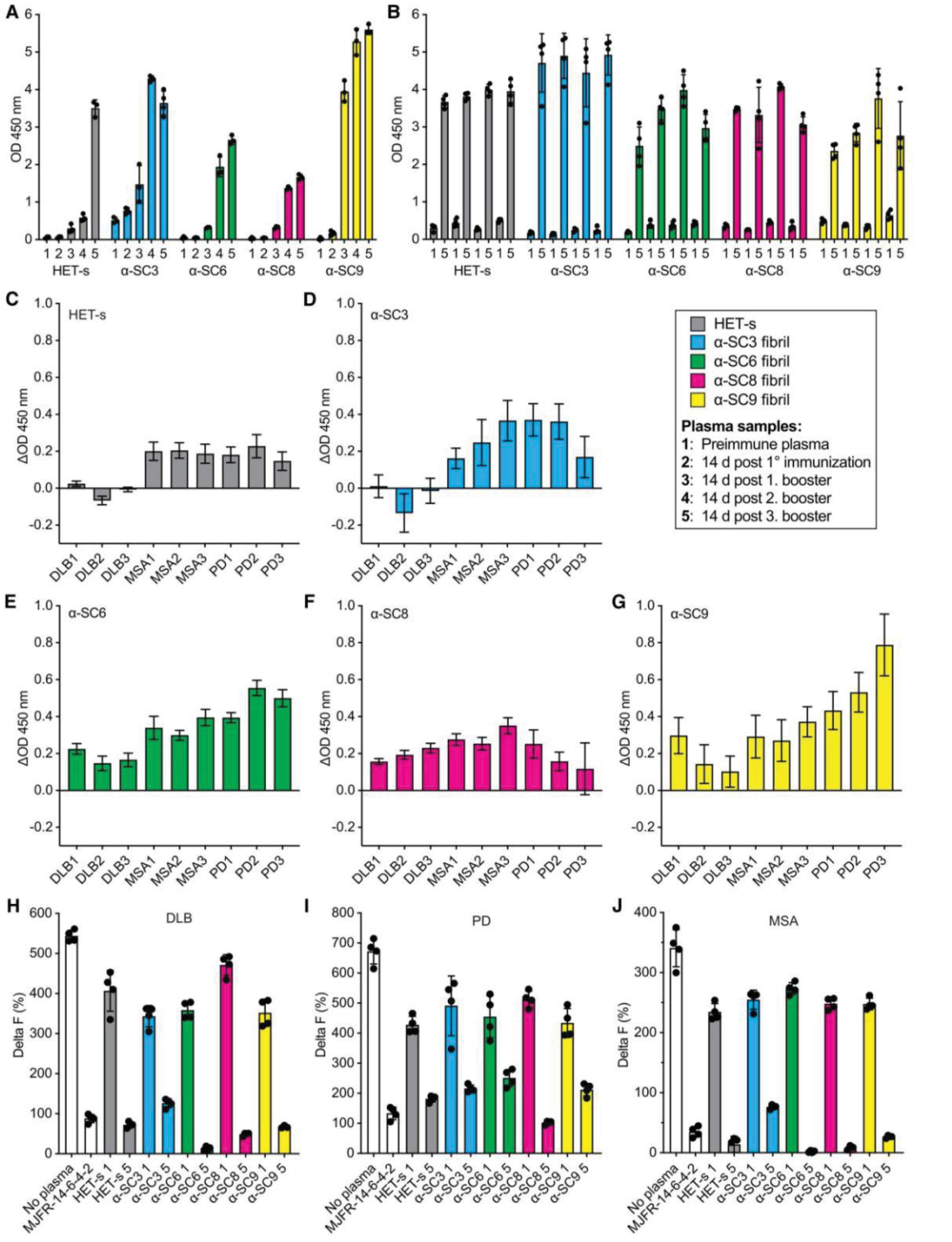


Figure 4 Vaccination of TgM83$^{+/-}$ mice stimulates the production of antibodies against pathological α-syn. (**A**) ELISA measurements were conducted using blood plasma from three or four mice collected before (preimmune plasma) and 2 weeks after the primary immunization and each booster on

(continued)

To characterize the immune response induced by HET-s fibrils and each HET-s-derived vaccine candidate further, we prepared sarkosyl-insoluble fractions enriched in α-syn fibrils from brain homogenates of patients with DLB, PD and MSA (Supplementary Table 2).[16,17] Subsequently, we conjugated the antibodies in plasma from non-immunized and fully immunized mice to protein G-coated magnetic beads to immunoprecipitate the *ex vivo* α-syn fibrils and measured the amount of α-syn fibrils remaining in the cleared fibril fractions using TR-FRET analysis (Fig. 4H–J). The magnetic beads without bound antibodies served as the negative control, whereas the magnetic beads coupled to the MJFR-14-6-4-2 antibody to α-syn served as the positive control. We observed that antibodies induced by all four vaccine candidates, α-SC3, α-SC6, α-SC8 and α-SC9 fibrils, in addition to HET-s fibrils, were capable of recognizing and immunoprecipitating *ex vivo* α-syn fibrils. The immunoprecipitation of α-syn fibrils purified from the brains of patients with DLB (Fig. 4H) and MSA (Fig. 4J) was slightly less efficient with plasma from mice immunized with α-SC3 fibrils than with plasma from mice immunized with α-SC6, α-SC8, α-SC9 and HET-s fibrils. The order of efficiency was α-SC6 > α-SC8 > α-SC9 = HET-s > α-SC3. The plasma from mice immunized with α-SC8 fibrils was slightly more efficient in immunoprecipitating α-syn fibrils purified from the brain of a patient with PD compared with the other three vaccine candidates and HET-s fibrils, all of which exhibited comparable efficacy (Fig. 4I).

Discussion

The results of our study indicate that immunization with all four HET-s-derived vaccine candidates displaying conformational epitopes present on α-syn fibrils resulted in prolonged survival in immunized mice. The level of protection conferred by vaccination was dependent on the vaccine candidate used and the respective mouse model of body-first PD. We observed that the level of protection differed between the two animal models of body-first PD, with generally higher levels observed in mice challenged intragastrically. However, α-SC6 fibrils conferred better protection in intraperitoneally challenged mice. The findings indicate that the two routes of challenge, intragastric and intraperitoneal, are fundamentally distinct and influence the accessibility of pathological α-syn species to antibodies. Although the intraperitoneal challenge uses a 2-fold higher fibril dose than the intragastric route, our previously published data using the quadrivalent vaccine showed highly comparable protection (21% versus 22%), indicating that differences in administered dose alone are unlikely to explain the route-dependent effects observed here.[23] The selected route of challenge might also result in the formation of distinct species of pathological α-syn with varying abundances of accessible antigenic epitopes.

Earlier, we reported that administration of a quadrivalent vaccine comprising equal parts of α-SC3, α-SC6, α-SC8 and α-SC9 fibrils at a dose of 100 µg resulted in a 21% increase in survival following intraperitoneal challenge and a 22% increase following intragastric challenge.[23] In this study, we quadrupled the dose of the vaccine by using 100 µg of a single vaccine candidate. This resulted in a doubling of the level of protection provided by some of the vaccine candidates, with α-SC8 fibrils exhibiting the greatest efficacy, prolonging survival by 42% after intragastric challenge. In addition to the increased amount of a single vaccine component, it is also conceivable that removing the other HET-s-based antigens reduced potential immunological interference. In the quadrivalent formulation, immune responses directed towards any of the additional vaccine components might have competed for immune attention, whereas single-component vaccines might have allowed more focused responses towards epitopes shared across several α-syn species, including the proposed serine-rich conformational stretch.

Analysis of the relative lifespan without weight loss (Supplementary Table 3) showed that these values do not scale directly with the survival extensions reported in Table 1. After intraperitoneal challenge, α-SC6 produced the strongest survival benefit (38%) but only a moderate increase in the proportion of life spent without weight loss (72% mean-based; 65% median-based), whereas α-SC9, despite a smaller survival extension (29%), showed the highest relative preservation of weight (80% and 88%). HET-s (17%) and α-SC3 (12%) displayed relative values in the range of 66%–71%, which broadly paralleled their modest survival effects. In contrast, α-SC8, despite providing only a 6% survival extension, still showed moderately high relative weight-stable values (75% and 71%). Similar dissociations were observed after intragastric challenge. Together, these findings show that the timing of weight loss does not necessarily extend in parallel with overall survival and suggest that the constructs might differentially influence presymptomatic versus symptomatic phases rather than uniformly shifting the disease trajectory.

In addition, we cannot presently determine whether the protective effects observed here reflect sustained antibody activity throughout the course of disease or whether declining antibody titres contributed to the waning protection observed at later time points. We did not assess antibody titres at later time points post-challenge, and a reversal of seroconversion remains a plausible explanation that warrants future investigation. It also remains unknown whether administering an additional booster at these later

Figure 4 (Continued)
ELISA plates coated with the original antigen. The results demonstrate that immunization with HET-s fibrils or any of the four HET-s-derived vaccine candidates progressively induced antibodies against the fibrillar antigens. (**B**) ELISA measurements were conducted using preimmune plasma and plasma from fully vaccinated mice ($n = 4$ individual mice per group). The results indicate that vaccination with HET-s fibrils or any of the four HET-s-derived vaccine candidates induced antibodies that recognize synthetic α-syn fibrils. (**C–G**) Competitive ELISA measurements were conducted using blood plasma from mice ($n = 4$ per group) fully immunized with HET-s fibrils (**C**), α-SC3 fibrils (**D**), α-SC6 fibrils (**E**), α-SC8 fibrils (**F**) or α-SC9 fibrils (**G**), and brain homogenates from five non-neurological (healthy) controls (used as a negative control) and three patients each with DLB, MSA or PD. The results indicate that vaccination elicited a highly variable degree of antibody response to pathological α-syn aggregates in the brains of patients. The response level varied depending on the vaccine candidate and the corresponding synucleinopathy, and was not observed in the case of blood plasma from mice immunized with HET-s or α-SC3 fibrils when tested against brain homogenates from DLB patients. The error bars indicate the mean ± standard error of the mean. (**H–J**) TR-FRET measurements were conducted on α-syn aggregates in sarkosyl-insoluble fractions obtained from patient brains with DLB (**H**), PD (**I**) and MSA (**J**) before and after immunoprecipitation using magnetic beads coupled to antibodies in blood plasma from fully immunized mice ($n = 4$ mice per group). The results indicate that HET-s fibrils and all four of its derivatives had induced antibodies that recognized pathological α-syn aggregates in brains of patients with synucleinopathies. Error bars indicate the mean ± standard deviation. DLB = dementia with Lewy bodies; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; MSA = multiple system atrophy; OD = optical density; PD = Parkinson's disease; TR-FRET = time-resolved fluorescence resonance energy transfer.

time points could prolong protection or whether disease progression would already be too advanced for meaningful benefit. Addressing these questions will be important for evaluating whether such vaccines are best suited for prophylactic use, before or during very early peripheral α-synuclein fibrillization, or whether they also possess therapeutic potential once disease processes are underway.

It is conceivable that alterations to the dose, the timing of the boosters, the route of vaccination, and the adjuvant used might further enhance the observed health benefits. PD and other synucleinopathies primarily affect individuals >60 years of age, with incidences increasing with advancing age.[28] A number of studies have indicated that between 30% and 50% of all cases of PD are of the body-first subtype.[27,29] If the vaccine candidates developed and tested here prove to be protective in humans, they could delay the onset of body-first PD from an average age of 65 years to 92 years. Given that the average lifespan in the Western world is ~80 years for both men and women, the degree of protection afforded by some of the vaccine candidates developed here would virtually eradicate body-first PD, thereby reducing the incidence of PD by almost half.[30] It should be noted, however, that this projection assumes that vaccination is effective either prior to the initial formation of peripheral α-syn fibrils or at very early preclinical stages. Our study examines prophylactic vaccination, and whether similar levels of protection can be achieved once peripheral fibrillization has already begun remains to be determined in future work.

Interestingly, not only the four vaccine candidates displaying grafted conformational epitopes present on α-syn fibrils, but also unmodified HET-s fibrils induced significant immunity in both body-first PD models. Amino acid residues S227 in β1a in the first rung of HET-s and S263 in β3a in the second rung of HET-s form a continuous stretch of serine residues (Fig. 1F and Supplementary Fig. S8A, B), hence a conformational epitope across subunits within the HET-s fibril.[20] Several such stretches of serine residues that form conformational epitopes across subunits are also present in the α-syn fibrils we generated to challenge TgM83$^{+/-}$ mice (PDB ID: 8OQI), where they are formed by S42 or S87 in α-syn (Supplementary Fig. 8),[23] which might explain how antibodies to unmodified HET-s fibrils could induce immunity to α-syn fibrils. It is also possible that HET-s fibrils induce conformation-dependent antibodies to fibrils that are independent of the amino acid sequence. Several studies have demonstrated that certain oligomeric and fibrillar antigens can induce such responses. For instance, immunization of rabbits with a homogeneous population of Aβ42 fibrils resulted in fibril-specific, conformation-dependent antibodies that recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers, but not random coil monomer or prefibrillar oligomers.[31] It is of note that the fibril epitope was also identified in fibrils formed by α-syn or islet amyloid polypeptide, indicating that the epitope is a generic feature of the polypeptide backbone and not sequence specific.[31] Furthermore, antisera of the same specificity were generated in response to immunization with islet amyloid polypeptide prefibrillar oligomer mimics and fibrils.[31] Also, vaccination with a non-human random sequence amyloid oligomer mimic resulted in improved cognitive function and reduced plaque deposition and microhaemorrhage in an Alzheimer's disease mouse model.[32] In another study, a non-self peptide was covalently polymerized with glutaraldehyde until it reached a high β-sheet secondary structure content and formed species between 10 and 100 kDa that were immunogenic, stable and soluble. Inoculation of mice with this preparation resulted in the production of antibodies to antigens with β-sheet secondary structure conformation, including oligomeric conformers from Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases.[33]

When we tested antibodies in plasma from immunized mice against brain homogenates from patients with synucleinopathies using competitive ELISA, we observed different results compared with when we tested the antibodies against sarkosyl-insoluble fractions prepared from brain homogenates that are enriched in α-syn fibrils.[16,17] The antibodies in the plasma of mice immunized with HET-s and α-SC3 fibrils did not recognize DLB brain homogenates in the competitive ELISA, whereas they did recognize α-syn species present in sarkosyl-insoluble fractions prepared from brain homogenates of patients with DLB, PD and MSA. This could indicate that the fraction of recognizable α-syn fibrils is either less accessible, owing to masking, or less abundant in crude brain homogenates from DLB patients than in sarkosyl-extracts when it comes to their detection with antibodies generated to HET-s and α-SC3 fibrils. These findings also indicate that there is a variation in pathological α-syn species between DLB, PD and MSA. Together, these findings indicate that antibody recognition of synthetic fibrils does not necessarily predict *in vivo* protection; although α-SC3 elicited the strongest response to synthetic α-syn fibrils, its protective effect after intragastric challenge was not superior to that of α-SC8, α-SC9 or HET-s. This suggests that the endogenous aggregates formed in our models differ structurally from the synthetic fibrils used for immunization and seeding, and that recognition of these endogenous species is more relevant for protection.

The vaccine candidates developed and evaluated in this study were based on a small subset of conformational epitopes identified on merely two structures of synthetic α-syn fibrils (PDB IDs: 2N0A and 6H6B). Despite this limited selection, they demonstrated significant protection against the disease. We explored only a fraction of the potential conformational epitopes available for designing vaccine candidates in this research. It is probable that the inclusion of additional or different conformational epitopes could enhance immunity and disease protection. Furthermore, the recent discovery of *ex vivo* structures of α-syn fibrils extracted from the brains of individuals with synucleinopathies offers the potential to create vaccines tailored to specific synucleinopathies, which could result in more effective candidates.[16,17]

Crucially, this approach to designing conformational epitopes is of particular significance in the context of vaccine development, because it can be applied to a wide range of pathogenic protein configurations and amyloids, including amyloid β and tau, which are implicated in Alzheimer's disease, islet amyloid polypeptide, which is relevant to type II diabetes, and other protein misfolding disorders. Furthermore, fibrillar vaccines demonstrate structural resilience, maintaining stability at room temperature over extended periods, thereby facilitating their storage, transportation and dissemination.

Conclusion

In conclusion, our data, in conjunction with the aforementioned study,[23] demonstrate that HET-s-derived vaccine candidates significantly delay the onset of PD-like symptoms in mouse models of PD by inducing immunity against α-syn fibrils, particularly in mouse models of body-first PD. The vaccine candidates tested here have significant clinical implications for PD and related synucleinopathies, because they could delay the onset of these diseases to later time points, when most patients die owing to health issues unrelated to PD. Therefore, these findings support the prospect of testing

HET-s-based vaccine candidates in healthy individuals, and especially carriers of PD-related gene mutations, or in patients with isolated REM-sleep behaviour disorder, who eventually develop body-first PD.

Data availability

All data are available in the manuscript or the Supplementary material.

Acknowledgements

We thank the staff of the animal facility at the Forschungszentrum Jülich for excellent animal care. Molecular graphics were created using Mol* Viewer.[34] The thumbnail image for the online table of conents was created in BioRender. Tamgüney, G. (2025) https://BioRender.com/68ur1cc.

Funding

This study was supported by the Weston Brain Institute (RR191051) and The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research (MJFF-009841). J.M.F.-F. received a postdoctoral fellowship from the Parkinson Association of Alberta. H.W. gratefully acknowledges the support of the Alberta Ministry of Technology and Innovation through SPP-ARC (Striving for Pandemic Preparedness—The Alberta Research Consortium).

Competing interests

J.M.F.-F. and H.W. are inventors on a US patent, No. 12,098,173, held by the University of Alberta, that covers, in part, the inventions that were described in this publication. Similar patent applications are pending in Canada (CA3100857A1), the European Union (EP3810 657A4), Japan (JP2021525074A) and Hong Kong (62021039974.2). H.W. and G.T. are co-founders of Solenoid Biosciences LLC, which attempts to commercialize structure-based vaccines for Alzheimer's disease and Parkinson's disease. The remaining authors declare that they have no competing interests.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

References

1. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. α-Synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388:839-840.
2. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, Goedert M. Filamentous α-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett*. 1998;251:205-208.
3. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. α-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:6469-6473.
4. Peng C, Trojanowski JQ, Lee VM. Protein transmission in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2020;16:199-212.
5. Luk KC, Kehm V, Carroll J, et al. Pathological α-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in non-transgenic mice. *Science*. 2012;338:949-953.
6. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24:197-211.
7. Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K. Gastric α-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett*. 2006;396:67-72.
8. Kim S, Kwon SH, Kam TI, et al. Transneuronal propagation of pathologic α-synuclein from the gut to the brain models Parkinson's disease. *Neuron*. 2019;103:627-641.e7.
9. Arotcarena ML, Dovero S, Prigent A, et al. Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of synucleinopathy in non-human primates. *Brain*. 2020;143:1462-1475.
10. Lohmann S, Bernis ME, Tachu BJ, Ziemski A, Grigoletto J, Tamgüney G. Oral and intravenous transmission of α-synuclein fibrils to mice. *Acta Neuropathol*. 2019;138:515-533.
11. Van Den Berge N, Ferreira N, Gram H, et al. Evidence for bidirectional and trans-synaptic parasympathetic and sympathetic propagation of alpha-synuclein in rats. *Acta Neuropathol*. 2019;138:535-550.
12. Tu PH, Galvin JE, Baba M, et al. Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble α-synuclein. *Ann Neurol*. 1998;44:415-422.
13. Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tsuji S, Takahashi H. α-Synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci Lett*. 1998;249:180-182.
14. Tuttle MD, Comellas G, Nieuwkoop AJ, et al. Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α-synuclein. *Nat Struct Mol Biol*. 2016;23:409-415.
15. Guerrero-Ferreira R, Taylor NMI, Mona D, et al. Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils. *Elife*. 2018;7:e36402.
16. Yang Y, Shi Y, Schweighauser M, et al. Structures of α-synuclein filaments from human brains with Lewy pathology. *Nature*. 2022;610:791-795.
17. Schweighauser M, Shi Y, Tarutani A, et al. Structures of α-synuclein filaments from multiple system atrophy. *Nature*. 2020;585:464-469.
18. Coustou V, Deleu C, Saupe S, Begueret J. The protein product of the *het-s* heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:9773-9778.
19. Balguerie A, Dos Reis S, Ritter C, et al. Domain organization and structure–function relationship of the HET-s prion protein of *Podospora anserina*. *EMBO J*. 2003;22:2071-2081.
20. Wasmer C, Lange A, Van Melckebeke H, Siemer AB, Riek R, Meier BH. Amyloid fibrils of the HET-s(218–289) prion form a β solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science*. 2008;319:1523-1526.
21. Ritter C, Maddelein ML, Siemer AB, et al. Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion. *Nature*. 2005;435:844-848.
22. Flores-Fernandez JM, Pesch V, Sriraman A, et al. Rational design of structure-based vaccines targeting misfolded alpha-synuclein conformers of Parkinson's disease and related disorders. *Bioeng Transl Med*. 2024;9:e10665.
23. Pesch V, Flores-Fernandez JM, Reithofer S, et al. Vaccination with structurally adapted fungal protein fibrils induces immunity to Parkinson's disease. *Brain*. 2024;147:1644-1652.
24. Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM. Neuronal α-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human α-synuclein. *Neuron*. 2002;34:521-533.

25. Watts JC, Giles K, Oehler A, et al. Transmission of multiple system atrophy prions to transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:19555-19560.
26. Breid S, Bernis ME, Babila JT, Garza MC, Wille H, Tamgüney G. Neuroinvasion of α-synuclein prionoids after intraperitoneal and intraglossal inoculation. *J Virol*. 2016;90:9182-9193.
27. Berg D, Borghammer P, Fereshtehnejad SM, et al. Prodromal Parkinson disease subtypes — Key to understanding heterogeneity. *Nat Rev Neurol*. 2021;17:349-361.
28. Willis AW, Roberts E, Beck JC, et al. Incidence of Parkinson disease in North America. *NPJ Parkinsons Dis*. 2022;8:170.
29. Horsager J, Borghammer P. Brain-first vs. body-first Parkinson's disease: An update on recent evidence. *Parkinsonism Relat Disord*. 2024;122:106101.
30. World Health Organization. *World health statistics 2023: Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals*. World Health Organization; 2023:119. https://www.who.int/en/publications/i/item/9789240074323.
31. Kayed R, Head E, Sarsoza F, et al. Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Mol Neurodegener*. 2007;2:18.
32. Rasool S, Albay R 3rd, Martinez-Coria H, et al. Vaccination with a non-human random sequence amyloid oligomer mimic results in improved cognitive function and reduced plaque deposition and micro hemorrhage in Tg2576 mice. *Mol Neurodegener*. 2012;7:37.
33. Goni F, Marta-Ariza M, Peyser D, Herline K, Wisniewski T. Production of monoclonal antibodies to pathologic β-sheet oligomeric conformers in neurodegenerative diseases. *Sci Rep*. 2017;7:9881.
34. Sehnal D, Bittrich S, Deshpande M, et al. Mol* viewer: Modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(W1):W431-W437.

3 Zusammenfassung und Diskussion

3.1 Methodische Innovationen zur Detektion peripherer Aβ- und Tau-Aggregate in humanen Stuhlproben zur Diagnostik der AD

Trotz kontinuierlicher Bemühungen der modernen Wissenschaft sind die der AD zugrunde liegenden Mechanismen bislang nicht vollständig verstanden. Zudem erfolgt die Diagnose häufig erst nach dem Auftreten schwerwiegender Symptome. Vor diesem Hintergrund rückt zunehmend die Frage in den Fokus, welche pathologischen Veränderungen bereits in den Frühstadien der Erkrankung nachweisbar sind und inwiefern die periphere Pathophysiologie hierbei eine Rolle spielt. Zunehmende Studienergebnisse weisen darauf hin, dass die AD eine multidimensionale Erkrankung ist, die nicht ausschließlich das Gehirn betrifft, sondern auch periphere biologische Systeme einbezieht. Insbesondere im gastrointestinalen System wurden AD-assoziierte Veränderungen, wie Aβ-Akkumulationen in enterischen Neuronen, Veränderungen der intestinalen Motilität und der intestinalen Permeabilität, entzündliche Prozesse im Darmgewebe sowie die Beeinträchtigung enterischer neuronaler Signalwege, beschrieben [179–181]. Diese Ergebnisse zeigen, dass Wechselwirkungen zwischen Peripherie und dem ZNS eine bedeutsame Rolle bei der AD-Pathologie spielen.

Ein vielversprechender methodischer Ansatz zur Detektion krankheitsassoziierter Aggregate ist die sFIDA-Technologie. Diese wurde bereits für den Nachweis von Aβ-, Tau- und α-Syn-Oligomeren eingesetzt, insbesondere in CSF-Proben. Darüber hinaus wurde sFIDA auch zur Quantifizierung von Aβ-Oligomeren in Blutplasma angewendet [153, 154, 182]. Auf Grundlage dieser Vorarbeiten bestand das Ziel dieser Arbeit (s. Kapitel 2.1) darin, die sFIDA-Technologie für den Einsatz an nicht-invasiv gewonnenen Stuhlproben als periphere Matrix zu evaluieren und deren analytische Leistungsfähigkeit zu bestimmen.

3.1.1 Stuhl als diagnostische Matrix

Die Wahl von Stuhl als Untersuchungsmatrix ist hierbei mit den Anforderungen der Biomarkeranalytik verbunden. Die Auswahl einer geeigneten Matrix stellt einen zentralen Faktor in der Biomarkeranalytik dar, da hierbei die Herkunft, die Verteilung sowie die physiologischen Eigenschaften der Analyten berücksichtigt werden müssen. Eine optimale Matrix sollte den Biomarker in detektierbarer Konzentration enthalten, möglichst einfach zugänglich sein und eine zuverlässige analytische Bestimmung ermöglichen. Sofern die eingesetzte analytische Methode eine ausreichende Sensitivität bietet, wird eine einfach zugängliche patientenschonende Probenentnahme bevorzugt [183]. Hinsichtlich seiner Zusammensetzung ist Stuhl eine komplexe Probenmatrix, die zu etwa 75% aus Wasser und zu 25% aus festen Bestandteilen besteht. Der feste Anteil lässt sich weiter in Kohlenhydrate,

Proteine, Fette, Gallenflüssigkeit sowie zu einem großen Teil in mikrobielle Biomasse unterteilen. Diese Zusammensetzung variiert in Abhängigkeit von mehreren Faktoren, darunter die Gesamtnahrungsaufnahme, die Ernährung, das Alter und das Körpergewicht [184]. Insbesondere die Darmmikrobiota wirken über die Darm-Hirn-Achse als zentraler Regulator der AD-Pathologie im Rahmen der Modulation neuroinflammotorischer Prozesse. Die kontinuierliche bidirektionale Kommunikation zwischen dem ZNS und dem Darm erfolgt über die Darm-Hirn-Achse, wobei neuronale, endokrine und immunologische Signalwege die physiologische Homöostase aufrechterhalten. Die Darmmikrobiota spielen hierbei eine entscheidende Rolle und beeinflussen die Neurotransmittersynthese und Neuromodulation, was sich auf die bidirektionale Signalübertragung und auf weiterführende Hirnfunktionen wie Kognition, Emotionsregulation und Stressantworten auswirken kann [30]. Eine Dysbiose kann die Integrität der Darmbarriere schädigen, systemische Entzündungsreaktionen begünstigen und dadurch neuroinflammatorische Prozesse im ZNS verstärken, die als primäre Reaktion auf die AD-Pathologie gelten. Diese Prozesse können zudem die Blut-Hirn-Schranke beeinträchtigen, neuronale Schäden fördern und letztendlich Neurodegeneration verursachen. Darüber hinaus können mikrobielle Metaboliten wie kurzkettige Fettsäuren sowie Lipopolysaccharide Mikrogliazellen aktivieren und so die Aβ-Aggregation fördern [30, 185]. Außerdem zeigten verschiedene Studien, dass mikrobielle Amyloide durch *Cross-seeding* die Fehlfaltung und Aggregation verschiedener körpereigener amyloidogener Proteine auslösen können. Das *Cross-seeding* amyloidogener Proteine durch mikrobielle Amyloide wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* dokumentiert [186, 187]. Zudem wurde nachgewiesen, dass sich die Zusammensetzung der Darmmikrobiota im Verlauf der AD progressiv verändert, wobei sich das Gleichgewicht von antiinflammatorischen hin zu proinflammatorischen Taxa verschiebt [188, 189]. In der Studie von Ferreiro et al. wurde nachgewiesen, dass sich die Zusammensetzung der Darmmikrobiota bereits in der präklinischen Phase der AD signifikant verändert [190]. Diese mikrobielle Dysbiose äußert sich primär in einer veränderten taxonomischen Zusammensetzung, die durch eine Zunahme potenziell proinflammatorischer Spezies und eine gleichzeitige Abnahme gesundheitsfördernder Bakterien charakterisiert wird. Hierbei wurde gezeigt, dass die zerebrale Aβ- und Tau-Pathologie, bestimmt mittels CSF- und Blut-Analysen und PET-Bildgebung, eng mit diesen mikrobiellen Veränderungen korreliert. Marker der strukturellen Neurodegeneration wiesen hingegen keine Assoziation mit der veränderten Mikrobiota auf. Da die mikrobielle Dysbiose somit spezifisch mit der Akkumulation pathologischer Proteine assoziiert ist und der makroskopischen Hirnatrophie zeitlich vorausgeht, wird sie als ein frühes Phänomen in der AD-Pathogenese eingeordnet [190].

Gastrointestinale Dysfunktionen wurden in zahlreichen Studien mit neurodegenerativen Erkrankungen und kognitiven Beeinträchtigungen in Zusammenhang gebracht. Insbesondere bei PD gilt eine Obstipation als eines der am häufigsten berichteten prodromalen Symptome

[191]. Auch im Kontext der AD wurden in mehreren Studien Hinweise auf frühe gastrointestinale Dysfunktionen wie Obstipation, eine signifikant verlangsamte Darmtransitzeit sowie chronische intestinale Entzündungsprozesse geliefert. Diese Symptome treten oft Jahre vor den ersten kognitiven Beeinträchtigungen auf und korrelieren mit dem progressiven Krankheitsverlauf [143, 192–194]. Diese klinischen Befunde verdeutlichen, dass gastrointestinale Dysfunktionen als Hinweis auf eine frühe periphere Manifestation der AD gewertet werden können.

In der Peripherie sind verschiedene Mechanismen an der Clearance von Aβ und Tau beteiligt. Sowohl die monomeren Formen als auch die pathologischen Aggregate von Aβ und Tau werden in der Peripherie primär über die Leber und die Niere aufgenommen und abgebaut, wobei sie über die Galle oder den Urin ausgeschieden werden [31, 195–198]. Angesichts dieser multifaktoriellen Zusammenhänge, von der Neuroinflammation infolge einer Dysbiose und dem mikrobiellen *Cross-seeding* über die periphere Clearance dieser Aggregate durch biliäre Ausscheidungswege bis hin zu gastrointestinalen Motilitätsstörungen, stellt der Stuhl eine vielversprechende nicht-invasiv gewonnene Matrix für die AD-Diagnose mittels sFIDA-Technologie dar, der zugleich einen Einblick in die periphere AD-Pathophysiologie ermöglicht.

3.1.2 Machbarkeitsstudie

In einer vorausgehenden Studie von Pils et al. (s. Kapitel 2.2) wurde die sFIDA-Technologie erstmals für den Nachweis von Aβ-Aggregaten in humanen Stuhlproben adaptiert und validiert. Hierbei wurden die Capture- und Detektionsantikörper gewählt, die gegen dasselbe oder ein überlappendes Epitop auf Aβ gerichtet sind, sodass ausschließlich Aggregate detektierbar waren und im Falle einer Monomerbindung keine Bindung durch den Sekundärantikörper möglich war. Da Stuhlproben eine besondere präanalytische Herausforderung darstellen, wurde zunächst ein Homogenisierungspuffer hergestellt und etabliert. Anschließend wurde die Stabilität der Proben getestet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die homogenisierten Stuhlproben stabil gegenüber wiederholten Gefrier-Tau-Zyklen waren und die Messungen dieser Homogenate reproduzierbare Ergebnisse lieferten. Darüber hinaus wurden die Selektivität und Inter-Assay-Variabilität des Assays systematisch validiert. Nach Methodenetablierung erfolgte eine Validierungsstudie an 26 AD-Patienten und 31 gesunden Kontrollprobanden. Hierbei wurde gezeigt, dass Aβ-Aggregate sowohl in gesunden als auch in kognitiv beeinträchtigten Individuen nachgewiesen werden konnten. Die AD-Kohorte wies jedoch eine signifikant erhöhte Aβ-Konzentration im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden auf, mit einer Spezifität von 90,3% und einer Sensitivität von 53,8%. Bei dieser Studie handelte es sich um eine Machbarkeitsstudie, die aufgrund dessen in ihrer Aussagekraft durch die geringe Anzahl der getesteten Proben limitiert war.

3.1.3 Klinische Validierung

Aufbauend auf den Arbeiten von Pils et al. wurden in der vorliegenden Studie (s. Kapitel 2.1) erstmals sowohl Aβ- als auch Tau-Aggregate in humanen Stuhlproben quantifiziert und deren diagnostisches Potenzial evaluiert.

Basierend auf einem umfassenden, anhand von CSF-Biomarkern klassifizierten Patientenkollektiv sollte im Rahmen einer klinischen Validierung untersucht werden, inwieweit die im Stuhl nachgewiesenen Aβ- und Tau-Oligomere als valide Biomarker für die (Früh-) Diagnose beitragen können. Zur klinischen Klassifizierung der untersuchten Proben im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Rekrutierung der Studienteilnehmenden in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Köln. Als kognitiv gesunde Kontrollprobanden wurden Personen eingeschlossen, die keine neurologischen Vorerkrankungen, keine subjektiven kognitiven Beschwerden sowie keine Einschränkungen im Alltag aufwiesen. Die klinische Beurteilung der Patienten mit kognitiven Defiziten erfolgte durch ein interdisziplinäres Team, das auf die Diagnostik von Demenzerkrankungen spezialisiert ist. Für die diagnostische Einordnung wurden hierbei die Kriterien des NIA-AA herangezogen. Studienteilnehmende, die eine subjektive Verschlechterung ihrer kognitiven Leistungsfähigkeit wahrnahmen, in objektiven neuropsychologischen Tests jedoch unauffällige Ergebnisse erzielten und ihre Alltagsautonomie beibehielten, wurden der SCD-Gruppe zugeordnet. Im Gegensatz dazu wurden Teilnehmende mit objektivierbaren kognitiven Defiziten bei gleichzeitig intakten Alltagsfunktionen als Fälle von leichter kognitiver Beeinträchtigung MCI klassifiziert. Die Diagnose einer Demenz wurde gestellt, sobald die kognitiven Einschränkungen eine klinische Beeinträchtigung der Alltagsautonomie nach sich zogen. Darüber hinaus wurde die zugrundeliegende AD-Pathologie über den A/T/N-Biomarkerstatus biologisch verifiziert, wobei CSF-Analysen sowie PET-Verfahren durchgeführt wurden. Die zwischen September 2020 und November 2024 gesammelten Stuhlproben wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels der sFIDA-Technologie analysiert. Das Patientenkollektiv umfasste 206 Individuen, darunter 105 kognitiv gesunde Kontrollprobanden (engl.: *Healthy controls*, HC) mit einem durchschnittlichen Alter von 52,9 ± 18,2 Jahren und 101 Patienten mit kognitiver Beeinträchtigung (Demenz, n = 16; MCI, n = 82; SCD, n = 3) mit einem durchschnittlichen Alter von 70,6 ± 8,8 Jahren (s. Anhang 5.1, Table 1).

Die in dieser vorliegenden Studie ermittelten, signifikant erhöhten fäkalen Aβ-Konzentrationen bei kognitiv beeinträchtigten Individuen gegenüber gesunden Kontrollprobanden (beidseitiger Mann-Whitney U Test mit einem Konfidenzintervall von 0,05; $p = 4{,}3 \times 10^{-6}$; $\delta = 0{,}37$) bestätigen (s. Anhang 5.1, Figure 1(A)) die Ergebnisse der Vorarbeiten von Pils et al. und weisen auf eine periphere Dimension der AD-Pathologie hin, bei der Aβ über gastrointestinale Clearance-Prozesse in den Stuhl gelangt. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit (s. Kapitel 2.1) erstmalig nachgewiesen werden, dass auch Tau-Aggregate in humanen

Stuhlproben detektierbar und bei kognitiv beeinträchtigten Individuen (n = 100; Demenz, n = 16; MCI, n = 81; SCD, n = 3) gegenüber gesunden Kontrollprobanden (n = 104) signifikant ($p = 1{,}4 \times 10^{-12}$; $\delta = 0{,}57$) erhöht sind (s. Anhang 5.1, Figure 1(B)). Um einen altersbedingten Anstieg der Aβ- und Tau-Konzentrationen auszuschließen, wurden die Analysen an einer Subgruppe der Kontrollprobanden (≥ 60 Jahre, n = 48) wiederholt, wodurch der Altersdurchschnitt der Kontrollgruppe von 52,9 auf 68,4 Jahre erhöht wurde, während das mittlere Alter der Patienten unverändert bei 70,6 Jahren beibehalten wurde. Die Analysen bei reduzierter Altersdifferenz ergaben ebenfalls signifikant erhöhte fäkale Konzentrationen von Aβ ($p = 9{,}4 \times 10^{-7}$, $\delta = 0{,}50$) und Tau ($p = 1{,}6 \times 10^{-7}$, $\delta = 0{,}53$) bei kognitiv beeinträchtigten Individuen gegenüber den gesunden Kontrollprobanden (s. Anhang 5.1, Figure S1). Diese Ergebnisse bestätigen, dass die erhaltenen Ergebnisse nicht auf einen altersbedingten Anstieg dieser Proteine zurückzuführen sind. Da gastrointestinale Funktionen die fäkalen Biomarker-Konzentrationen potenziell beeinflussen können, wurden die intestinale Symptomatik mittels des *Cleveland Clinic Constipation Scoring System* (CCCS) erfasst. Das CCCS wird zur Quantifizierung des Schweregrads einer klinischen Obstipation eingesetzt [199]. Hierbei wurde ermittelt, dass sich die mittleren CCCS-Werte zwischen kognitiv beeinträchtigten Individuen und gesunden Kontrollprobanden nicht signifikant unterscheiden ($p = 0{,}497$) (s. Anhang 5.1, Table 1). Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zum erstmaligen fäkalen Nachweis von Tau-Aggregaten sind von besonderer Bedeutung, da Tau-Pathologie neben der Aβ-Pathologie als charakteristisches AD-Merkmal gilt und bislang ausschließlich in CSF- und PET-basierten Untersuchungen zugänglich war.

Da die periphere Clearence von Aβ und Tau zu einem wesentlichen Teil über die Leber erfolgt und diese Proteine somit über die Galle in den Darm gelangen und mit dem Stuhl ausgeschieden werden können [31, 195], könnte eine beeinträchtigte periphere Clearance ebenfalls eine mögliche Erklärung für die erhöhten fäkalen Aggregatkonzentrationen darstellen. Ergänzend hierzu belegen andere Studien, dass Tau physiologisch aus dem Gehirn in die Peripherie transportiert und dort abgebaut wird [195] und dass das ENS gewebespezifisch nur zwei der sechs im Gehirn vorkommenden Tau-Isoformen exprimiert [200].

Die sFIDA-Messungen erfolgten unter Einsatz von Antikörpern, die gegen den N-Terminus der Tau- und Aβ-Spezies gerichtet waren und nicht spezifisch p-Tau oder bestimmte Aβ-Isoformen erfassen, sodass die ermittelten Werte die Gesamtkonzentrationen N-terminal detektierbarer Aβ- und Tau-Aggregate in den fäkalen Proben widerspiegelten. Die in der vorliegenden Studie (s. Kapitel 2.1) erhaltenen Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Arbeiten, die bereits Aβ- und Tau-Aggregate in humanen peripheren Geweben nachgewiesen haben [31, 85, 201]. Außerdem wurde in einem AD-Mausmodell gezeigt, dass die Aβ- und p-Tau-Konzentrationen sowohl im intestinalen Gewebe als auch in fäkalen Proben im Vergleich zu Kontrollen

signifikant erhöht waren [143]. Diese Befunde stützen ebenso wie die Ergebnisse der vorliegenden Studie das Konzept einer peripheren AD-Proteinopathie. Allerdings existieren nach aktuellem Kenntnisstand bislang keine publizierten Vergleichsstudien, die fäkale Tau-Aggregate in humanen Stuhlproben quantitativ nachgewiesen haben.

3.1.4 Analytische Leistungsbewertung des entwickelten Assays

Ergänzend zur Auswahl der geeigneten Probenmatrix muss eine analytische Charakterisierung des Assays durchgeführt werden. Diese ermöglicht die Bewertung der Aussagekraft der Ergebnisse. Die analytische Leistungsfähigkeit eines Assays wird unter anderem durch die LOD bzw. LLOQ bestimmt. Die Präzision wird über den Variationskoeffizienten CV% angegeben. Jede Konzentrationsstufe der SiNaPs-Kalibrationsreihe wurde in vier technischen Replikaten analysiert, wobei pro Well 25 Bilder aufgenommen wurden. Der CV%-Wert wurde anschließend auf Basis dieser Replikatmessungen berechnet. Die in dieser Arbeit (s. Kapitel 2.1) angegebenen CV%-Werte entsprechen dem Mittelwert der über alle Messungen ermittelten Variationskoeffizienten.

3.1.4.1 Detektionsgrenzen und Kalibration

Die LOD beschreibt die niedrigste nachweisbare Analytkonzentration, während die LLOQ die niedrigste Konzentration angibt, die noch mit ausreichender Genauigkeit und Präzision quantifiziert werden kann [170]. Zur methodischen Optimierung der sFIDA-basierten Detektion von Aβ- und Tau-Oligomeren in Stuhlproben wurden verschiedene Assayparameter systematisch untersucht (die entsprechenden Optimierungsdaten werden im Rahmen dieser Arbeit nicht dargestellt). Zur Bestimmung der Detektionsparameter wurden jeweils Verdünnungsreihen der entsprechenden Analyten, $Aβ_{1-15}$ - oder Vollängen Tau-SiNaPs, gemessen. Für die Aβ-Oligomer-Messungen in Stuhlhomogenaten mittels der sFIDA-Technologie wurden eine LOD von 0,55 ± 0,29 fM und eine LLOQ von 1,77 ± 1,02 fM bestimmt. Der dazugehörige CV% betrug 20,75 ± 7,62%. In der vorausgehenden Studie von Pils et al. wurden für den Nachweis fäkaler Aβ-Aggregate mittels der sFIDA-Technologie ein LOD-Wert von 1,68 fM als Nachweisgrenze und ein CV%-Wert von 13,4% ermittelt. Die Sensitivität dieses Assay liegt somit, übereinstimmend mit der vorliegenden Studie, im subfemtomolaren Bereich (s. Kapitel 2.2). Für die Tau-Oligomer-Messungen ergab sich eine LOD von 2,07 ± 1,00 fM sowie eine LLOQ von 7,34 ± 3,47 fM bei einem CV% von 26,7 ± 6,50%. Die LOD wurde auf Ebene des sFIDA-Readouts anhand des durchschnittlichen Signals der BC und der zweifachen Standardabweichung der BC berechnet. Anschließend wurde dieser pixelbasierte Detektionswert mithilfe der jeweiligen Kalibrationskurve in eine molare Konzentration umgewandelt. Für eine möglichst präzise Umwandlung des gemessenen Signals in Konzentrationswerte ist eine passende Modellierung der

Kalibrationskurve erforderlich. Für die Kalibrierung wurde eine polynomiale Regression zweiten Grades der Standardkurve durchgeführt, da insbesondere im geringeren Konzentrationsbereich Abweichungen von einem linearen Zusammenhang zwischen gemessenem Signal und der berechneten Konzentration beobachtet wurden. Eine adäquate Modellierung der Kalibrationskurve ist unverzichtbar für die zuverlässige Quantifizierung der Analyten in Immunoassays. Die Quantifizierung mittels polynomialer Modelle wird als geeignete Alternative zu logistischen Modellen beschrieben. Die Regression der Kalibrierkurven mittels polynomialer Modelle liefert daher präzisere und weniger verzerrte Schätzwerte für die Proben [202]. Ein solches Modell ist vor allem bei sehr niedrigen Analytkonzentrationen relevant, da das gemessene Signal aufgrund von Hintergrundsignalen, Matrixeffekten oder Signalrauschen stark beeinflusst werden kann.
Diese Assayparameter zeigten, dass die sFIDA-Technologie eine hohe analytische Sensitivität aufweist und in der Lage ist, sowohl Aβ- als auch Tau-Oligomere in Stuhlhomogenaten im femtomolaren Konzentrationsbereich nachzuweisen.

3.1.4.2 Präzision

Ein häufig verwendetes Akzeptanzkriterium für die Präzision bioanalytischer Assays liegt bei CV ≤ 20% [170]. Für den Nachweis fäkaler Aβ-Aggregate mittels der sFIDA-Technologie wurde ein CV%-Wert von 13,4% ermittelt, der dieses Kriterium erfüllt. Der mittlere CV%-Wert der Interassay-Varianz für den Tau-Assay lag mit 26,7% hingegen oberhalb dieses Akzeptanzkriteriums. SiNaPs stellen definierte und standardisierte Referenzpartikel dar und ermöglichen somit die Beurteilung der technischen Präzision des Assays unabhängig von der Probenvariabilität und den Matrixeffekten [166]. Aus diesem Grund wurde die Präzision beider Assays anhand wiederholter Messungen der jeweiligen SiNaPs-Kalibrationsreihen ermittelt. Ein direkter Vergleich mit herkömmlichen bioanalytischen Assays ist jedoch aufgrund des Einzelpartikeldetektionsprinzips der sFIDA-Technologie nur eingeschränkt zulässig. Der erhöhte CV%-Wert lässt sich auf mehrere methodische Besonderheiten zurückführen. Das mikroskopiebasierte Messprinzip der sFIDA-Technologie erfasst pro Well nur 25% der gesamten Welloberfläche. Insbesondere bei sehr geringen Aggregatkonzentrationen kann nicht ausgeschlossen werden, dass die in der Probe vorhandenen Einzelpartikel stochastisch ungleichmäßig auf der Oberfläche verteilt sind und sich daher nicht vollständig innerhalb des gemessenen Bereichs befinden. So liegt die theoretische Anzahl an Proteinaggregaten pro Well bei einer Aggregatkonzentration von 1 fM und einem Applikationsvolumen von 20 µL bei etwa 12.044 Aggregaten, was bei gegebenen Bild- und Wellgrößen etwa 120 Aggregaten pro Bild entspricht (s. Anhang 5.2). Zudem trägt hierbei das begrenzte Volumen an Proben von 20 µL weiter zur erhöhten Streuung bei. Bei sehr niedrigen Aggregatkonzentrationen ist die absolute Anzahl an Aggregaten im applizierten Probenvolumen sehr gering, wodurch die

Wahrscheinlichkeit zunimmt, dass die applizierte Probe nur wenige oder keine Aggregate enthält. Insgesamt können diese Faktoren bei niedrigen Konzentrationen zu erhöhten Varianzen der detektierten Aggregate beitragen.
Darüber hinaus beruht die Detektion einzelner Partikel auf der Antikörper-Antigen-Bindung, die von mehreren Faktoren beeinflusst werden kann, darunter die Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Antikörpern, die Konjugation und die Bindungsfähigkeit der Detektionsantikörper, die verwendeten Puffer sowie die Probenmatrix [203, 204]. Diese Faktoren können gemeinsam dazu beitragen, dass insbesondere bei niedrigen Aggregatkonzentrationen erhöhte Varianzen auftreten, da nicht in jedem Bild eine vergleichbare Anzahl an Aggregaten detektiert werden kann.
Die Bewertung dieses Wertes anhand des Akzeptanzkriteriums ist außerdem kritisch zu betrachten, da dieses nur ein Teil der Varianz realer Analysedaten erklärt und systematische Methodeneffekte unberücksichtigt lässt. Obwohl meist ein CV%-Wert unter 20% als Akzeptanzkriterium für die Präzision gilt, ist dieses Kriterium allgemein für Immunoassays nur eingeschränkt übertragbar, da diese auf der Analyt-Antikörper-Bindungsreaktion beruhen, können sie aufgrund dessen eine höhere Variabilität aufweisen [169, 204–206]. Der erhöhte CV%-Wert weist somit auf eine größere Streuung der Messwerte hin, stellt jedoch nicht die analytische Anwendbarkeit dieses Assays zum Nachweis von Tau-Oligomeren im subfemtomolaren Konzentrationsbereich infrage.

3.1.4.3 Diagnostische Trennschärfe

Um die diagnostische Trennschärfe der fäkalen Biomarker zu evaluieren, wurden Aβ- und Tau-Aggregate als Einzelmarker analysiert. Hierbei zeigte fäkales Tau eine stärkere Differenzierung zwischen Patienten und gesunden Kontrollprobanden (AUC 0,80 ± 0,05) als fäkale Aβ-Aggregate (AUC 0,68 ± 0,04). Die kombinierte Analyse beider Biomarker verbesserte die Trennschärfe jedoch weiter, was auf einen komplementären Informationsgehalt beider Biomarker hindeutet (AUC 0,83 ± 0,05). Die beobachtete Steigerung der diagnostischen Trennschärfe steht im Einklang mit Studien, die ebenfalls verbesserte Trennschärfe durch multivariable Analysen von Aβ- und Tau-Pathologie beschrieben haben [207, 208]. Die stärkste diagnostische Trennschärfe wurde durch die Integration fäkaler Biomarker mit demographischen Faktoren (Alter und Geschlecht) erzielt, mit einer AUC von 0,91 ± 0,06 (s. Anhang 5.1, Figure 5 & Table S2). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Quantifizierung der fäkalen Aβ- und Tau-Aggregate eine eigenständige diagnostische Leistung erbringt, ihr volles Potenzial jedoch erst im Rahmen multivariabler Biomarkeranalysen unter Einbeziehung demographischer Faktoren entfaltet.

3.1.4.4 Korrelation fäkaler Aβ- und Tau-Aggregate mit etablierten Biomarkern

Zur Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen etablierten CSF-Biomarkern und den mittels der sFIDA-Technologie quantifizierten fäkalen Aβ- und Tau-Aggregaten wurden Regressionsanalysen durchgeführt. Hierbei wurde ermittelt, dass fäkale Aβ-Konzentrationen signifikante inverse Korrelationen mit CSF-Tau-Biomarkern (t-Tau, p-Tau181 sowie p-Tau181/$Aβ_{1-42}$) aufwiesen, wobei der stärkste Zusammenhang mit p-Tau181 beobachtet wurde (s. Anhang 5.1, Figure 3(A) & Figure 3(B)). Eine inverse Korrelation wurde ebenfalls nach einer multivariablen Regression mit den demografischen Faktoren Alter, Geschlecht und der klinischen Diagnose beobachtet. Diese Ergebnisse decken sich mit den Befunden von Botella Lucena et al., in denen Aβ- und Tau-Biomarker sowohl in menschlichem Plasma als auch im Serum von Mausmodellen longitudinal analysiert wurden [209]. Hierbei wurde nachgewiesen, dass vor dem Auftreten der Proteinpathologie die Aβ-Konzentrationen (sowohl $Aβ_{42}$ als auch $Aβ_{40}$) im Blut ansteigen und im weiteren Verlauf der Erkrankung mit fortschreitender Aβ-Pathologie, insbesondere $Aβ_{42}$, wieder sinken. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Serum-Tau-Konzentrationen in Mäusen mit der fortschreitenden Tau-Pathologie korrelieren und im Laufe der Erkrankung kontinuierlich ansteigen [209]. Darüber hinaus wurde in einer weiteren Studie von Pan et al. gezeigt, dass diese pathologischen Aβ-Veränderungen nicht linear mit dem Krankheitsverlauf korrelieren, sondern dass das Plasma-$Aβ_{42}$ über das AD-Kontinuum von normaler Kognition zu einer SCD signifikant ansteigt und von SCD über MCI bis hin zu AD-Demenz wieder abfällt [210]. Eine mögliche Erklärung für diese inverse Korrelation könnten die zunehmenden Aβ-Ablagerungen im Gehirn mit dem Fortschreiten der Pathologie oder eine Dysfunktion der Clearance-Systeme aus dem Gehirn in die Peripherie sein [210], wodurch sich eine reduzierte Aβ-Konzentration in fäkalen Proben nachweisen lässt. Dahingegen steigen die CSF-Tau-Konzentrationen im Krankheitsverlauf kontinuierlich an [209], sodass die inverse Korrelationen dieser Biomarker möglicherweise den zeitlich versetzten Zusammenhang zwischen der Aβ- und der Tau-Pathologie widerspiegelt. Bei der Interpretation dieser Befunde muss jedoch berücksichtigt werden, dass die zitierten Studien überwiegend lösliche bzw. nicht aggregatspezifisch erfasste Aβ- und Tau-Spezies in Blut, Serum, Plasma oder CSF untersucht haben. Die hierzu verwendeten Immunoassays erlauben daher keine eindeutige Differenzierung zwischen Monomeren oder Multimerstrukturen [209, 210]. Ein direkter Vergleich mit den in der vorliegenden Arbeit (s. Kapitel 2.1) mittels der sFIDA-Technologie detektierten fäkalen Aβ- und Tau-Aggregaten ist daher nur eingeschränkt möglich, da sich sowohl die untersuchte Probenmatrix als auch die detektierte Proteinspezies unterscheiden. Die beiden zitierten Studien untersuchten die dynamischen Veränderungen peripherer Biomarker im Verlauf der AD-Pathologie, wobei sich die vorliegende Arbeit auf aggregierte Strukturen in fäkalen Proben fokussiert. Auch wenn

diese Befunde mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit keinen direkten Vergleich erlauben, unterstützen sie konzeptionell die Annahme, dass periphere Aβ- und Tau-Proteine mit der zentralen AD-Pathologie assoziiert sein können.

Anschließend wurden Analysen durchgeführt, indem die fäkalen Aβ- sowie Tau-Aggregatkonzentrationen statistisch mit der AT(N)-Klassifizierung verglichen wurden. Hierbei wurde nachgewiesen, dass fast alle Patientenkohorten (A+T+, A+T-, A-T-) erhöhte fäkale Aβ- und Tau-Aggregatkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen. Die (A-T+) Kohorte zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollen. Dies ist jedoch aufgrund der sehr geringen Anzahl an Individuen (n = 3) nur eingeschränkt interpretierbar. Ein bemerkenswertes Ergebnis hierbei war jedoch, dass sowohl fäkale Aβ-Konzentrationen ($p = 4{,}2 \times 10^{-5}$, $\delta = 0.48$) als auch Tau-Aggregatkonzentrationen ($p = 2{,}6 \times 10^{-7}$, $\delta = 0{,}60$) in der (A-T-) Kohorte im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht waren (s. Anhang 5.1, Figure 2(A) & Figure 2(B)). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Zuweisung zur (A-T-) Kohorte auf negativen CSF-Biomarkern beruhte. Nach der AT(N)-Klassifizierung beschreibt die (A-T-) Kohorte zwar das Fehlen einer AD typischen Aβ- und Tau-Pathologie im ZNS [33], schließt jedoch nicht aus, dass bereits periphere pathologische Veränderungen vorliegen. Eine denkbare Erklärung wäre, dass AD-assoziierte Veränderungen in bestimmten Fällen bereits in der Peripherie auftreten und dort detektierbar sind, bevor sie mit etablierten CSF-Analysen nachgewiesen werden können. Aufgrund dessen könnten fäkale Biomarker frühe periphere Veränderungen abbilden, die durch die AT(N)-Klassifizierung noch nicht erfasst werden.

Außerdem schließt diese Klassifizierung nicht zwingend frühe Krankheitsphasen sowie weitere neurodegenerative, vaskuläre, inflammatorische oder nicht-AD-spezifische Pathologien aus. Da die periphere Inflammation als ein potenzieller Risikofaktor für die AD und vaskuläre Demenz diskutiert wird [211], könnten in dieser Kohorte auch Individuen enthalten sein, bei denen die kognitive Beeinträchtigung nicht primär durch eine im CSF nachweisbare AD-Pathologie, sondern durch alternative systemische, inflammatorische oder periphere Mechanismen bedingt ist. Dadurch kann diese Kohorte trotz fehlender AD-Biomarker eine klinisch heterogene Zusammensetzung aufweisen und Individuen mit verschiedenen Ursachen einer kognitiven Beeinträchtigung umfassen. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die etablierten CSF-Biomarker nicht vollständig mit den fäkalen Biomarker-Ergebnissen übereinstimmen und die periphere Proteinopathie möglicherweise nicht durch die AT(N)-Klassifizierung erfasst werden kann.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass Aβ- und Tau-Aggregate mittels der sFIDA-Technologie zuverlässig in humanen Stuhlproben im subfemtomolaren Konzentrationsbereich nachgewiesen werden können. Die signifikant erhöhten Konzentrationen beider Biomarker bei kognitiv beeinträchtigten Individuen sowie die verbesserte diagnostische Trennschärfe durch multimodale Analysen von fäkalen Aβ- und

Tau-Biomarkern und demographischen Faktoren unterstreichen das Potenzial fäkaler Proteinaggregate in nicht-invasiv gewonnen Proben als Biomarker im Kontext der AD-Diagnostik. Außerdem deuten die Unterschiede zwischen etablierten CSF-basierten AT(N)-Biomarkern und mittels der sFIDA-Technologie ermittelten fäkalen Biomarkern darauf hin, dass periphere Proteinopathien ergänzende Informationen zur zentralen Proteinopathie liefern könnten, die durch etablierte Biomarker nicht vollständig abgebildet werden. Insgesamt unterstreichen diese Befunde, dass die fäkalen Aβ- und Tau-Aggregate nicht als Ersatz für etablierte Biomarker, sondern als komplementäre periphere Biomarker innerhalb multimodaler diagnostischer Ansätze einzuordnen sind.

3.2 Methodische Innovationen zur Detektion peripherer α-Syn-Aggregate in humanen Stuhl- und Urinproben zur Diagnostik von Synucleinopathien

Ergänzend zu den eigenen Untersuchungen zu fäkalen Aβ- und Tau-Aggregaten im Kontext der AD-Pathologie werden im Folgenden weitere diagnostisch relevante Kooperationsprojekte dargestellt, an denen im Rahmen dieser Promotion anteilig mitgewirkt wurde (s. Kapitel 2.3 & s. Kapitel 2.4).

Im Fokus dieser Projekte stand der sFIDA-basierte Nachweis von α-Syn in Stuhl- und Urinproben von PD-, iRBD- Patienten sowie Kontrollprobanden. Da die pathologischen Veränderungen bei PD nicht nur im ZNS auftreten, sondern auch bereits nachweislich die Peripherie betreffen können, stellt der Nachweis von α-Syn in leicht zugänglichen Probenmatrices wie Stuhl und Urin einen vielversprechenden Ansatz für die Biomarker-Entwicklung für PD dar.

3.2.1 Analytische Leistungsbewertung des entwickelten Assays

In der Studie von Schaffrath et al. (s. Kapitel 2.3) wurde die sFIDA-Technologie zunächst auf Stuhlproben adaptiert, um fäkale α-Syn-Aggregate bei PD- sowie iRBD-Patienten und Kontrollprobanden zu quantifizieren. Der durchschnittliche LOD-Wert lag hierbei im subfemtomolaren Bereich bei 0,3 fM und der CV% betrug 28,4%. Analog zu den Assayparametern für den Nachweis von Aβ- und Tau-Aggregaten (s. Kapitel 3.1.4) bezieht sich dieser CV%-Wert auf die Präzision der SiNaPs-basierten Kalibrationsmessung und wurde nicht aus der Streuung der fäkalen Probenkonzentrationen berechnet. Die ermittelten Assayparameter sind daher mit jenen des sFIDA-basierten Nachweises von Aβ- und Tau in Stuhlproben, bei denen ebenfalls ein LOD-Wert im subfemtomolaren Bereich erreicht wurde, vergleichbar. Nach der Optimierung des Assays für den Nachweis von α-Syn-Aggregaten in Stuhlproben wurden in einem Patientenkollektiv von 94 PD-Patienten, 72 iRBD-Patienten sowie 51 Kontrollprobanden die fäkalen α-Syn-Aggregatkonzentrationen ermittelt und die

Ergebnisse anschließend statistisch analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die iRBD-Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden ($p = 0,024$) und PD-Patienten ($p = 1,81 \times 10^{-4}$) signifikant erhöhte fäkale α-Syn-Aggregatkonzentrationen aufwiesen. Hingegen wurde kein signifikanter Unterschied zwischen PD-Patienten und Kontrollprobanden nachgewiesen ($p = 0,291$).

In der darauf aufbauenden Studie von Müller et al. (s. Kapitel 2.4) wurde der sFIDA-basierte Nachweis aggregierter α-Syn-Oligomere auf eine weitere leicht zugängliche Matrix übertragen. Hierbei wurden Urinproben von 93 PD-Patienten, 72 iRBD-Patienten und 52 gesunden Kontrollprobanden untersucht. Auch in dieser Studie wurde eine subfemtomolare Nachweisgrenze von 0,74 fM bestimmt und der mittlere CV%-Wert betrug 19,9%. Im Gegensatz zur Studie von Schaffrath et al. (s. Kapitel 2.3) wurden in dieser Studie sowohl bei den PD-Patienten als auch bei den iRBD-Patienten signifikant ($p < 0,0001$) erhöhte α-Syn-Konzentrationen im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen.

3.2.2 Periphere α-Syn-Oligomere aus Stuhl und Urin als mögliche Biomarker für frühe Synucleinopathien

Die iRBD gilt als einer der stärksten klinischen Prädiktoren für eine PD. In großen longitudinalen Studien wurde gezeigt, dass ein großer Teil der iRBD-Patienten innerhalb von 10-14 Jahren nach der iRBD-Diagnose Synucleinopathien wie PD, DLB oder MSA entwickelt [212]. Vor diesem Hintergrund ist die Detektion erhöhter α-Syn-Konzentrationen bei iRBD-Patienten besonders relevant, da diese bereits in der prodromalen Phase auf eine nachweisbare Pathologie hinweist. Während im Stuhl die höchsten α-Syn-Aggregatkonzentrationen bei den iRBD-Patienten nachgewiesen wurden, wiesen PD-Patienten niedrigere Konzentrationen auf (s. Kapitel 2.3). Im Urin hingegen waren die α-Syn-Aggregatkonzentrationen sowohl in der iRBD- als auch in der PD-Kohorte im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant erhöht, ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Patientenkohorten (s. Kapitel 2.4).

Diese unterschiedlichen Ergebnisse aus beiden Studien deuten darauf hin, dass beide Matrices die Clearance der pathologischen α-Syn-Aggregate in verschiedenen Krankheitsphasen durch unterschiedliche Mechanismen widerspiegeln könnten. Analog zu Aβ und Tau spielen Leber und Niere auch bei der peripheren Clearance von α-Syn eine entscheidende Rolle [213, 214]. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse könnte sein, dass fäkale α-Syn-Aggregate analog zur peripheren Aβ-Clearance vor allem über die Leber in den GI gelangen und schließlich mit dem Stuhl ausgeschieden werden. In Frühphasen der PD, wie der iRBD, könnte diese periphere Clearence zusätzlich verstärkt aktiv sein oder es könnte mit einer vermehrten enterischen Freisetzung begründet werden. Im Gegensatz dazu könnten Aggregate im Urin eher eine systemische bzw. renale Clearance abbilden, indem die α-Syn-

Aggregate aus peripheren Geweben, Blutzellen oder neuronalen Strukturen freigesetzt und anschließend über die Niere ausgeschieden werden [213, 215, 216]. Die iRBD-Kohorte könnte hierbei die *Body-first*-Hypothese repräsentieren, bei der die α-Syn-Pathologie im enterischen oder peripheren Nervensystem beginnt und im Laufe der Erkrankung über den Vagusnerv das ZNS erreicht [53]. Diese Interpretation wird durch Studien unterstützt, die eine periphere α-Syn-Pathologie bereits in iRBD-Patienten nachweisen konnten [217, 218].

In einer dieser Studien wurde phosphoryliertes α-Syn in Nervenfasern und Ganglien der Kolonsubmukosa bei iRBD-Patienten immunhistochemisch nachgewiesen [217]. Ähnlich wie in der Studie von Schaffrath et al. (s. Kapitel 2.3) zeigte sich hierbei ein übereinstimmendes Muster, da auch hier erhöhte Werte bei iRBD-Patienten detektiert wurden, während sich PD-Patienten nicht signifikant von den Kontrollen unterschieden. Auch wenn hierbei ein direkter methodischer Vergleich aufgrund unterschiedlicher Nachweisverfahren nicht möglich ist und sich die detektierten Proteine sowie die biologischen Proben unterschieden, unterstreichen diese Ergebnisse das Vorhandensein einer peripheren α-Syn-Pathophysiologie in Frühphasen der Erkrankung [217]. In einer anderen multimodalen Bildgebungsstudie von Horsager et al. wurden Patienten mit iRBD sowie PD-Patienten mit und ohne iRBD untersucht. Hierbei dienten Myokardszintigraphie und kolonale Donepezil-Signale als Marker für periphere autonome Dysfunktionen, während F-Dopa Aufnahme als Marker für zentrale dopaminerge Degeneration verwendet wurde. iRBD-Patienten und PD-Patienten mit iRBD zeigten hierbei vor allem periphere autonome Veränderungen und wiesen somit einen *Body-first*-Verlauf auf, während PD-Patienten ohne iRBD primär einem *Brain-First*-Verlauf entsprachen. Hierbei wurde der fehlende Unterschied zwischen den PD-Patienten und den Kontrollprobanden anhand Heterogenität der PD-Kohorte erklärt, da diese sowohl *Body-First*- als auch *Brain-first*-Subtypen umfassen kann. Dadurch könnte eine nachweisbare enterische Pathologie in der PD-Kohorte abgeschwächt worden sein [218]. Die Ergebnisse der sFIDA-Messungen der α-Syn-Aggregate in Stuhlproben ergänzen diese Befunde auf molekularer Ebene und unterstützen somit die Annahme, dass eine α-Syn-Proteinopathie bereits in Frühstadien in der Peripherie nachweisbar ist. Außerdem könnte die Heterogenität der PD-Kohorte hierbei ebenfalls eine Ursache für die fehlende Signifikanz im Vergleich zu Kontrollen sein.

Die Studienergebnisse von Müller et al. (s. Kapitel 2.4) werden durch frühere Befunde von Nam et al. unterstützt, in denen ebenfalls α-Syn-Aggregate in zehnfach konzentrierten Urinproben von PD-Patienten nachgewiesen wurden. Hierbei wurde gezeigt, dass bestimmte aggregationsassoziierte α-Syn-Spezies in den Urinproben der PD-Patienten signifikant erhöht waren gegenüber den Kontrollen [219]. Der Ursprung der α-syn-Aggregate im Urin sowie die zugrunde liegenden Ausscheidungsmechanismen sind bislang unklar. Die Studie von Yuan et al. konnte jedoch zeigen, dass die Niere unter physiologischen Bedingungen zirkulierendes α-Syn aus dem Blut filtriert und dort abbaut. Bei reduzierter Nierenfunktion war diese periphere

Clearance-Kapazität im Mausmodell ebenfalls reduziert, was eine verstärkte Akkumulation pathologischer α-Syn-Aggregate in der Niere und im Gehirn verursachte. Zudem wurde berichtet, dass eine niedrige glomeruläre Filtrationsrate mit einer höheren PD-Inzidenz assoziiert ist [213]. Da in der Studie von Müller et al. (s. Kapitel 2.4) keine Nierenfunktionsparameter erhoben wurden, lässt sich nicht ausschließen, dass eine klinische renale Dysfunktion die ermittelten α-Syn-Aggregatkonzentrationen im Urin beeinflusst haben könnte. Ob und inwiefern eine frühe renale Beteiligung im Kontext eines *Body-first*-Verlaufs zum Anstieg der α-Syn-Konzentrationen im Urin sowohl in der iRBD- als auch in der PD-Kohorte beiträgt, bleibt unklar.

Die Aussagekraft dieser Befunde wurde durch eine ergänzende Stellungnahme von Müller et al. (s. Kapitel 2.5) zusätzlich gestützt. Hierbei wurden mögliche Einflussfaktoren wie das Alter und das Geschlecht berücksichtigt. Anhand einer Subgruppenanalyse der über 50-jährigen gesunden Kontrollprobanden (64,4 ± 7,6 Jahre), PD-Patienten (64,3 ± 9,7 Jahre) sowie iRBD-Patienten (66,3 ± 6,4 Jahre) konnte gezeigt werden, dass die signifikante Erhöhung der α-Syn-Aggregatkonzentrationen im Urin nicht allein auf altersbedingte Unterschiede zurückzuführen ist. Zudem blieb die statistische Signifikanz bei einer geschlechtspezifischen Analyse erhalten, wobei bei männlichen Patienten sowohl die PD-Kohorte (14,3 fM, $p < 0,01$) als auch die iRBD-Kohorte (13,5 fM, $p < 0,05$) signifikant höhere Werte als die männliche Kontrollgruppe (7,2 fM) aufwiesen. Bei den weiblichen Patienten war der Unterschied sogar noch deutlicher ausgeprägt, mit hochsignifikant erhöhten Werten in der PD-Kohorte (11,5 fM, $p < 0,001$) und der iRBD-Kohorte (14,4 fM, $p < 0,01$) im Vergleich zu den weiblichen Kontrollen (7,2 fM).

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse beider Studien, dass der sFIDA-basierte Nachweis von pathologischen α-Syn-Aggregaten in leicht zugänglichen nicht-invasiv gewonnenen Proben wie Stuhl und Urin möglich ist. Zudem besitzt dieser Ansatz das Potenzial, die Proteinopathie nicht nur nach dem Auftreten der typischen klinischen Symptome der PD, sondern bereits in prodromalen Phasen der Erkrankung widerzuspiegeln.

3.3 Entwicklung eines innovativen Moleküls zur Detektion pathologischer amyloidogener Proteinaggregate

Neben dem in dieser Arbeit im Vordergrund stehenden sFIDA-basierten Nachweis von krankheitsassoziierten Aβ- und Tau-Aggregaten in Stuhlproben, wurde im Rahmen dieser Promotion anteilig an einem weiteren, ergänzenden Kooperationsprojekt mitgewirkt. Dieses Projekt zielte auf die Entwicklung eines innovativen Moleküls zur Detektion pathologischer, amyloidogener Proteinaggregate ab. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Studien, in denen vor allem die sFIDA-basierte quantitative Detektion von Aggregaten in peripheren Körperflüssigkeiten im Fokus stand, wurden in der Arbeit von Weber et al. (s. Kapitel 2.6) die Entwicklung eines biotinylierten, Pittsburgh Compound B (PiB)-ähnlichen Capture-Moleküls,

cCAP-1 sowie dessen Eignung für den aggregatspezifischen Nachweis untersucht. Da der eigene Beitrag zu dieser Arbeit nicht die chemische Synthese, sondern die biochemische Validierung des Moleküls umfasste, konzentriert sich die nachfolgende Diskussion auf dessen mögliche Anwendbarkeit als Capture-Molekül im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen.

Wie zuvor beschrieben (s. Kapitel 1.4), stellt die Diagnose von Synucleinopathien sowie anderer neurodegenerativer Erkrankungen nach wie vor eine der zentralen Herausforderungen der modernen Neurologie dar. Während etablierte PET-Verfahren mit dem PiB in der Neurologie ein effizientes bildgebendes Verfahren zur Detektion von Proteinopathien im Gehirn darstellen, sind sie nur eingeschränkt einsetzbar (s. Kapitel 1.4.1). Vor diesem Hintergrund demonstriert die Arbeit von Weber et al. die Entwicklung eines biotinylierten, verzweigten Fangmoleküls, das ein PiB-ähnliches, amyloidbindendes Motiv besitzt. PiB ist ein neutrales Derivat von Thioflavin T (ThT) und ein radioaktiv markierter fluoreszierender PET-Tracer, der spezifisch an fibrilläre β-Faltblattstrukturen amyloidogener Proteine bindet und somit die *in vivo* Darstellung entsprechender Proteinablagerungen in den untersuchten Hirnregionen ermöglicht [139, 220]. Amyloidogene Proteine konnten jedoch nicht nur im Gehirn, sondern auch im CSF, Blut, Stuhl und in weiteren Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden [139, 141, 221], (Kapitel 2.1). Daher ist es von Bedeutung, alternative, leichter zugängliche Diagnostikverfahren zu etablieren. Das von Weber et al. entwickelte Fangmolekül cCAP-1 stellt ein vielversprechendes chemisches Molekül für die Detektion pathologischer Amyloide dar. Das diagnostische Hauptmerkmal von cCAP-1 basiert auf einer bivalenten, Y-förmigen Struktur, bei der zwei N-methylierte PiB-Analoga über ein verzweigtes, flexibles Polyethylenglykol (PEG)-Linkergerüst mit einer zentralen Biotin-Einheit verknüpft sind. Das verzweigte PEG-Linkergerüst fungiert hierbei als molekularer Abstandhalter und gewährleistet, dass beide PiB-Analoga sterisch ungehindert mit den β-Faltblättern interagieren können. Benzothiazol-basierte Sonden (wie ThT oder PiB-Analoga) zeigen bei der Interaktion mit Amyloidfibrillen eine charakteristische Fluoreszenzverstärkung, die sowohl für bildgebende Verfahren als auch für die quantitative Bestimmung von Fibrillen einsetzbar ist [222].

Im Rahmen der biochemischen Validierung konnte gezeigt werden, dass cCAP-1 bei Bindung an *in vitro* generierte α-Syn-Aggregate eine 2,9-fache Verstärkung des Fluoreszenzsignals bei einem Stokes-Shift von 52 nm aufweist. Fluoreszenzmessungen mit steigenden Konzentrationen von cCAP-1 (0-200 nM) zeigten in Gegenwart von 10 µM α-Syn-Aggregaten einen linearen Zusammenhang zwischen der cCAP-1-Konzentration und der Aggregatbindung. Diese Ergebnisse stimmen grundsätzlich mit den Ergebnissen von Rodrigues et al. überein, die für das ursprüngliche CAP-1 ebenfalls einen linearen Anstieg des Fluoreszenzsignals im Bereich von 0-200 nM und damit eine gute Löslichkeit des Moleküls nachwiesen. Sowohl CAP-1 als auch cCAP-1 zeigten eine vergleichbare, etwa 3-fache Fluoreszenzverstärkung bei Bindung an Aggregate [223]. CAP-1 kombiniert die chemischen

Eigenschaften von ThT und PiB, indem es die optischen Eigenschaften von ThT und die Bindungsaffinität von PiB an Amyloide kombiniert [223]. Der wesentliche Unterschied zwischen CAP-1 und cCAP-1 liegt primär in deren Synthesestrategie. Während CAP-1 die ursprüngliche, auf klassischer Amidkopplung basierende Struktur beschreibt, stellt cCAP-1 eine prozessoptimierte Weiterentwicklung dar. Bei dieser Variante werden die PiB-Analoga erst im finalen Syntheseschritt mittels Click-Chemie an zentrales Biotin-PEG-Gerüst gekoppelt. Dieser modulare Ansatz macht die Herstellung nicht nur effizienter, sondern erlaubt auch eine Adaption an verschiedene Zielmoleküle (s. Kapitel 2.6).

Außerdem kann cCAP-1 durch die Biotinylierung gezielt an Streptavidin-beschichtete Oberflächen, wie Mikrotiterplatten oder Magnetkügelchen, binden und somit aggregierte Proteine aus biologischen Proben isolieren. Hierzu wurde in einem indirekten ELISA gezeigt, dass die Inkubation von 0,34 µM α-Syn-Aggregaten mit 10 µM cCAP-1 zu einer 58% Steigerung der Aggregatbindung an Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten führte. Diese Ergebnisse belegen die Eignung des cCAP-1-Moleküls für fluoreszenzbasierte Nachweisverfahren (s. Anhang 5.3, Figure S2).

Zusammenfassend bietet cCAP-1 durch die Kombination einer strukturspezifischen PiB-Sonde mit der hochaffinen Biotin-Streptavidin-Bindung einen vielversprechenden Ansatz für die Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen. Die beobachtete Fluoreszenzverstärkung und die selektive Anreicherung der Zielproteine auf streptavidinbeschichteten Oberflächen unterstreichen das Potenzial von cCAP-1 für amyloidbasierte diagnostische Verfahren. Für eine zukünftige diagnostische Anwendung sind jedoch weitere Untersuchungen in komplexen Körperflüssigkeiten sowie mit verschiedenen amyloidogenen Proteine erforderlich.

3.4 Innovative therapeutische Ansätze zur gezielten Modulation proteinopathischer Prozesse bei PD

Die präzise und frühzeitige Diagnose ist eine zentrale Voraussetzung für den gezielten Einsatz krankheitsmodifizierender Therapien, da diese nur bei zuverlässig identifizierter Pathologie oder bei bestehendem Risiko eingesetzt werden können. Die Diagnose neurodegenerativer Erkrankungen ist jedoch, wie in Kapitel 1.4 beschrieben, nicht ausreichend effizient und wird erst nach dem Auftreten klinischer Symptome beziehungsweise nach einer erheblichen Hirnschädigung gestellt [63, 132]. Im Kontext der PD erfolgt die klinische Diagnose meist nach der Manifestation motorischer Symptome, die auf einen bereits fortgeschrittenen Verlust dopaminerger Neurone zurückzuführen sind [109], weshalb rein symptomatische Therapieansätze zu diesem Zeitpunkt die Neurodegeneration nicht mehr aufhalten können. Vor diesem Hintergrund verschiebt sich der Fokus der therapeutischen Forschung unter anderem auf die präventive beziehungsweise prophylaktische Immunisierung zur Unterdrückung der klinischen Manifestation der Proteinopathien.

Dieser Abschnitt stellt zwei Studien vor, zu denen im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls anteilig beigetragen wurde, und erweitert damit das wissenschaftliche Spektrum über innovative diagnostische Ansätze hinaus auf therapeutische Innovationen. Beide Studien (s. Kapitel 2.7 & s. Kapitel 2.8) bauen konzeptionell aufeinander auf und verfolgen einen strukturbasierten immuntherapeutischen Ansatz. Wie zuvor im Kapitel 1.2.3 erläutert, ist α-Syn ein physiologisches Protein, das unter pathologischen Umständen eine tiefgreifende Konformationsänderung durchläuft, wodurch toxische Oligomere, Fibrillen und letztendlich Aggregate entstehen, die sich von Zelle zu Zelle übertragen können [95]. Da α-Syn jedoch ein endogenes Protein ist, wird eine gegen α-Syn gerichtete Immunreaktion unter physiologischen Bedingungen durch Mechanismen der immunologischen Toleranz verhindert. Ziel aktiver Immunisierungsstrategien ist es daher, diese Immuntoleranz gegenüber krankheitsrelevanten Proteinen zu überwinden und durch Verabreichung eines geeigneten Antigens eine spezifische, gegen pathologische Konformationen gerichtete Immunantwort zu induzieren [224, 225].

Die beiden hier diskutierten Studien (s. Kapitel 2.7 & s. Kapitel 2.8) validieren in komplementären Projekten den therapeutischen Nutzen komformationsspezifischer Impfstoffe in einem Mausmodell für PD. Hierbei wurden vier Impfstoffe eingesetzt, die auf Basis des Prionproteins HET-s des Pilzes *Podospora anserina* [226] strukturell so verändert wurden, dass sie die Konformation pathologischer α-Syn-Fibrillen nachahmen. Durch gezielte Mutagenese wurden Aminosäurereste des humanen α-Syn, die nur in der fibrillären Konformation Oberflächen-Epitope bilden, in HET-s (218-289) eingeführt. Daraus ergaben sich die Impfstoffkandidaten α-SC3, α-SC6, α-SC8 und α-SC9.

Zur Überprüfung der biologischen Sicherheit und zum Ausschluss einer durch konformationell veränderte HET-s Impfstoffkandidaten ausgelösten Aggregation von endogenem α-Syn wurden RT-QuIC (engl.: *Real-Time Quaking Induced Conversion*) Experimente durchgeführt. Das Funktionsprinzip dieses *Seeding*-Assays beruht darauf, dass bereits geringste Mengen fehlgefalteter, *seeding*-aktiver Proteine in einer Probe die Aggregation eines im Überschuss vorliegenden rekombinanten Substratproteins auslösen können. Im Falle einer solchen *seed*-induzierten Aggregation entstehen β-faltblattreiche Fibrillen, an die der Fluoreszenzfarbstoff ThT bindet. Die resultierende Zunahme des Fluoreszenzsignals ermöglicht die Quantifizierung der Aggregationskinetik in Echtzeit [132, 227, 228]. In den durchgeführten Experimenten wurden die HET-s-Impfkandidaten mit monomerem α-Syn inkubiert. Dabei zeigte sich, dass keiner der vier Impfkandidaten eine *Seeding*-Reaktion des rekombinanten α-Syn-Substrats induzierte. Diese Ergebnisse belegen, dass die untersuchten Impfstoffkandidaten keine *Seeding* auslösen und somit hinsichtlich dieses spezifischen Sicherheitsaspekts als biologisch sicher einzustufen sind (s. Anhang 5.4).

In der Überlebensstudie von Pesch et al. (s. Kapitel 2.7) wurde primär das protektive Potenzial des kombinierten Einsatzes aller vier Impfstoffkandidaten im TgM83$^{+/-}$-Mausmodell getestet. Diese Studie umfasste drei Modelle, ein *Brain-first*-Modell (intrazerebrale Injektion) und zwei *Body-first*-Modelle (intraperitoneale und intragastrale Injektion). Nach der zentralen und peripheren Injektion von humanen α-Syn-Fibrillen zeigte sich bei den vakzinierten Versuchstieren im *Brain-first*-Modell eine Verlängerung der medianen Überlebensdauer um 8%. In den *Body-first*-Modellen konnte hingegen eine signifikante Verlängerung der Überlebensdauer um 22% für die intraperitoneal sowie um 21% für die intragastrisch injizierten Versuchstiere im Vergleich zu den nicht vakzinierten Kontrolltieren erzielt werden.
Aufbauend auf diesen Ergebnissen von Pesch et al. untersuchten Ma et al. (s. Kapitel 2.8) im gleichen Mausmodell alle vier Impfstoffkandidaten einzeln und in einer vervierfachten Dosierung. Ziel dieses monovalenten Ansatzes war es zu identifizieren, ob das protektive Potenzial der einzelnen Impfstoffe ohne unerwünschte Wechselwirkungen der Kandidaten gesteigert werden kann. Hierbei wurden Versuchstiere entweder monovalent mit den vier Impfkandidaten oder mit dem unmodifizierten HET-s Grundgerüst immunisiert und anschließend intraperitoneal oder intragastrisch mit α-Syn-Fibrillen injiziert. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass alle Einzelkandidaten grundsätzlich eine protektive Wirkung vermitteln konnten, deren Schutzstärke jedoch in Abhängigkeit vom jeweiligen Impfstoffkandidaten und vom Injektionsort der α-Syn-Fibrillen variierte. Bei interperitoneal injizierten Versuchstieren zeigte α-SC6 mit einer Verlängerung der Überlebensdauer um 38% die stärkste Wirkung, während im intragastrischen Modell α-SC8 und α-SC9 mit einer Überlebensverlängerung von 42% bzw. 39% die wirksamsten Impfstoffkandidaten darstellten. Im Vergleich zu der Studie von Pesch et al. deuteten diese Ergebnisse insgesamt darauf hin, dass eine monovalente Immunisierung bei vierfacher Dosierung die Schutzwirkung in peripheren *Body-first*-Modellen steigern kann. Hierbei könnten sowohl Dosiseffekte als auch eine verringerte immunologische Interferenz zwischen den verschiedenen Antigenen als mögliche Erklärung dienen.
Interessanterweise wurde auch für unmodifizierte HET-s-Fibrillen bei intragastrisch injizierten Versuchstieren eine signifikante Schutzwirkung mit einer Überlebensverlängerung von 37% ermittelt, die mit den Effekten des modifizierten Impfstoffkandidaten α-SC3 vergleichbar war. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse ist, dass bestimmte Serinreste im HET-s Grundgerüst über β-Stränge hinweg ein konformationelles Epitop bilden, das strukturell überlappenden Muster in α-Syn-Fibrillen entspricht und dadurch eine Immunantwort induziert [229]. Diese Interpretation wird durch eine weitere Studie gestützt, in der die Immunisierung mit einem β-faltblattreichen, nicht-endogenen Peptid kreuzreaktive Immunantworten auslöste, die pathologische Oligomere aus AD-, PD- und Prion-Erkrankungen erkannten [230].

Neben der Überlebensdauer wurde auch die Progression der neurologischen Symptome untersucht. Sowohl in *Body-first*- als auch in *Brain-first*-Modellen konnten in beiden Studien für alle vier Impfstoffe sowie HET-s bei immunisierten Versuchstieren signifikant bessere motorische Fähigkeiten und eine länger anhaltende Gewichtszunahme nachgewiesen werden. Zudem wurde in beiden Studien immunologisch nachgewiesen, dass sowohl die quadrivalente als auch die monovalente Vakzinierung eine robuste Antikörperantwort im Mausmodell induziert. Während mittels Standard-ELISA die progressive Zunahme von Antikörpertitern gegen die verwendeten Impfstoff-Antigene sowie deren Kreuzreaktivität gegenüber synthetischen α-Syn-Fibrillen gezeigt wurde, diente ein kompetitiver ELISA dazu, die spezifische Bindung dieser Antikörper an pathologische α-Syn-Aggregate in humanen Hirnhomogenaten von DLB-, MSA- und PD-Patienten zu validieren.

Im Vergleich zu peptidbasierten, aktiven Immunisierungsstrategien wie dem Impfstoff UB-312, der ein lineares, C-terminales Sequenzepitop von α-Syn verwendet, besitzen die hier diskutierten, konformationsspezifischen HET-s-basierten Impfstoffkandidaten den Vorteil, ausschließlich fibrilläre Oberflächenepitope zu adressieren und somit unerwünschte Immunreaktionen gegen endogene α-Syn-Monomere zu vermeiden. Beide Strategien schützen die motorische Funktion und verzögern die α-Syn-Proteinopathie. Die UB-312-Immuntherapie reduziert zudem die α-Syn-Belastung und die enterische Aktivierung der Gliazellen im Kolon [231]. Diese Ergebnisse sind für die hier diskutierten *Body-first*-Modelle von Pesch et al. und Ma et al. mit HET-s-basierten Impfstoffkandidaten besonders relevant, da die intragastrische Injektion von Fibrillen die initiale Entstehung der Proteinopathie nachbildet.

Insgesamt weisen diese Befunde aus beiden Studien gemeinsam darauf hin, dass HET-s-basierte, konformationsspezifische Impfstoffkandidaten vor allem prophylaktisch relevant sein könnten, insbesondere für Individuen mit einem erhöhten Risiko für eine periphere α-Syn-Proteinopathie. Da eine α-Syn-Proteinopathie nicht PD spezifisch ist, könnten auch Patienten mit anderen Synucleinopathien, wie DLB oder MSA, stark von aktiven α-Syn-Immunisierunsstrategien profitieren.

4 Ausblick

Angesicht der steigenden Prävalenz neurodegenerativer Erkrankungen und deren veränderte biologische Konzeptualisierung rückte der Fokus der Forschung in den letzten Jahren vermehrt auf Biomarker-Proteine, die mit innovativen Diagnosemethoden in leicht zugänglichen Körperflüssigkeiten quantifiziert werden können. Vor diesem Hintergrund wurde der Fokus dieser vorliegenden Arbeit auf den Nachweis AD-assoziierter, pathologischer Aβ- und Tau-Oligomere in nicht-invasiv gewonnenen Stuhlproben gelegt.
Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass sowohl Aβ- als auch Tau-Oligomere in humanen Stuhlproben mittels sFIDA-Technologie zuverlässig im subfemtomolaren Konzentrationsbereich nachweisbar sind. Außerdem zeigen die Unterschiede zwischen etablierten CSF-basierten AT(N)-Biomarkern und mittels sFIDA-Technologie ermittelten fäkalen Biomarkern, dass periphere Proteionopathien komplementäre pathophysiologische Informationen liefern könnten, die durch zentrale Biomarker allein nicht vollständig erfasst werden. Insgesamt unterstreichen diese Befunde, dass fäkale Aβ- und Tau-Aggregate nicht als Ersatz für etablierte Biomarker, sondern als komplementäre periphere Biomarker innerhalb multimodaler diagnostischer Ansätze einzuordnen sind. Für zukünftige klinische Diagnostik und die Medikamentenentwicklung eröffnen diese Ergebnisse vielversprechende Perspektiven, die in nachfolgenden Validierungsstudien systematisch untersucht werden sollten. Hierbei sollte der Fokus primär darauf liegen, das diagnostische Potenzial der mittels sFIDA-Technologie ermittelten fäkalen Biomarker in großen, prospektiven und longitudinalen Studien zu überprüfen. Um die sFIDA-Technologie als ein nicht-invasives *Screening*-Instrument für diagnostische Zwecke zu etablieren, sollten zudem Veränderungen der fäkalen Aggregatkonzentrationen bereits in präklinischen Phasen in Kombination mit Blutwerten, Leberfunktionen, Ernährungsgewohnheiten und der Darmmikrobiota sowie weiterer gastrointestinaler Funktionen der Patienten multimodular untersucht werden.

Ergänzend wurde im Rahmen von Kooperationsprojekten dieser Arbeit gezeigt, dass die sFIDA-Technologie auch für den subfemtomolaren Nachweis pathologischer α-Syn-Aggregate in Stuhl- und Urin-Proben eingesetzt werden kann. Zudem wurde ermittelt, dass bei iRBD-Patienten sowohl im Urin als auch im Stuhl α-Syn-Aggregatkonzentrationen erhöht waren, während die fäkalen α-Syn-Aggregatkonzentrationen bei PD-Patienten nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe zu unterscheiden waren. Weitere Untersuchungen könnten neue Perspektiven für ein erweitertes Verständnis bezüglich der peripheren Clearance der α-Syn-Aggregate eröffnen und die *Body-first*-Hypothese unterstreichen. Hierbei sollen ebenfalls verschiedene Faktoren, unter anderem gastrointestinale sowie renale Funktionen, in Korrelationsstudien in Betracht gezogen werden. Diese Ergebnisse belegen, dass die periphere Proteinopathie mittels sFIDA-Technologie bereits in der prodromalen Phase der PD,

wie bei Patienten mit iRBD, sensitiv detektiert werden kann. Darüber hinaus könnten zukünftige Projekte anbieten, die sFIDA-Technologie als prädiktives Instrument zur Risiko- und Konversionsabschätzung bei iRBD zu validieren und kombinierte Biomarker-Assays für differenzialdiagnostische Zwecke bei Mischpathologien zu entwickeln.
Einen komplementären, diagnostischen Ansatz stellt das Capture-Molekül cCAP-1 dar, das durch die Kombination einer strukturspezifischen PiB-Sonde mit einer hochaffinen Biotin-Streptavidin-Bindung eine selektive Fluoreszenzverstärkung und die Isolierung von Proteinaggregaten ermöglicht. Für einen effizienten Einsatz in der Diagnostik neurodegenerativer Erkrankungen sind jedoch weiterführende Validierungen in komplexen Körperflüssigkeiten erforderlich, um potenzielle Matrixeffekte auszuschließen. Zudem sollten zukünftig die Bindungsaffinitäten des cCAP-Moleküls gegenüber verschiedenen amyloidogenen Proteinen untersucht werden, um das Einsatzspektrum und das diagnostische Potenzial von cCAP-1 vollständig zu evaluieren.

Ergänzend zu den diagnostischen Schwerpunkten dieser Arbeit liefern die im Rahmen eines begleitenden Teilprojekts untersuchten therapeutischen Ansätze wichtige Ergebnisse für zukünftige, krankheitsmodifizierende Strategien. Die Befunde zeigten, dass konformationsspezifische, HET-s-basierte Impfstoffkandidaten eine vielversprechende Innovation für die prophylaktische Behandlung von Synucleinopathien wie PD, DLB und MSA darstellen könnten. Diese Impfstoffkandidaten können eine gezielte Immunantwort gegen pathologische α-Syn-Aggregate auslösen und somit den Krankheitsverlauf verzögern. Da jedoch die verwendeten Epitope von synthetischen α-Syn-Aggregaten abgeleitet wurden, können diese sich strukturell von nativen Aggregaten im Körper unterscheiden. Eine Folgestrategie, die gezielt auf *ex vivo*-Strukturen aufbaut, könnte somit eine präzisere Erkennung der Proteinopathien im Zielgewebe ermöglichen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aggregation amyloidogener Proteine 10

Abbildung 2: Schematische Darstellung der proteolytischen Spaltung von APP 11

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Tau-Aggregation bei der AD 16

Abbildung 4: Schematische Darstellung der α-Syn-Domänen und der membrangebundenen Struktur.....19

Abbildung 5: Etablierte Biomarker und AT(N)-Klassifizierung der AD 28

Abbildung 6: Funktionsprinzip des sFIDA-Assays zur Detektion von Proteinaggregaten 35

Abbildung 7: Schematischer Aufbau der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie für Einzelpartikel-Analyse 38

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Symptomatische Klassifizierung der AD-Krankheitsstadien 29

Tabelle 2: Stadieneinteilung der PD nach Hoehn & Yahr.....30

Tabelle 3: Übersicht der klinischen Bewertungsskala MDS-UPDRS.....31

Literaturverzeichnis

[1] Pathak N, Vimal SK, Tandon I, et al. Neurodegenerative Disorders of Alzheimer, Parkinsonism, Amyotrophic Lateral Sclerosis and Multiple Sclerosis: An Early Diagnostic Approach for Precision Treatment. *Metab Brain Dis* 2022; 37: 67–104.

[2] Alkhammash A, Alotaibi G. Epigenetic reprogramming as a therapeutic strategy for neurodegenerative diseases: A complex and novel approach. *Eur J Pharmacol* 2025; 1002: 177853.

[3] Dugger BN, Dickson DW. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017; 9: a028035.

[4] Kovacs G. Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 189.

[5] Serafín V, Gamella M, Pedrero M, et al. Enlightening the advancements in electrochemical bioanalysis for the diagnosis of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *J Pharm Biomed Anal* 2020; 189: 113437.

[6] Feigin VL, Vos T, Nichols E, et al. The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. *Lancet Neurol* 2020; 19: 255–265.

[7] Cheslow L, Snook AE, Waldman SA. Biomarkers for Managing Neurodegenerative Diseases. *Biomolecules* 2024; 14: 398.

[8] Peplow PV, Martinez B, Gennarelli TA. Prevalence, Needs, Strategies, and Risk Factors for Neurodegenerative Diseases. In: Peplow PV, Martinez B, Gennarelli TA (eds) *Neurodegenerative Diseases Biomarkers*. New York, NY: Springer US, pp. 3–8.

[9] Wang J, Dai L, Zhang Z. Protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Chin Med J (Engl)* 2025; 138: 2753–2768.

[10] World Health Organization. Global action plan on the public health response to dementia 2017 - 2025, https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/2098e5be-c7f3-4365-aebf-36204459794f/content (2017).

[11] Lamptey RNL, Chaulagain B, Trivedi R, et al. A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 1851.

[12] Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2019 Attitudes to dementia, https://www.alzint.org/u/WorldAlzheimerReport2019.pdf (2019).

[13] Zhang X-X, Tian Y, Wang Z-T, et al. The Epidemiology of Alzheimer's Disease Modifiable Risk Factors and Prevention. *J Prev Alzheimers Dis* 2021; 8: 313–321.

[14] Alzheimer's Association. Alzheimer's Disease Facts and Figures, https://www.alz.org/getmedia/ef8f48f9-ad36-48ea-87f9-b74034635c1e/alzheimers-facts-and-figures.pdf (2026).

[15] d'Abramo C, D'Adamio L, Giliberto L. Significance of Blood and Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease: Sensitivity, Specificity and Potential for Clinical Use. *J Pers Med* 2020; 10: 116.

[16] Bastin C, Salmon E. Early neuropsychological detection of Alzheimer's disease. *Eur J Clin Nutr* 2014; 68: 1192–1199.

[17] Hippius H, Neundörfer G. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci* 2003; 5: 101–108.

[18] Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 120: 885–890.

[19] Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, et al. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83: 4913–4917.

[20] Trejo-Lopez JA, Yachnis AT, Prokop S. Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* 2022; 19: 173–185.

[21] Hampel H, Hardy J, Blennow K, et al. The Amyloid-β Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry* 2021; 26: 5481–5503.

[22] Yin X, Qiu Y, Zhao C, et al. The Role of Amyloid-Beta and Tau in the Early Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Med Sci Monit*; 27. Epub ahead of print 4 June 2021. DOI: 10.12659/MSM.933084.

[23] Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, et al. Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 4012–4017.

[24] Mroczko B, Groblewska M, Litman-Zawadzka A, et al. Amyloid β oligomers (AβOs) in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2018; 125: 177–191.

[25] Singh D. Astrocytic and microglial cells as the modulators of neuroinflammation in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 2022; 19: 206.

[26] De Felice FG, Wu D, Lambert MP, et al. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by Aβ oligomers. *Neurobiol Aging* 2008; 29: 1334–1347.

[27] Almeida ZL, Vaz DC, Brito RMM. Morphological and Molecular Profiling of Amyloid-β Species in Alzheimer's Pathogenesis. *Mol Neurobiol* 2025; 62: 4391–4419.

[28] Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, et al. Alzheimer's disease. *The Lancet* 2016; 388: 505–517.

[29] Livingston G, Huntley J, Liu KY, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2024 report of the Lancet standing Commission. *The Lancet* 2024; 404: 572–628.

[30] Kowalski K, Mulak A. Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease. *J Neurogastroenterol Motil* 2019; 25: 48–60.

[31] Ullah R, Park TJ, Huang X, et al. Abnormal amyloid beta metabolism in systemic abnormalities and Alzheimer's pathology: Insights and therapeutic approaches from periphery. *Ageing Res Rev* 2021; 71: 101451.

[32] Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primer* 2021; 7: 33.

[33] Jack CR, Bennett DA, Blennow K, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2018; 14: 535–562.

[34] Emin D, Zhang YP, Lobanova E, et al. Small soluble α-synuclein aggregates are the toxic species in Parkinson's disease. *Nat Commun* 2022; 13: 5512.

[35] Su D, Cui Y, He C, et al. Projections for prevalence of Parkinson's disease and its driving factors in 195 countries and territories to 2050: modelling study of Global Burden of Disease Study 2021. *BMJ* 2025; 388: e080952.

[36] Luo Y, Qiao L, Li M, et al. Global, regional, national epidemiology and trends of Parkinson's disease from 1990 to 2021: findings from the Global Burden of Disease Study 2021. *Front Aging Neurosci* 2025; 16: 1498756.

[37] Costa HN, Esteves AR, Empadinhas N, et al. Parkinson's Disease: A Multisystem Disorder. *Neurosci Bull* 2023; 39: 113–124.

[38] Parkinson J. An Essay on the Shaking Palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2002; 14: 223–236.

[39] Holdorff B, Rodrigues E Silva AM, Dodel R. Centenary of Lewy bodies (1912–2012). *J Neural Transm* 2013; 120: 509–516.

[40] Postuma RB, Berg D. Advances in markers of prodromal Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 2016; 12: 622–634.

[41] Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM-Y, et al. α-Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997; 388: 839–840.

[42] Braak H, Tredici KD, Rüb U, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 197–211.

[43] Meles SK, Renken RJ, Janzen A, et al. The Metabolic Pattern of Idiopathic REM Sleep Behavior Disorder Reflects Early-Stage Parkinson Disease. *J Nucl Med* 2018; 59: 1437–1444.

[44] Visanji NP, Brooks PL, Hazrati L-N, et al. The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future. *Acta Neuropathol Commun* 2013; 1: 2.

[45] Choong C, Mochizuki H. Neuropathology of α-synuclein in Parkinson's disease. *Neuropathology* 2022; 42: 93–103.

[46] Poirier A-A, Aubé B, Côté M, et al. Gastrointestinal Dysfunctions in Parkinson's Disease: Symptoms and Treatments. *Park Dis* 2016; 2016: 1–23.

[47] Han MN, Finkelstein DI, McQuade RM, et al. Gastrointestinal Dysfunction in Parkinson's Disease: Current and Potential Therapeutics. *J Pers Med* 2022; 12: 144.

[48] Van Der Perren A, Gelders G, Fenyi A, et al. The structural differences between patient-derived α-synuclein strains dictate characteristics of Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol (Berl)* 2020; 139: 977–1000.

[49] Halliday GM, Holton JL, Revesz T, et al. Neuropathology underlying clinical variability in patients with synucleinopathies. *Acta Neuropathol (Berl)* 2011; 122: 187–204.

[50] Poewe W, Seppi K, Tanner CM, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primer* 2017; 3: 17013.

[51] Chen Z, Chen S, Liu J. The role of T cells in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2018; 169: 1–23.

[52] Nishioka K, Imai Y, Yoshino H, et al. Clinical Manifestations and Molecular Backgrounds of Parkinson's Disease Regarding Genes Identified From Familial and Population Studies. *Front Neurol* 2022; 13: 764917.

[53] Borghammer P, Van Den Berge N. Brain-First versus Gut-First Parkinson's Disease: A Hypothesis. *J Park Dis*; 9. Epub ahead of print 8 October 2019. DOI: 10.3233/JPD-191721.

[54] Braak H, De Vos RAI, Bohl J, et al. Gastric α-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 2006; 396: 67–72.

[55] Arotcarena M-L, Dovero S, Prigent A, et al. Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of synucleinopathy in non-human primates. *Brain* 2020; 143: 1462–1475.

[56] Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007; 33: 599–614.

[57] Holmqvist S, Chutna O, Bousset L, et al. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol (Berl)* 2014; 128: 805–820.

[58] Uemura N, Yagi H, Uemura MT, et al. Inoculation of α-synuclein preformed fibrils into the mouse gastrointestinal tract induces Lewy body-like aggregates in the brainstem via the vagus nerve. *Mol Neurodegener* 2018; 13: 21.

[59] Johnson JT, Awosiminiala FW, Anumudu CK. Exploring Protein Misfolding and Aggregate Pathology in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Interventions. *Appl Sci* 2025; 15: 10285.

[60] Outeiro TF, Höglinger G, Lang AE, et al. Protein misfolding: understanding biology to classify and treat synucleinopathies. *J Neural Transm* 2025; 132: 1645–1654.

[61] Zampar S, Di Gregorio SE, Grimmer G, et al. "Prion-like" seeding and propagation of oligomeric protein assemblies in neurodegenerative disorders. *Front Neurosci* 2024; 18: 1436262.

[62] Knowles TPJ, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 384–396.

[63] Soto C, Pritzkow S. Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* 2018; 21: 1332–1340.

[64] Koszła O, Sołek P. Misfolding and aggregation in neurodegenerative diseases: protein quality control machinery as potential therapeutic clearance pathways. *Cell Commun Signal* 2024; 22: 421.

[65] Willbold D, Strodel B, Schröder GF, et al. Amyloid-type Protein Aggregation and Prion-like Properties of Amyloids. *Chem Rev* 2021; 121: 8285–8307.

[66] Žganec M, Taler Verčič A, Muševič I, et al. Amyloid Fibrils of Stefin B Show Anisotropic Properties. *Int J Mol Sci* 2023; 24: 3737.

[67] Kent SA, Spires-Jones TL, Durrant CS. The physiological roles of tau and Aβ: implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta Neuropathol (Berl)* 2020; 140: 417–447.

[68] Chen G, Xu T, Yan Y, et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin* 2017; 38: 1205–1235.

[69] Hur J-Y. γ-Secretase in Alzheimer's disease. *Exp Mol Med* 2022; 54: 433–446.

[70] Wu J, Wu J, Chen T, et al. Protein aggregation and its affecting mechanisms in neurodegenerative diseases. *Neurochem Int* 2024; 180: 105880.

[71] Ullah R, Lee EJ. Advances in Amyloid-β Clearance in the Brain and Periphery: Implications for Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobiol* 2023; 32: 216–246.

[72] Xiang Y, Bu X-L, Liu Y-H, et al. Physiological amyloid-beta clearance in the periphery and its therapeutic potential for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 2015; 130: 487–499.

[73] Wu S, Hu L, Lin J, et al. Excretion of Amyloid-β in the Gastrointestinal Tract and Regulation by the Gut Microbiota. *J Alzheimers Dis* 2022; 90: 1153–1162.

[74] Corsi A, Bombieri C, Valenti MT, et al. Tau Isoforms: Gaining Insight into MAPT Alternative Splicing. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 15383.

[75] Hong X, Huang L, Lei F, et al. The Role and Pathogenesis of Tau Protein in Alzheimer's Disease. *Biomolecules* 2025; 15: 824.

[76] Brandt R, Trushina NI, Bakota L. Much More Than a Cytoskeletal Protein: Physiological and Pathological Functions of the Non-microtubule Binding Region of Tau. *Front Neurol* 2020; 11: 590059.

[77] Vogels T, Leuzy A, Cicognola C, et al. Propagation of Tau Pathology: Integrating Insights From Postmortem and In Vivo Studies. *Biol Psychiatry* 2020; 87: 808–818.

[78] Aranda-Abreu GE, Rojas-Durán F, Hernández-Aguilar ME, et al. The Role of Tau in Neuronal Function and Neurodegeneration. *Neurol Int* 2025; 17: 75.

[79] Jiménez JS. Macromolecular Structures and Proteins Interacting with the Microtubule Associated Tau Protein. *Neuroscience* 2023; 518: 70–82.

[80] Wang Y, Mandelkow E. Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci* 2016; 17: 22–35.

[81] Hu J, Sha W, Yuan S, et al. Aggregation, Transmission, and Toxicity of the Microtubule-Associated Protein Tau: A Complex Comprehension. *Int J Mol Sci* 2023; 24: 15023.

[82] Zheng H, Sun H, Cai Q, et al. The Enigma of Tau Protein Aggregation: Mechanistic Insights and Future Challenges. *Int J Mol Sci* 2024; 25: 4969.

[83] Hernández F, Ferrer I, Pérez M, et al. Tau Aggregation. *Neuroscience* 2023; 518: 64–69.

[84] Yang J, Zhi W, Wang L. Role of Tau Protein in Neurodegenerative Diseases and Development of Its Targeted Drugs: A Literature Review. *Molecules* 2024; 29: 2812.

[85] Dugger BN, Whiteside CM, Maarouf CL, et al. The Presence of Select Tau Species in Human Peripheral Tissues and Their Relation to Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis JAD* 2016; 51: 345–356.

[86] Xin S-H, Tan L, Cao X, et al. Clearance of Amyloid Beta and Tau in Alzheimer's Disease: from Mechanisms to Therapy. *Neurotox Res* 2018; 34: 733–748.

[87] Seitkazina A, Kim KH, Fagan E, et al. The Fate of Tau Aggregates Between Clearance and Transmission. *Front Aging Neurosci* 2022; 14: 932541.

[88] Atik A, Stewart T, Zhang J. Alpha-Synuclein as a Biomarker for Parkinson's Disease. *Brain Pathol* 2016; 26: 410–418.

[89] Emamzadeh FN. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *J Res Med Sci Off J Isfahan Univ Med Sci* 2016; 21: 29.

[90] Du X, Xie X, Liu R. The Role of α-Synuclein Oligomers in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 8645.

[91] Liu C, Zhao Y, Xi H, et al. The Membrane Interaction of Alpha-Synuclein. *Front Cell Neurosci* 2021; 15: 633727.

[92] Fevga C, Park Y, Lohmann E, et al. A new alpha-synuclein missense variant (Thr72Met) in two Turkish families with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2021; 89: 63–72.

[93] Kumar ST, Mahul-Mellier A-L, Hegde RN, et al. A NAC domain mutation (E83Q) unlocks the pathogenicity of human alpha-synuclein and recapitulates its pathological diversity. *Sci Adv* 2022; 8: eabn0044.

[94] Bendor JT, Logan TP, Edwards RH. The Function of α-Synuclein. *Neuron* 2013; 79: 1044–1066.

[95] Bárcenas O, Estivill-Alonso M, Ventura S. Determinants of alpha-synuclein pathogenesis in Parkinson's disease. *Neural Regen Res* 2026; 21: 1568–1569.

[96] Farzadfard A, Pedersen JN, Meisl G, et al. The C-terminal tail of α-synuclein protects against aggregate replication but is critical for oligomerization. *Commun Biol* 2022; 5: 123.

[97] Török N, Majláth Z, Szalárdy L, et al. Investigational α-synuclein aggregation inhibitors: hope for Parkinson's disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2016; 25: 1281–1294.

[98] Oueslati A. Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? *J Park Dis* 2016; 6: 39–51.

[99] Ho MS. Clearance Pathways for α-Synuclein in Parkinson's Disease. *J Neurochem* 2025; 169: e70124.

[100] Wu C-K, Fuh J-L. A 2025 update on treatment strategies for the Alzheimer's disease spectrum. *J Chin Med Assoc JCMA* 2025; 88: 495–502.

[101] Arndt JW, Qian F, Smith BA, et al. Structural and kinetic basis for the selectivity of aducanumab for aggregated forms of amyloid-β. *Sci Rep* 2018; 8: 6412.

[102] Mintun MA, Lo AC, Duggan Evans C, et al. Donanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* 2021; 384: 1691–1704.

[103] Swanson CJ, Zhang Y, Dhadda S, et al. A randomized, double-blind, phase 2b proof-of-concept clinical trial in early Alzheimer's disease with lecanemab, an anti-Aβ protofibril antibody. *Alzheimers Res Ther* 2021; 13: 80.

[104] Fox NC, Belder C, Ballard C, et al. Treatment for Alzheimer's disease. *The Lancet* 2025; 406: 1408–1423.

[105] Shaw S, Porel P, Aran KR. Transthyretin as a therapeutic target: the future of disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. *Mol Biol Rep* 2025; 52: 370.

[106] Kutzsche J, Jürgens D, Willuweit A, et al. Safety and pharmacokinetics of the orally available antiprionic compound PRI-002: A single and multiple ascending dose phase I study. *Alzheimers Dement* 2020; 6: e12001.

[107] Cummings JL, Zhou Y, Lee G, et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2025. *Alzheimers Dement* 2025; 11: e70098.

[108] Urso D, Chaudhuri KR, Qamar MA, et al. Improving the Delivery of Levodopa in Parkinson's Disease: A Review of Approved and Emerging Therapies. *CNS Drugs* 2020; 34: 1149–1163.

[109] Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA* 2020; 323: 548.

[110] Khan MS, Nasiripour S, Bopassa JC. Parkinson Disease Signaling Pathways, Molecular Mechanisms, and Potential Therapeutic Strategies: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci* 2025; 26: 6416.

[111] Zach Schorken. *Parkinson's Disease Priority Therapeutic Clinical Pipeline Report Spring 2025*. The Micheael J. Fox Foundation for Parkinson's Research, 2025.

[112] Nanda A, Pandey SK, Singh RK. Unraveling synucleinopathies: Recent breakthroughs in Parkinson's disease therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 2025; 392: 103735.

[113] Pitton Rissardo J, McGarry A, Shi Y, et al. Alpha-Synuclein Neurobiology in Parkinson's Disease: A Comprehensive Review of Its Role, Mechanisms, and Therapeutic Perspectives. *Brain Sci* 2025; 15: 1260.

[114] Alfaidi M, Barker RA, Kuan W-L. An update on immune-based alpha-synuclein trials in Parkinson's disease. *J Neurol* 2025; 272: 21.

[115] Tolar M, Abushakra S, Sabbagh M. The path forward in Alzheimer's disease therapeutics: Reevaluating the amyloid cascade hypothesis. *Alzheimers Dement* 2020; 16: 1553–1560.

[116] Hunter TR, Santos LE, Tovar-Moll F, et al. Alzheimer's disease biomarkers and their current use in clinical research and practice. *Mol Psychiatry* 2025; 30: 272–284.

[117] Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, et al. The Diagnosis of Mild Cognitive Impairment due to Alzheimer's Disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer's Disease. *Focus* 2013; 11: 96–106.

[118] DGN e. V. & DGPPN e. V. (Hrsg.) S3-Leitlinie Demenzen, Version 6.0, 24.02.2026. *S3-Leitlinie Demenzen*, https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/038-013 (2026, accessed 11 April 2026).

[119] Lui F, Tsao JW. Alzheimer Disease. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/ (2026).

[120] Liss JL, Seleri Assunção S, Cummings J, et al. Practical recommendations for timely, accurate diagnosis of symptomatic Alzheimer's disease (MCI and dementia) in primary care: a review and synthesis. *J Intern Med* 2021; 290: 310–334.

[121] McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc* 2011; 7: 263–269.

[122] Jessen F, Amariglio RE, Van Boxtel M, et al. A conceptual framework for research on subjective cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2014; 10: 844–852.

[123] Rabinovici GD, Knopman DS, Arbizu J, et al. Updated Appropriate Use Criteria for Amyloid and Tau PET: A Report from the Alzheimer's Association and Society for Nuclear Medicine and Molecular Imaging Workgroup. *J Nucl Med* 2025; 66: S5–S31.

[124] Rehman K, Irshad K, Kamal S, et al. Exposure of Environmental Contaminants and Development of Neurological Disorders. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2021; 31: 35–53.

[125] Papaliagkas V, Kalinderi K, Vareltzis P, et al. CSF Biomarkers in the Early Diagnosis of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 2023; 24: 8976.

[126] Palmqvist S, Whitson HE, Allen LA, et al. Alzheimer's Association Clinical Practice Guideline on the use of blood-based biomarkers in the diagnostic workup of suspected Alzheimer's disease within specialized care settings. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc* 2025; 21: e70535.

[127] Barthélemy NR, Salvadó G, Schindler SE, et al. Highly accurate blood test for Alzheimer's disease is similar or superior to clinical cerebrospinal fluid tests. *Nat Med* 2024; 30: 1085–1095.

[128] Schindler SE, Petersen KK, Saef B, et al. Head-to-head comparison of leading blood tests for Alzheimer's disease pathology. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc* 2024; 20: 8074–8096.

[129] Buonocore J, Fratto E, Arcuri F, et al. Plasma NfL and GFAP in the preclinical stages of neurodegenerative diseases: insights from the UK Biobank. *J Neurol* 2025; 272: 755.

[130] Jack CR, Andrews JS, Beach TG, et al. Revised criteria for diagnosis and staging of Alzheimer's disease: Alzheimer's Association Workgroup. *Alzheimers Dement* 2024; 20: 5143–5169.

[131] Massano J, Bhatia KP. Clinical Approach to Parkinson's Disease: Features, Diagnosis, and Principles of Management. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a008870–a008870.

[132] Tolosa E, Garrido A, Scholz SW, et al. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2021; 20: 385–397.

[133] Stiasny-Kolster K, Mayer G, Schäfer S, et al. The REM sleep behavior disorder screening questionnaire—A new diagnostic instrument. *Mov Disord* 2007; 22: 2386–2393.

[134] AlMahadin G, Lotfi A, Zysk E, et al. Parkinson's disease: current assessment methods and wearable devices for evaluation of movement disorder motor symptoms - a patient and healthcare professional perspective. *BMC Neurol* 2020; 20: 419.

[135] Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology* 1967; 17: 427–427.

[136] Goetz CG, Fahn S, Martinez-Martin P, et al. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Process, format, and clinimetric testing plan. *Mov Disord* 2007; 22: 41–47.

[137] Gujral J, Gandhi OH, Singh SB, et al. PET, SPECT, and MRI imaging for evaluation of Parkinson's disease. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2024; 14: 371–390.

[138] Agrawal M, Biswas A. Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders. *Front Mol Biosci*; 2. Epub ahead of print 22 September 2015. DOI: 10.3389/fmolb.2015.00054.

[139] Jin Y, Vadukul DM, Gialama D, et al. The Diagnostic Potential of Amyloidogenic Proteins. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 4128.

[140] Kulenkampff K, Wolf Perez A-M, Sormanni P, et al. Quantifying misfolded protein oligomers as drug targets and biomarkers in Alzheimer and Parkinson diseases. *Nat Rev Chem* 2021; 5: 277–294.

[141] Bălașa AF, Chircov C, Grumezescu AM. Body Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease—An Up-To-Date Overview. *Biomedicines* 2020; 8: 421.

[142] Maass F, Rikker S, Dambeck V, et al. Increased alpha-synuclein tear fluid levels in patients with Parkinson's disease. *Sci Rep* 2020; 10: 8507.

[143] Pellegrini C, Daniele S, Antonioli L, et al. Prodromal Intestinal Events in Alzheimer's Disease (AD): Colonic Dysmotility and Inflammation Are Associated with Enteric AD-Related Protein Deposition. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 3523.

[144] Tamgüney G, Korczyn AD. A critical review of the prion hypothesis of human synucleinopathies. *Cell Tissue Res* 2018; 373: 213–220.

[145] Brundin P, Li J-Y, Holton JL, et al. Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 741–745.

[146] Hansson O, Edelmayer RM, Boxer AL, et al. The Alzheimer's Association appropriate use recommendations for blood biomarkers in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2022; 18: 2669–2686.

[147] Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 2010; 19: R12-20.

[148] Kayed R, Head E, Thompson JL, et al. Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis. *Science* 2003; 300: 486–489.

[149] Cline EN, Bicca MA, Viola KL, et al. The Amyloid-β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *J Alzheimers Dis JAD* 2018; 64: S567–S610.

[150] Birkmann E, Schäfer O, Weinmann N, et al. Detection of prion particles in samples of BSE and scrapie by fluorescence correlation spectroscopy without proteinase K digestion. *Biol Chem*; 387. Epub ahead of print 1 January 2006. DOI: 10.1515/BC.2006.013.

[151] Birkmann E, Henke F, Weinmann N, et al. Counting of single prion particles bound to a capture-antibody surface (surface-FIDA). *Vet Microbiol* 2007; 123: 294–304.

[152] Birkmann E, Henke F, Funke SA, et al. A Highly Sensitive Diagnostic Assay for Aggregate-Related Diseases, Including Prion Diseases and Alzheimer's Disease. *Rejuvenation Res* 2008; 11: 359–363.

[153] Wang-Dietrich L, Funke SA, Kühbach K, et al. The Amyloid-β Oligomer Count in Cerebrospinal Fluid is a Biomarker for Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* 2013; 34: 985–994.

[154] Kravchenko K, Kulawik A, Hülsemann M, et al. Analysis of anticoagulants for blood-based quantitation of amyloid β oligomers in the sFIDA assay. *Biol Chem* 2017; 398: 465–475.

[155] Blömeke L, Rehn F, Kraemer-Schulien V, et al. Aβ oligomers peak in early stages of Alzheimer's disease preceding tau pathology. *Alzheimers Dement Diagn Assess Dis Monit* 2024; 16: e12589.

[156] Chiu ML, Lawi W, Snyder ST, et al. Matrix Effects—A Challenge toward Automation of Molecular Analysis. *JALA J Assoc Lab Autom* 2010; 15: 233–242.

[157] Kühbach K, Hülsemann M, Herrmann Y, et al. Application of an Amyloid Beta Oligomer Standard in the sFIDA Assay. *Front Neurosci* 2016; 10: 8.

[158] Pils M, Dybala A, Rehn F, et al. Development and Implementation of an Internal Quality Control Sample to Standardize Oligomer-Based Diagnostics of Alzheimer's Disease. *Diagnostics* 2023; 13: 1702.

[159] Kohl TO, Ascoli CA. Immunometric Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2017; 2017: pdb.prot093716.

[160] Hayrapetyan H, Tran T, Tellez-Corrales E, et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications. In: Matson RS (ed) *ELISA*. New York, NY: Springer US, pp. 1–17.

[161] Janissen R, Oberbarnscheidt L, Oesterhelt F. Optimized straight forward procedure for covalent surface immobilization of different biomolecules for single molecule applications. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009; 71: 200–207.

[162] Kulawik A, Heise H, Zafiu C, et al. Advancements of the sFIDA method for oligomer-based diagnostics of neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* 2018; 592: 516–534.

[163] Herrmann Y, Bujnicki T, Zafiu C, et al. Nanoparticle standards for immuno-based quantitation of α-synuclein oligomers in diagnostics of Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Clin Chim Acta* 2017; 466: 152–159.

[164] Herrmann Y, Kulawik A, Kühbach K, et al. sFIDA automation yields sub-femtomolar limit of detection for Aβ aggregates in body fluids. *Clin Biochem* 2017; 50: 244–247.

[165] Schimmel H, Zegers I, Emons H. Standardization of protein biomarker measurements: Is it feasible? *Scand J Clin Lab Invest* 2010; 70: 27–33.

[166] Hülsemann M, Zafiu C, Kühbach K, et al. Biofunctionalized Silica Nanoparticles: Standards in Amyloid-β Oligomer-Based Diagnosis of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2016; 54: 79–88.

[167] Thomassen LCJ, Aerts A, Rabolli V, et al. Synthesis and Characterization of Stable Monodisperse Silica Nanoparticle Sols for *in Vitro* Cytotoxicity Testing. *Langmuir* 2010; 26: 328–335.

[168] Lee JW, Hall M. Method validation of protein biomarkers in support of drug development or clinical diagnosis/prognosis☆. *J Chromatogr B* 2009; 877: 1259–1271.

[169] Andreasson U, Perret-Liaudet A, Van Waalwijk Van Doorn LJC, et al. A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. *Front Neurol*; 6. Epub ahead of print 19 August 2015. DOI: 10.3389/fneur.2015.00179.

[170] Tiwari G, Tiwari R. Bioanalytical method validation: An updated review. *Pharm Methods* 2010; 1: 25–38.

[171] Dobrucki JW, Kubitscheck U. Fluorescence Microscopy. In: Kubitscheck U (ed) *Fluorescence Microscopy*. Wiley, pp. 85–132.

[172] Martin-Fernandez ML, Tynan CJ, Webb SED. A 'pocket guide' to total internal reflection fluorescence. *J Microsc* 2013; 252: 16–22.

[173] Fish KN. Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy. *Curr Protoc* 2022; 2: e517.

[174] Verveer PJ (ed). *Advanced Fluorescence Microscopy: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1007/978-1-4939-2080-8.

[175] Schmitz S. *Der Experimentator: Zellkultur*. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verl, 2009.

[176] Brzostowski J. General Considerations for Acquiring a Three-Color Image by Laser Scanning Confocal Microscopy. In: Brzostowski J, Sohn H (eds) *Confocal Microscopy*. New York, NY: Springer US, pp. 65–91.

[177] Sanderson MJ, Smith I, Parker I, et al. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harb Protoc* 2014; 2014: pdb.top071795.

[178] Mahlke C. Mikroskopie. In: *Der Experimentator: Neurowissenschaften*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, pp. 145–156.

[179] Liu G, Yu Q, Zhu H, et al. Amyloid-β mediates intestinal dysfunction and enteric neurons loss in Alzheimer's disease transgenic mouse. *Cell Mol Life Sci* 2023; 80: 351.

[180] Tasnády KR, Jehoul R, de Ravé MG, et al. Gastrointestinal Dysfunction and Low-Grade Inflammation Associate With Enteric Neuronal Amyloid-β in a Model for Amyloid Pathology. *Neurogastroenterol Motil* 2025; 37: e15016.

[181] Sohrabi M, Sahu B, Kaur H, et al. Gastrointestinal Changes and Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 2022; 19: 335–350.

[182] Blömeke L, Rehn F, Pils M, et al. Blood-based quantification of Aβ oligomers indicates impaired clearance from brain in ApoE ε4 positive subjects. *Commun Med* 2024; 4: 262.

[183] Chau CH, Rixe O, McLeod H, et al. Validation of Analytic Methods for Biomarkers Used in Drug Development. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5967–5976.

[184] Rose C, Parker A, Jefferson B, et al. The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2015; 45: 1827–1879.

[185] Lei W, Cheng Y, Liu X, et al. Gut microbiota-driven neuroinflammation in Alzheimer's disease: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Front Immunol* 2025; 16: 1582119.

[186] Zhou Y, Smith D, Leong BJ, et al. Promiscuous Cross-seeding between Bacterial Amyloids Promotes Interspecies Biofilms. *J Biol Chem* 2012; 287: 35092–35103.

[187] Chen SG, Stribinskis V, Rane MJ, et al. Exposure to the Functional Bacterial Amyloid Protein Curli Enhances Alpha-Synuclein Aggregation in Aged Fischer 344 Rats and Caenorhabditis elegans. *Sci Rep* 2016; 6: 34477.

[188] Laske C, Müller S, Preische O, et al. Signature of Alzheimer's Disease in Intestinal Microbiome: Results From the AlzBiom Study. *Front Neurosci* 2022; 16: 792996.

[189] Varesi A, Pierella E, Romeo M, et al. The Potential Role of Gut Microbiota in Alzheimer's Disease: From Diagnosis to Treatment. *Nutrients* 2022; 14: 668.

[190] Ferreiro AL, Choi J, Ryou J, et al. Gut microbiome composition may be an indicator of preclinical Alzheimer's disease. *Sci Transl Med* 2023; 15: eabo2984.

[191] Savica R, Boeve BF, Mielke MM. When Do α-Synucleinopathies Start? An Epidemiological Timeline: A Review. *JAMA Neurol* 2018; 75: 503.

[192] Kang J, Lee M, Park M, et al. Slow gut transit increases the risk of Alzheimer's disease: An integrated study of the bi-national cohort in South Korea and Japan and Alzheimer's disease model mice. *J Adv Res* 2024; 65: 283–295.

[193] Nedelec T, Couvy-Duchesne B, Monnet F, et al. Identifying health conditions associated with Alzheimer's disease up to 15 years before diagnosis: an agnostic study of French and British health records. *Lancet Digit Health* 2022; 4: e169–e178.

[194] Nakase T, Tatewaki Y, Thyreau B, et al. Impact of constipation on progression of Alzheimer's disease: A retrospective study. *CNS Neurosci Ther* 2022; 28: 1964–1973.

[195] Wang J, Jin W-S, Bu X-L, et al. Physiological clearance of tau in the periphery and its therapeutic potential for tauopathies. *Acta Neuropathol (Berl)* 2018; 136: 525–536.

[196] Cheng Y, Tian D-Y, Wang Y-J. Peripheral clearance of brain-derived Aβ in Alzheimer's disease: pathophysiology and therapeutic perspectives. *Transl Neurodegener* 2020; 9: 16.

[197] Al-Lahham R, Mendez N. Tau Loss of Function, by Deletion or Aggregation, Contributes to Peripheral Insulin Resistance. *J Alzheimer's Dis* 2023; 95: 1041–1058.

[198] Ghiso J, Shayo M, Calero M, et al. Systemic Catabolism of Alzheimer's Aβ40 and Aβ42. *J Biol Chem* 2004; 279: 45897–45908.

[199] Agachan F, Chen T, Pfeifer J, et al. A constipation scoring system to simplify evaluation and management of constipated patients. *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 681–685.

[200] Lionnet A, Wade MA, Corbillé A-G, et al. Characterisation of tau in the human and rodent enteric nervous system under physiological conditions and in tauopathy. *Acta Neuropathol Commun* 2018; 6: 65.

[201] Joachim CL, Mori H, Selkoe DJ. Amyloid β-protein deposition in tissues other than brain in Alzheimer's disease. *Nature* 1989; 341: 226–230.

[202] Herman RA, Scherer PN, Shan G. Evaluation of logistic and polynomial models for fitting sandwich-ELISA calibration curves. *J Immunol Methods* 2008; 339: 245–258.

[203] He J. Practical Guide to ELISA Development. In: *The Immunoassay Handbook*. Elsevier, pp. 381–393.

[204] Findlay JWA, Smith WC, Lee JW, et al. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biomed Anal* 2000; 21: 1249–1273.

[205] DeSilva B, Smith W, Weiner R, et al. Recommendations for the Bioanalytical Method Validation of Ligand-Binding Assays to Support Pharmacokinetic Assessments of Macromolecules. *Pharm Res* 2003; 20: 1885–1900.

[206] Linsinger TPJ, Josephs RD. Limitations of the application of the Horwitz equation. *TrAC Trends Anal Chem* 2006; 25: 1125–1130.

[207] Palmqvist S, Zetterberg H, Mattsson N, et al. Detailed comparison of amyloid PET and CSF biomarkers for identifying early Alzheimer disease. *Neurology* 2015; 85: 1240–1249.

[208] Lehmann S, Gabelle A, Duchiron M, et al. Comparative performance of plasma pTau181/Aβ42, pTau217/Aβ42 ratios, and individual measurements in detecting brain amyloidosis. *eBioMedicine* 2025; 117: 105805.

[209] Botella Lucena P, Vanherle S, Lodder C, et al. Blood-based Aβ42 increases in the earliest pre-pathological stage before decreasing with progressive amyloid pathology in preclinical models and human subjects: opening new avenues for prevention. *Acta Neuropathol (Berl)* 2022; 144: 489–508.

[210] Pan F-F, Huang Q, Wang Y, et al. Non-linear Character of Plasma Amyloid Beta Over the Course of Cognitive Decline in Alzheimer's Continuum. *Front Aging Neurosci* 2022; 14: 832700.

[211] Walker KA, Le Page LM, Terrando N, et al. The role of peripheral inflammatory insults in Alzheimer's disease: a review and research roadmap. *Mol Neurodegener* 2023; 18: 37.

[212] Iranzo A, Tolosa E, Gelpi E, et al. Neurodegenerative disease status and post-mortem pathology in idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: an observational cohort study. *Lancet Neurol* 2013; 12: 443–453.

[213] Yuan X, Nie S, Yang Y, et al. Propagation of pathologic α-synuclein from kidney to brain may contribute to Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2025; 28: 577–588.

[214] Reyes JF, Ekmark-Léwen S, Perdiki M, et al. Accumulation of alpha-synuclein within the liver, potential role in the clearance of brain pathology associated with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun* 2021; 9: 46.

[215] Kumari S, Goutam N, Chaudhary V, et al. α-Synuclein as a molecular link between Parkinson's disease and chronic kidney disease: insights into the kidney-brain axis. *Metab Brain Dis* 2026; 41: 106.

[216] Dimoula K, Papagiannakis N, Maniati M, et al. Aggregated α-synuclein in erythrocytes as a potential biomarker for idiopathic Parkinson's Disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2025; 133: 107321.

[217] Sprenger FS, Stefanova N, Gelpi E, et al. Enteric nervous system α-synuclein immunoreactivity in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Neurology* 2015; 85: 1761–1768.

[218] Horsager J, Andersen KB, Knudsen K, et al. Brain-first versus body-first Parkinson's disease: a multimodal imaging case-control study. *Brain* 2020; 143: 3077–3088.

[219] Nam D, Lee J-Y, Lee M, et al. Detection and Assessment of α-Synuclein Oligomers in the Urine of Parkinson's Disease Patients. *J Park Dis* 2020; 10: 981–991.

[220] Klunk WE, Engler H, Nordberg A, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 2004; 55: 306–319.

[221] Zou K, Abdullah M, Michikawa M. Current Biomarkers for Alzheimer's Disease: From CSF to Blood. *J Pers Med* 2020; 10: 85.

[222] Khurana R, Coleman C, Ionescu-Zanetti C, et al. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J Struct Biol* 2005; 151: 229–238.

[223] Rodrigues M, Bhattacharjee P, Brinkmalm A, et al. Structure-specific amyloid precipitation in biofluids. *Nat Chem* 2022; 14: 1045–1053.

[224] Knecht L, Folke J, Dodel R, et al. Alpha-synuclein Immunization Strategies for Synucleinopathies in Clinical Studies: A Biological Perspective. *Neurother J Am Soc Exp Neurother* 2022; 19: 1489–1502.

[225] Poewe W, Volc D, Seppi K, et al. Safety and Tolerability of Active Immunotherapy Targeting α-Synuclein with PD03A in Patients with Early Parkinson's Disease: A Randomized, Placebo-Controlled, Phase 1 Study. *J Park Dis* 2021; 11: 1079–1089.

[226] Bardin T, Daskalov A, Barrouilhet S, et al. Partial Prion Cross-Seeding between Fungal and Mammalian Amyloid Signaling Motifs. *mBio* 2021; 12: e02782-20.

[227] De Luca CMG, Elia AE, Portaleone SM, et al. Efficient RT-QuIC seeding activity for α-synuclein in olfactory mucosa samples of patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Transl Neurodegener* 2019; 8: 24.

[228] Dong T-T-T, Satoh K. The Latest Research on RT-QuIC Assays—A Literature Review. *Pathogens* 2021; 10: 305.

[229] Wasmer C, Lange A, Van Melckebeke H, et al. Amyloid Fibrils of the HET-s(218–289) Prion Form a β Solenoid with a Triangular Hydrophobic Core. *Science* 2008; 319: 1523–1526.

[230] Goñi F, Martá-Ariza M, Peyser D, et al. Production of Monoclonal Antibodies to Pathologic β-sheet Oligomeric Conformers in Neurodegenerative Diseases. *Sci Rep* 2017; 7: 9881.

[231] Nimmo JT, Smith H, Wang CY, et al. Immunisation with UB-312 in the Thy1SNCA mouse prevents motor performance deficits and oligomeric α-synuclein accumulation in the brain and gut. *Acta Neuropathol (Berl)* 2022; 143: 55–73.

5 Anhang

5.1 Anhang- Ergänzende Daten zum Kapitel 2.1

Titel	Detection of fecal Aβ and tau aggregates reveals a peripheral dimension of Alzheimer's disease proteinopathy
Autoren	**Pelin Özdüzenciler**, Laura Müller, Esra Kara, Maria-Christina Weber, Marlene Pils, Fabian Rehn, Oliver Bannach, Gereon R. Fink, Dieter Willbold, Michael T. Barbe, Özgür A. Onur, Gültekin Tamgüney
Journal	Eingereicht bei **Alzheimer's Research & Therapy** (Juli 2026)
Beitrag	**Eigener Anteil** ▪ Weiterentwicklung der sFIDA-Technologie für den Nachweis von Aβ- und Tau-Aggregaten in humanen Stuhlproben ▪ Koordinierung der Probensammlung, Transport und Biobanking ▪ Auswertung und Analyse der sFIDA-Daten ▪ Anfertigung der Abbildungen ▪ Diskussion der Ergebnisse ▪ Verfassen des Manuskripts
Manuskript	**s. Kapitel 2.1**
Druckgenehmigung	/

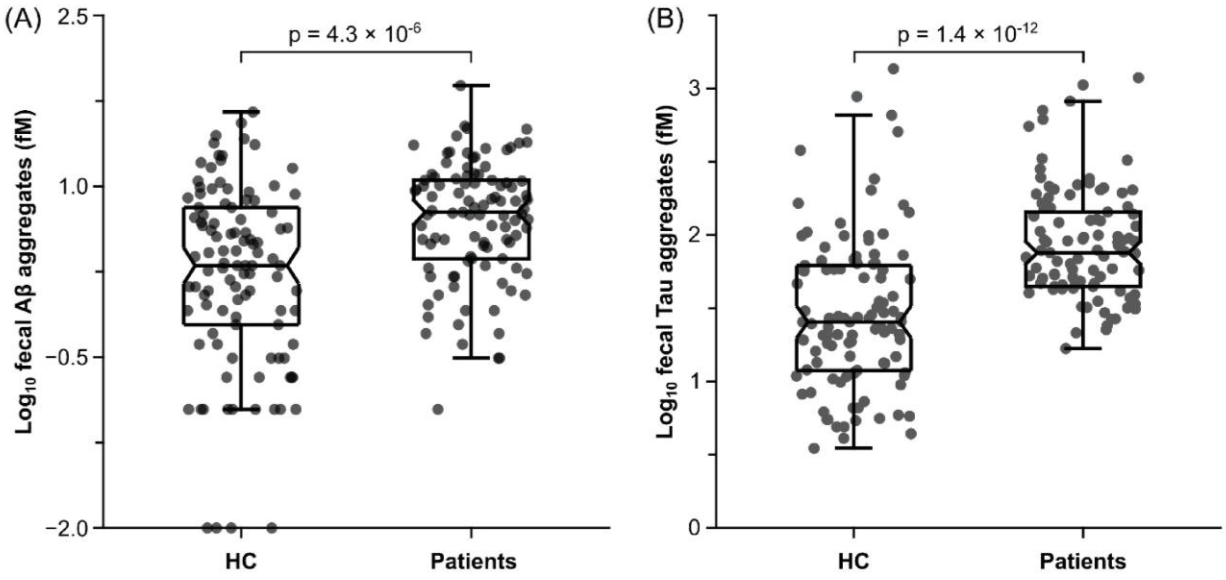


Figure 1 Fecal Aβ and tau aggregates are elevated in cognitive impairment. (A) Fecal Aβ aggregate concentrations in cognitively healthy controls (HC) and patients with cognitive impairment (Dementia/MCI/SCD). (B) Fecal tau aggregate concentrations in HC and patients. Data are shown as box plots (median and interquartile range; whiskers indicate Tukey limits) with individual observations. Statistical comparisons were performed using two-sided Mann-Whitney U tests.

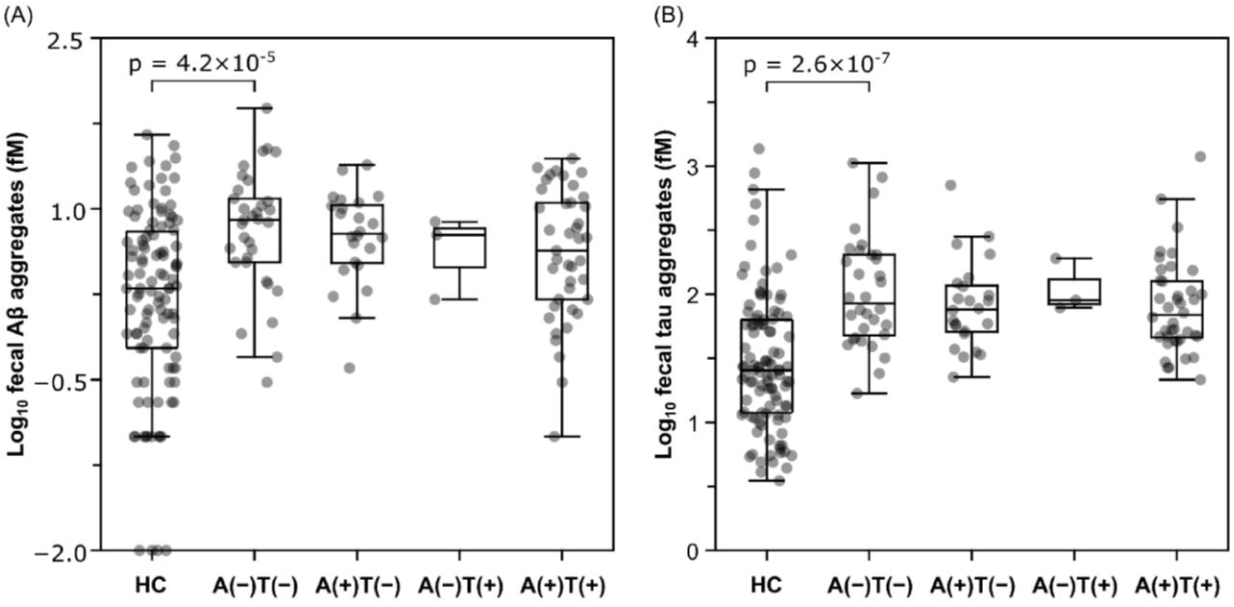


Figure 2 Elevation of fecal aggregates across CSF-defined AT biomarker strata. (A) Fecal Aβ aggregate concentrations across cognitively healthy controls (HC) and AT biomarker categories. (B) Fecal tau aggregate concentrations across HC and AT strata. Data are shown as box plots (median and interquartile range; whiskers indicate Tukey limits) with individual observations. Annotated p-values represent planned pairwise comparisons between HC and the A(−)T(−) subgroup using two-sided Mann-Whitney U tests.

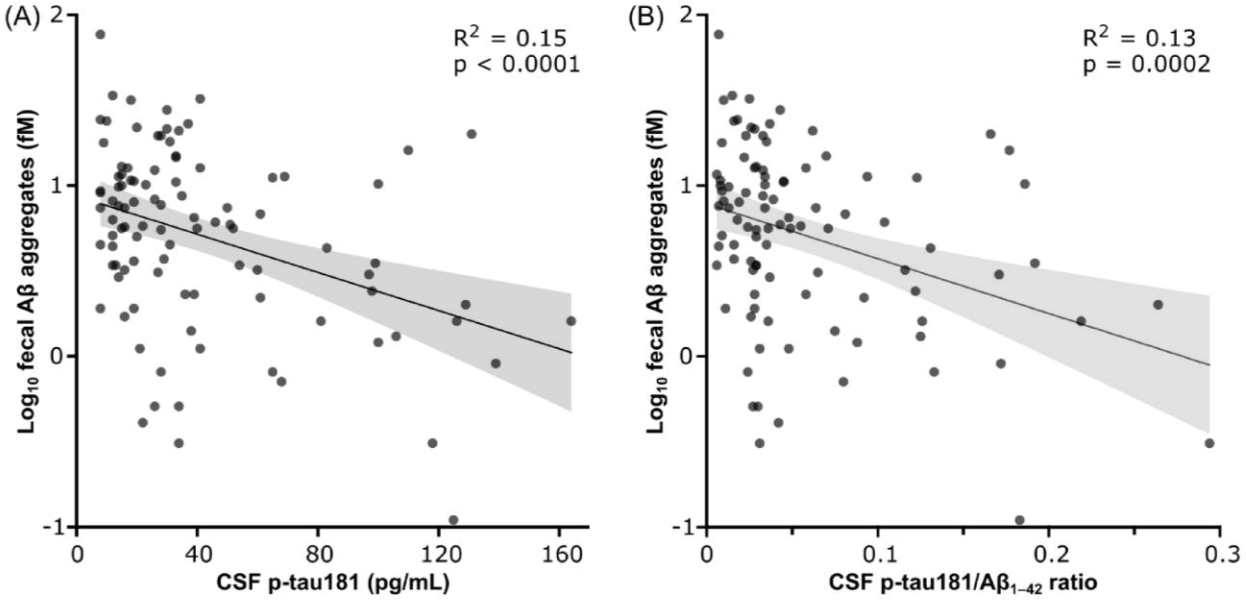


Figure 3 Inverse associations between fecal Aβ aggregates and CSF tau biomarkers. (A) Log_{10}-transformed fecal Aβ aggregate concentrations plotted against CSF phosphorylated tau181 (p-tau181). Linear regression analysis demonstrated a significant inverse association ($R^2 = 0.15$, $p < 0.0001$; $n = 99$). (B) Log_{10}-transformed fecal Aβ aggregate concentrations plotted against the CSF p-tau181/$Aβ_{1–42}$ ratio. A significant inverse association was observed ($R^2 = 0.13$, $p = 0.0002$; $n = 99$). Each dot represents one participant. Solid lines indicate the best-fit linear regression; shaded areas represent 95% confidence intervals.

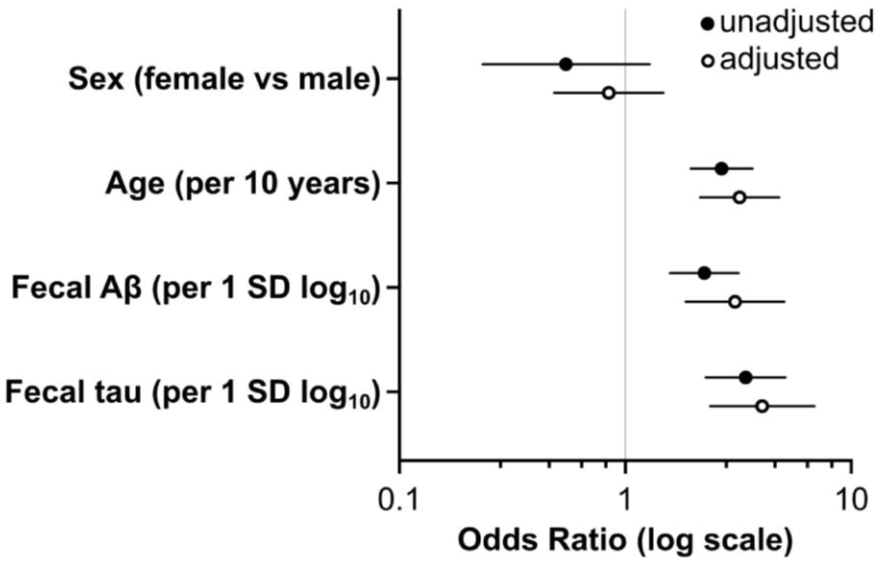


Figure 4 Association of demographic and fecal biomarker predictors with cognitive impairment. Forest plot showing odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) for the association between cognitive impairment (patients vs cognitively healthy controls) and demographic and fecal aggregate predictors. Unadjusted estimates (●) are derived from single-predictor logistic regression models. Adjusted estimates (○) are derived from the multivariable model including age (per 10 years), sex (female vs male), $\log_{10}$-transformed fecal tau (per 1 SD $\log_{10}$), and $\log_{10}$-transformed fecal Aβ (per 1 SD $\log_{10}$). The vertical reference line indicates an OR of 1 (no association). Odds ratios are displayed on a logarithmic scale. Multivariable estimates were derived from complete-case analyses (n = 203).

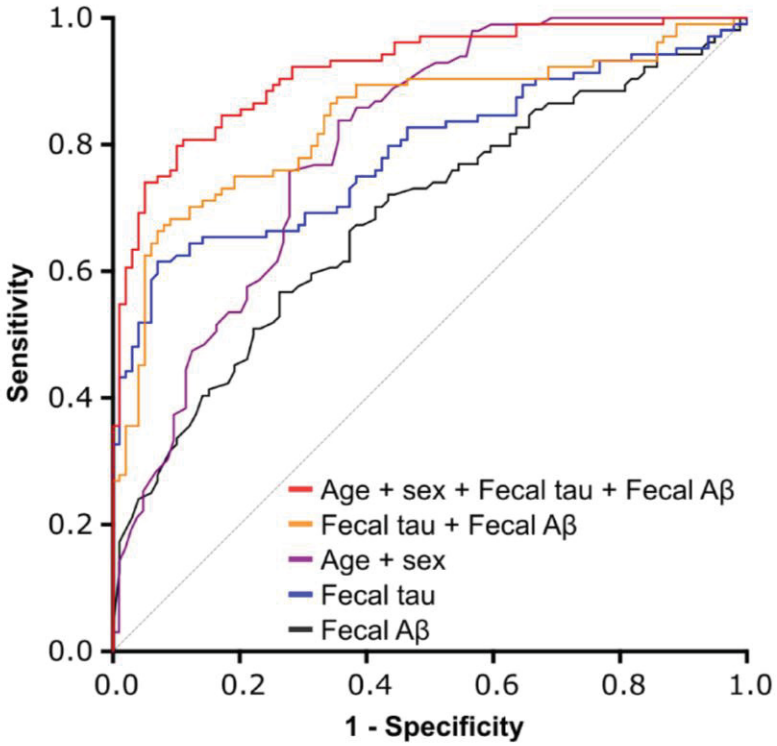


Figure 5 Receiver operating characteristic (ROC) curves for classification of cognitive impairment. ROC curves for discrimination between patients and cognitively healthy controls based on fecal tau, fecal Aβ, their combination, age + sex, and the full model including age, sex, and fecal markers. The diagonal line indicates no discriminative performance (AUC = 0.5).

Table 1 Demographic and clinical characteristics of the study cohort

Variable	**HC (n=105)**	**Patients (n=101)**	***p* value**
Female, n (%)	63 (60.0%)	56 (55.4%)	0.603
Age, years (mean ± SD)	52.9 ± 18.2	70.6 ± 8.8	< 0.0001
Education, years (mean ± SD)	NA	14.8 ± 3.8	NA
CCCSS (mean ± SD)	2.5 ± 3.3	2.2 ± 2.9	0.497
DemTect (mean ± SD)	16.4 ± 2.2	11.5 ± 4.1	< 0.0001
BDI-II (score ± SD)	NA	11.0 ± 9.5	NA
MAC-Q (score ± SD)	NA	28.3 ± 4.0	NA
FAQ (score ± SD)	NA	6.2 ± 7.1	NA

Note: AD = Alzheimer's disease; MCI = mild cognitive impairment; SCI = subjective cognitive impairment; HC = healthy controls; SD = standard deviation; CCCSS = Cleveland Clinic Constipation Scoring System; BDI-II = Beck Depression Inventory II; MAC-Q = Memory Assessment Clinic-Questionnaire; FAQ = Functional Activities Questionnaire; NA = not available. P values were calculated using chi-square test for categorical variables and Welch's t-test for continuous variables.

Supplementary Material

Detection of fecal Aβ and tau aggregates reveals a peripheral dimension of Alzheimer's disease proteinopathy

Pelin Özdüzenciler[1,2], Laura Müller[1,2], Esra Kara[3], Maria-Christina Weber[3], Marlene Pils[1,2], Fabian Rehn[1,2], Oliver Bannach[4], Gereon R. Fink[3,5], Dieter Willbold[1], Michael T. Barbe[3], Oezguer A. Onur[3,5], and Gültekin Tamgüney[1,2*]

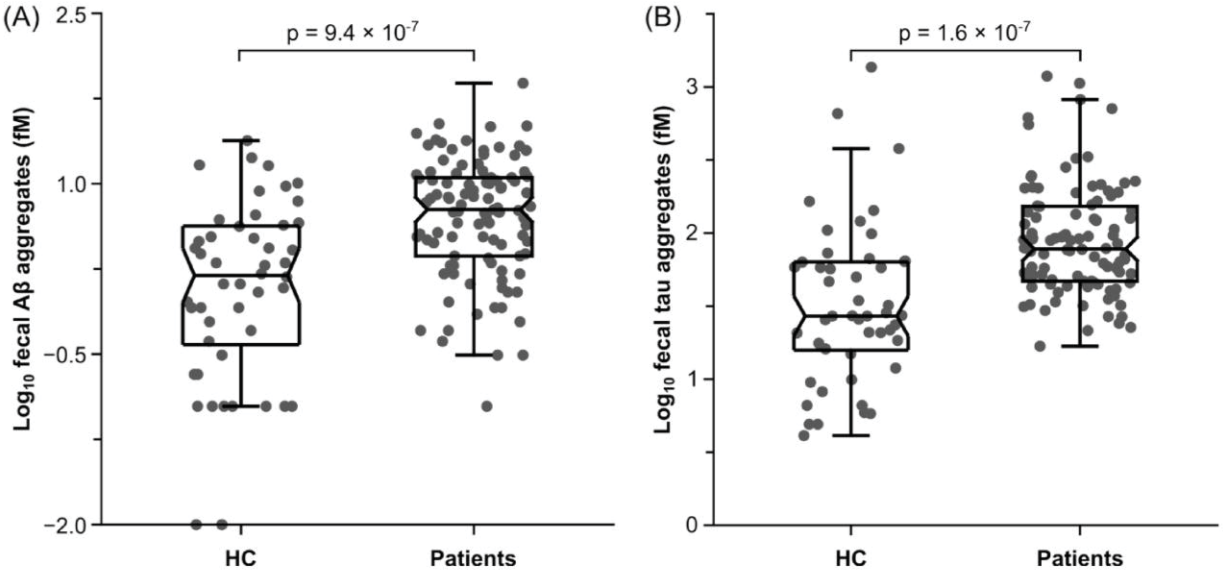


Figure S1 Fecal Aβ and tau aggregates remain elevated in cognitive impairment after age restriction of controls. (A) Fecal Aβ aggregate concentrations in cognitively healthy controls aged ≥60 years (HC ≥60) and patients with cognitive impairment (AD/MCI/SCI). (B) Fecal tau aggregate concentrations in HC ≥60 and patients. Data are shown as box plots (median and interquartile range; whiskers indicate Tukey limits) with individual observations. Statistical comparisons were performed using two-sided Mann–Whitney U tests.

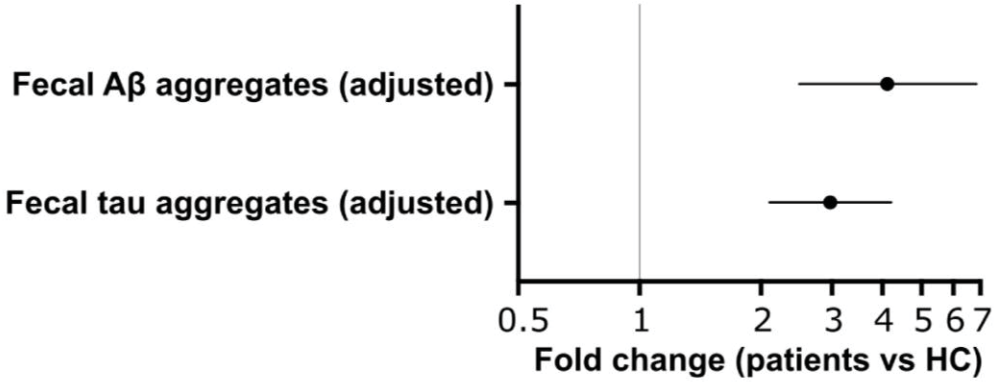


Figure S2 Demographic-adjusted associations between cognitive impairment and fecal aggregate concentrations. Forest plot showing adjusted fold-change estimates for fecal Aβ and fecal tau aggregate concentrations in patients with cognitive impairment relative to cognitively healthy controls. Estimates were derived from multivariable linear regression models of $\log_{10}$-transformed concentrations including age and sex as covariates. Points indicate fold-change estimates and horizontal lines indicate 95% confidence intervals. The vertical reference line denotes no difference (fold-change = 1).

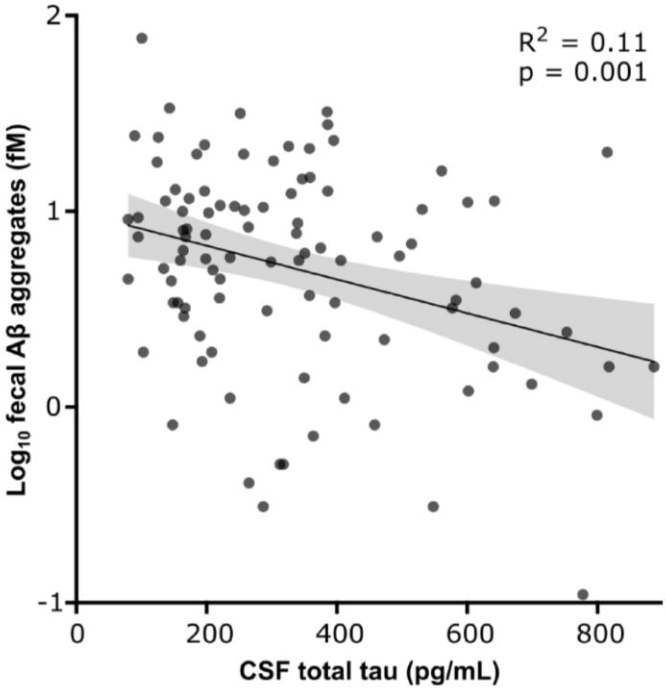


Figure S3 Inverse associations between fecal Aβ aggregates and CSF total tau. Log_{10}-transformed fecal Aβ aggregate concentrations plotted against CSF total tau. Linear regression analysis demonstrated a significant inverse association ($R^2 = 0.11$, $p = 0.001$; $n = 99$). Each dot represents one participant. Solid lines indicate the best-fit linear regression; shaded areas represent 95% confidence intervals.

Table S1 Individual-level demographic, clinical, CSF/PET biomarker, AT classification, and fecal aggregate data.

Sample	Cohort	Clinical syndrome	Sex	Education (years)	Age at sampling (years)	CCCSS	DemTect	BDI-II	MAC-Q	FAQ	$A\beta_{1-42}$ (pg/mL)	$A\beta_{1-40}$ (pg/mL)	Ratio $A\beta_{1-42}$/ $A\beta_{1-40}$	Aβ amyloid status	Total tau (pg/mL)	p-tau181 (pg/mL)	Tau amyloid status	p-tau181/$A\beta_{1-42}$ ratio	Amyloid PET	Tau PET	Fecal Aβ aggregates (fM)	Fecal tau aggregates (fM)
1	Patient	MCI	F	NA	76	NA	NA	NA	NA	NA	851	9592	0.089	+	364	68	+	0.080	NA	NA	0.7	NA
2	Patient	MCI	M	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	NA	NA	-	NA	+	NA	12.0	89.2
3	Patient	Dem	F	NA	79	NA	NA	NA	NA	NA	515	6890	0.075	+	583	99	+	0.192	NA	NA	3.5	52.6
4	Patient	Dem	M	16	79	0	5	5	30	15	635	7483	0.085	+	614	83	+	0.131	NA	NA	4.3	32.0
5	Patient	MCI	M	12	57	1	4	10	28	3	1189	6285	0.189	-	185	27	-	0.023	NA	NA	19.6	94.0
6	Patient	MCI	F	15	70	1	4	6	24	0	621	10362	0.060	+	561	110	+	0.177	NA	NA	16.1	31.3
7	Patient	MCI	M	14	71	0	7	1	22	0	1138	12703	0.090	+	602	100	+	0.088	NA	NA	1.2	26.7
8	Patient	SCD	M	19	73	2	17	6	32	2	1513	7475	0.202	-	347	33	-	0.022	NA	NA	14.6	226.1
9	Patient	MCI	M	18	69	2	12	7	26	2	401	4961	0.081	+	548	118	+	0.294	NA	NA	0.3	156.1
10	Patient	MCI	F	11	75	5	10	9	31	5	806	8941	0.090	+	799	139	+	0.172	NA	NA	0.9	79.0
11	Patient	Dem	F	7	67	0	5	NA	34	26	787	8982	0.088	+	815	131	+	0.166	NA	NA	20.0	194.0
12	Patient	MCI	M	12	79	0	10	36	31	7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.6	152.1
13	Patient	MCI	M	10	78	4	12	12	23	4	780	3375	0.231	-	330	26	-	0.033	NA	NA	12.3	75.6
14	Patient	MCI	F	12	81	0	16	6	24	4	664	6366	0.104	-	473	61	-	0.092	NA	NA	2.2	143.5
15	Patient	MCI	F	17	81	2	10	9	27	6	566	6935	0.082	+	674	97	+	0.171	NA	NA	3.0	46.9
16	Patient	MCI	M	20	65	1	9	9	33	2	488	6507	0.075	+	641	129	+	0.264	NA	NA	2.0	59.6
17	Patient	MCI	F	15	83	1	12	14	25	0	487	5272	0.092	+	458	65	+	0.133	NA	NA	0.8	66.2
18	Patient	MCI	F	9	69	3	15	8	23	0	888	5643	0.158	-	221	31	-	0.035	NA	NA	4.5	70.5
19	Patient	MCI	F	16	67	0	3	3	21	0	749	9276	0.081	+	887	164	+	0.219	NA	NA	1.6	43.3
20	Patient	MCI	F	14	73	0	11	6	24	4	806	12451	0.065	+	753	98	+	0.122	NA	NA	2.4	552.6
21	Patient	MCI	F	12	67	0	14	0	21	6	1171	7462	0.157	-	148	28	-	0.024	NA	NA	0.8	24.1

22	Patient	SCD	M	17	61	5	18	28	34	5	1094	6570	0.167	-	287	34	-	0.031	NA	NA	0.3	139.2
23	Patient	MCI	M	7	81	5	1	4	27	18	537	7248	0.074	+	531	100	+	0.186	NA	NA	10.2	42.6
24	Patient	MCI	F	10	74	3	9	15	35	20	2270	17090	0.133	-	818	81	+	0.036	NA	NA	1.6	89.8
25	Patient	MCI	M	20	73	0	11	12	32	11	1286	8397	0.153	-	190	36	-	0.028	NA	NA	2.3	42.9
26	Patient	MCI	F	12	65	0	17	21	31	4	1846	14207	0.130	-	397	54	-	0.029	NA	NA	3.4	31.8
27	Patient	MCI	F	13	78	10	11	13	27	3	730	6549	0.112	-	342	52	-	0.071	NA	NA	5.6	203.2
28	Patient	MCI	M	19	86	5	10	1	24	3	1260	7823	0.161	-	318	34	-	0.027	NA	NA	0.5	616.8
29	Patient	MCI	M	19	63	0	12	8	26	5	850	10503	0.081	+	699	106	+	0.125	NA	NA	1.3	71.8
30	Patient	MCI	M	15	61	1	10	13	29	9	1052	6262	0.168	-	340	35	-	0.033	NA	NA	8.7	188.6
31	Patient	MCI	M	16	64	0	13	4	26	0	1852	10190	0.182	-	358	29	-	0.016	NA	NA	3.7	819.1
32	Patient	MCI	F	13	60	6	15	14	35	13	1648	10191	0.162	-	385	41	-	0.025	NA	NA	32.2	1059.6
33	Patient	MCI	M	13	60	0	11	3	25	4	1003	11101	0.090	+	640	126	+	0.126	NA	NA	1.6	50.7
34	Patient	MCI	F	25	60	0	18	14	29	0	681	12364	0.055	+	778	125	+	0.183	NA	NA	0.1	44.6
35	Patient	MCI	M	13	71	1	15	2	26	0	486	NA	NA	+	80	8	-	0.016	NA	NA	4.5	92.2
36	Patient	Dem	F	6	86	0	7	25	34	27	407	NA	NA	+	160	15	-	0.036	NA	NA	5.6	57.5
37	Patient	Dem	M	18	70	2	14	2	28	4	470	NA	NA	+	156	13	-	0.029	NA	NA	3.4	75.1
38	Patient	MCI	F	16	53	1	11	1	35	8	2065	NA	NA	-	149	12	-	0.006	NA	NA	3.4	242.7
39	Patient	MCI	M	23	77	1	7	0	24	1	489	NA	NA	+	168	16	-	0.034	NA	NA	7.4	710.4
40	Patient	Dem	M	18	73	NA	NA	NA	NA	NA	445	NA	NA	+	351	46	+	0.104	NA	NA	6.1	1185.8
41	Patient	MCI	M	17	74	NA	9	24	35	14	581	NA	NA	+	167	16	-	0.027	NA	NA	3.2	58.4
42	Patient	MCI	M	20	71	1	NA	3	31	3	787	NA	NA	+	462	50	+	0.064	NA	+	7.4	165.1
43	Patient	MCI	F	11	71	1	10	6	32	8	801	NA	NA	+	406	40	+	0.049	NA	NA	5.6	126.2
44	Patient	MCI	M	NA	63	NA	14	NA	NA	NA	769	NA	NA	-	103	8	-	0.011	NA	NA	1.9	44.5
45	Patient	MCI	F	20	68	1	8	9	33	6	701	NA	NA	+	210	20	-	0.029	NA	NA	5.0	32.4
46	Patient	Dem	M	17	77	1	12	10	29	29	632	NA	NA	+	193	16	-	0.026	NA	NA	1.7	62.0
47	Patient	MCI	F	11	81	8	13	13	27	2	593	NA	NA	+	197	17	-	0.028	NA	NA	12.7	115.0
48	Patient	MCI	F	13	83	2	12	6	34	13	882	NA	NA	+	303	31	+	0.035	NA	+	18.1	106.1
49	Patient	MCI	F	NA	48	NA	NA	NA	NA	NA	1868	NA	NA	-	163	15	-	0.008	NA	NA	10.0	180.2
50	Patient	MCI	F	NA	66	NA	NA	NA	NA	NA	1868	NA	NA	-	252	18	-	0.010	NA	NA	31.7	45.7
51	Patient	MCI	F	18	68	0	13	3	35	2	776	NA	NA	+	197	20	-	0.026	NA	NA	21.9	35.3
52	Patient	MCI	M	18	63	0	12	0	30	0	437	NA	NA	+	90	8	-	0.018	NA	-	24.3	282.2

53	Patient	MCI	F	NA	83	NA	NA	NA	NA	NA	841	NA	NA	+	257	28	+	0.033	NA	NA	19.6	52.0
54	Patient	Dem	M	10	76	13	NA	26	33	23	721	NA	NA	+	287	33	+	0.045	NA	NA	10.5	127.9
55	Patient	Dem	F	16	56	1	NA	1	28	4	667	NA	NA	+	264	26	-	0.039	NA	NA	8.3	97.8
56	Patient	MCI	M	20	87	0	14	0	21	5	685	NA	NA	+	258	23	-	0.034	NA	NA	10.1	205.6
57	Patient	MCI	F	14	55	7	16	9	32	4	2415	NA	NA	-	173	15	-	0.006	NA	NA	11.6	48.4
58	Patient	MCI	F	NA	76	NA	NA	NA	NA	NA	980	NA	NA	-	164	19	-	0.019	NA	-	8.0	63.6
59	Patient	MCI	F	NA	79	6	9	13	26	2	949	NA	NA	+	299	28	+	0.029	NA	NA	5.5	214.9
60	Patient	MCI	M	16	59	8	12	30	29	13	1273	NA	NA	-	134	12	-	0.009	NA	NA	5.1	40.3
61	Patient	MCI	F	13	55	4	NA	36	34	3	851	NA	NA	-	95	8	-	0.009	NA	NA	9.3	95.0
62	Patient	MCI	F	11	72	2	17	1	28	0	673	NA	NA	+	199	16	-	0.024	NA	NA	5.7	49.3
63	Patient	MCI	F	19	73	0	14	0	23	2	710	NA	NA	+	386	30	+	0.043	NA	NA	27.7	332.5
64	Patient	MCI	M	14	63	2	9	17	25	2	550	NA	NA	+	358	34	+	0.062	NA	NA	20.9	91.0
65	Patient	Dem	M	19	65	1	6	24	32	27	517	NA	NA	+	152	15	-	0.029	+	NA	12.9	51.6
66	Patient	MCI	M	23	61	0	18	0	23	0	351	NA	NA	+	80	8	-	0.023	NA	NA	9.1	246.9
67	Patient	MCI	F	10	84	1	12	17	34	11	841	NA	NA	-	143	12	-	0.015	NA	NA	33.7	324.3
68	Patient	MCI	F	13	83	0	NA	NA	NA	NA	>2501	NA	NA	-	338	28	+	NA	NA	NA	7.7	190.2
69	Patient	MCI	F	13	74	3	15	11	27	5	753	NA	NA	+	515	61	+	0.081	NA	NA	6.8	92.5
70	Patient	MCI	F	9	69	3	3	42	26	4	683	NA	NA	+	208	19	-	0.028	NA	NA	1.9	134.6
71	Patient	Dem	F	NA	72	0	6	1	25	2	503	NA	NA	+	350	38	+	0.075	NA	NA	1.4	91.2
72	Patient	Dem	F	11	61	3	14	11	31	7	513	NA	NA	+	577	60	+	0.116	NA	+	3.2	53.4
73	Patient	MCI	F	20	58	2	18	13	28	2	1179	NA	NA	-	496	51	+	0.043	NA	+	5.9	78.4
74	Patient	Dem	F	13	65	0	7	12	35	10	419	NA	NA	+	293	27	+	0.065	NA	NA	3.1	26.8
75	Patient	MCI	F	NA	61	NA	NA	NA	NA	NA	1087	NA	NA	-	203	14	-	0.013	NA	NA	9.8	68.8
76	Patient	MCI	M	15	65	6	NA	NA	NA	NA	646	NA	NA	-	126	10	-	0.016	NA	NA	23.9	16.8
77	Patient	MCI	M	18	60	1	18	20	26	2	2318	NA	NA	-	221	18	-	0.008	NA	NA	10.7	220.1
78	Patient	MCI	F	11	83	0	16	7	25	3	991	NA	NA	+	395	37	+	0.037	NA	NA	23.0	84.8
79	Patient	MCI	F	11	55	13	15	34	31	8	1120	NA	NA	-	101	8	-	0.007	NA	NA	76.6	203.3
80	Patient	MCI	F	18	75	1	14	14	25	0	599	NA	NA	-	95	8	-	0.013	NA	NA	7.4	125.0
81	Patient	MCI	F	13	92	1	9	5	25	0	735	NA	NA	+	220	19	+	0.026	NA	+	3.6	153.4
82	Patient	MCI	M	11	76	1	17	8	27	0	807	NA	NA	+	375	39	+	0.048	NA	NA	6.5	209.7
83	Patient	MCI	M	12	64	3	12	14	30	2	375	NA	NA	+	165	14	-	0.037	NA	NA	2.9	37.2

84	Patient	SCD	F	15	79	7	18	9	29	0	1261	NA	NA	-	170	12	-	0.010	NA	NA	8.1	54.1
85	Patient	MCI	F	18	74	3	13	14	26	4	397	NA	NA	+	236	22	-	0.055	NA	NA	5.8	77.3
86	Patient	Dem	F	12	80	1	5	0	24	0	665	NA	NA	+	382	39	+	0.058	NA	NA	2.3	47.8
87	Patient	MCI	F	18	55	2	11	NA	NA	NA	709	NA	NA	+	386	41	+	0.058	NA	NA	12.7	96.5
88	Patient	MCI	M	17	75	5	5	16	27	18	471	NA	NA	+	359	33	+	0.070	NA	NA	14.9	46.9
89	Patient	Dem	F	13	65	1	4	3	26	4	679	NA	NA	+	236	21	-	0.031	NA	NA	1.1	89.2
90	Patient	MCI	M	17	67	2	13	0	21	0	415	NA	NA	+	137	14	-	0.034	NA	NA	11.3	58.9
91	Patient	MCI	F	14	71	5	13	12	30	1	856	NA	NA	+	412	41	+	0.048	NA	NA	1.1	46.5
92	Patient	MCI	M	16	67	2	14	15	29	1	1746	NA	NA	-	146	12	-	0.007	NA	NA	4.4	39.2
93	Patient	MCI	M	13	72	8	NA	22	34	15	1064	NA	NA	+	326	30	+	0.028	NA	NA	21.5	99.7
94	Patient	Dem	M	NA	80	NA	NA	NA	NA	NA	527	NA	NA	+	601	65	+	0.123	NA	NA	11.1	21.5
95	Patient	MCI	M	18	78	0	12	0	25	11	733	NA	NA	+	642	69	+	0.094	NA	NA	11.3	41.3
96	Patient	MCI	F	12	65	0	10	19	24	0	848	NA	NA	+	313	26	+	0.030	NA	NA	0.5	29.5
97	Patient	MCI	F	15	75	0	11	10	33	5	520	NA	NA	+	265	22	-	0.042	NA	NA	0.4	22.6
98	Patient	MCI	F	10	69	0	18	26	31	16	1030	NA	NA	-	124	9	-	0.009	NA	NA	17.8	57.5
99	Patient	MCI	M	21	76	0	15	4	27	3	682	NA	NA	+	164	12	-	0.018	+	NA	6.3	33.8
100	Patient	MCI	M	14	74	2	12	9	24	3	1934	NA	NA	-	199	14	-	0.007	NA	NA	7.6	76.9
101	Patient	MCI	M	14	74	1	9	17	32	19	421	NA	NA	+	243	19	-	0.045	NA	NA	10.6	121.7
102	HC	-	M	NA	21	9	15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.1	10.9
103	HC	-	M	NA	18	3	15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.0	24.8
104	HC	-	M	NA	62	0	14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.1	34.5
105	HC	-	M	NA	70	7	10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.1	18.4
106	HC	-	F	NA	58	0	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.2	27.4
107	HC	-	F	NA	74	4	12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.1	66.9
108	HC	-	M	NA	70	0	12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.1	98.9
109	HC	-	F	NA	55	1	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	6.5	241.4
110	HC	-	F	NA	20	4	15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.1	73.8
111	HC	-	F	NA	20	5	16	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5.9	160.5
112	HC	-	F	NA	78	4	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.8	120.4
113	HC	-	M	NA	46	1	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.2	71.5
114	HC	-	F	NA	66	0	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.3	657.5

115	HC	-	M	NA	75	0	14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.7	378.6
116	HC	-	M	NA	74	2	13	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.1	25.5
117	HC	-	F	NA	70	0	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.7	64.0
118	HC	-	F	NA	63	4	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3.4	63.3
119	HC	-	F	NA	66	7	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.9	46.6
120	HC	-	M	NA	34	7	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.7	58.6
121	HC	-	F	NA	72	1	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.6	56.8
122	HC	-	M	NA	77	5	15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.8	27.0
123	HC	-	F	NA	60	0	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.4	64.3
124	HC	-	F	NA	49	1	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	6.5	51.1
125	HC	-	F	NA	64	2	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.5	72.9
126	HC	-	F	NA	61	2	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.2	1365.8
127	HC	-	M	NA	36	0	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.8	882.1
128	HC	-	M	NA	62	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.2	104.6
129	HC	-	F	NA	60	0	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.1	28.5
130	HC	-	M	NA	52	0	14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.2	98.9
131	HC	-	F	NA	66	2	15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.1	32.0
132	HC	-	F	NA	63	4	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.3	27.3
133	HC	-	M	NA	59	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.4	29.5
134	HC	-	F	NA	71	11	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.9	58.1
135	HC	-	F	NA	70	0	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.2	58.0
136	HC	-	F	NA	48	1	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3.2	51.0
137	HC	-	M	NA	65	2	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.0	58.4
138	HC	-	M	NA	72	1	13	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.1	27.0
139	HC	-	F	NA	50	2	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.0	101.7
140	HC	-	M	NA	62	2	13	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4.5	50.0
141	HC	-	M	NA	43	0	14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.3	27.8
142	HC	-	M	NA	57	0	15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.0	82.6
143	HC	-	F	NA	69	0	16	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.0	142.8
144	HC	-	F	NA	48	3	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.3	35.2
145	HC	-	F	NA	39	4	15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.6	57.7

146	HC	-	F	NA	42	3	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.7	202.6
147	HC	-	F	NA	26	6	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.2	NA
148	HC	-	F	NA	53	1	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	18.7	92.1
149	HC	-	F	NA	24	6	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	27.9	507.6
150	HC	-	F	NA	52	4	13	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	23.2	20.8
151	HC	-	M	NA	20	8	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.7	10.8
152	HC	-	M	NA	78	0	13	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	23.9	21.7
153	HC	-	F	NA	54	4	16	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	35.9	18.7
154	HC	-	M	NA	26	0	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	26.1	6.2
155	HC	-	M	NA	38	3	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	8.5	5.5
156	HC	-	F	NA	81	4	10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	10.1	20.9
157	HC	-	F	NA	61	5	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	14.6	16.1
158	HC	-	M	NA	64	3	13	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	16.9	20.8
159	HC	-	F	NA	52	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.3	21.0
160	HC	-	F	NA	66	0	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.6	9.5
161	HC	-	F	NA	27	2	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.0	19.2
162	HC	-	M	NA	46	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4.7	19.4
163	HC	-	M	NA	54	2	14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5.1	11.4
164	HC	-	F	NA	56	0	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3.9	5.4
165	HC	-	M	NA	26	1	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.1	10.4
166	HC	-	F	NA	64	1	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.3	5.8
167	HC	-	M	NA	72	1	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4.2	6.6
168	HC	-	F	NA	56	0	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.3	5.5
169	HC	-	F	NA	58	0	16	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.0	12.0
170	HC	-	M	NA	27	0	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3.9	11.5
171	HC	-	M	NA	20	2	12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	11.1	30.3
172	HC	-	F	NA	27	3	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	44.8	68.3
173	HC	-	F	NA	73	0	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5.3	9.9
174	HC	-	F	NA	73	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.4	23.5
175	HC	-	F	NA	62	7	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3.3	25.7
176	HC	-	F	NA	80	0	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.5	11.9

177	HC	-	M	NA	47	0	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	9.5	25.5
178	HC	-	M	NA	57	1	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4.1	11.0
179	HC	-	M	NA	83	0	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.8	8.2
180	HC	-	M	NA	48	1	11	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3.6	13.4
181	HC	-	F	NA	21	0	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.8	13.3
182	HC	-	M	NA	34	3	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	18.6	23.0
183	HC	-	F	NA	26	0	16	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	7.6	8.4
184	HC	-	F	NA	60	5	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	14.4	164.7
185	HC	-	M	NA	30	3	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5.6	22.8
186	HC	-	M	NA	31	9	12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	7.9	14.8
187	HC	-	F	NA	39	0	10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.2	98.9
188	HC	-	F	NA	41	0	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	16.1	23.4
189	HC	-	M	NA	18	1	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	8.9	5.6
190	HC	-	F	NA	36	3	16	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.3	4.4
191	HC	-	F	NA	79	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4.8	5.9
192	HC	-	F	NA	72	0	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4.3	20.7
193	HC	-	M	NA	68	7	14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	7.0	17.6
194	HC	-	M	NA	60	3	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.6	4.9
195	HC	-	F	NA	53	0	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.6	11.7
196	HC	-	M	NA	33	0	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.4	7.3
197	HC	-	F	NA	42	3	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.1	30.2
198	HC	-	F	NA	79	0	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	8.6	4.1
199	HC	-	F	NA	46	24	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	10.8	38.1
200	HC	-	F	NA	28	4	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3.8	18.2
201	HC	-	F	NA	69	1	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.0	4.9
202	HC	-	F	NA	65	2	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	9.5	6.6
203	HC	-	M	NA	68	4	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.0	14.9
204	HC	-	F	NA	69	8	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3.1	27.1
205	HC	-	F	NA	27	1	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	9.8	13.5
206	HC	-	F	NA	57	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	7.5	3.5

Abbreviations: Aβ, amyloid-beta; BDI II, Beck Depression Inventory-II; CCCSS, Cleveland Clinic Constipation Scoring System; Dem, dementia; FAQ, Functional Activities Questionnaire; HC, healthy control; MAC-Q, Memory Assessment Clinic-Questionnaire; MCI, mild cognitive impairment; NA, not available; PET, positron emission tomography; SCD, subjective cognitive decline; +, positive; -, negative.

Table S2 Cross-validated classification performance of logistic regression models.

Model	Mean_AUC	SD_AUC	CI_lower	CI_upper
Age_Sex	0.797	0.083	0.724	0.870
Combined_Fecal	0.831	0.050	0.787	0.875
Fecal_Aβ	0.685	0.080	0.616	0.755
Fecal_tau	0.787	0.095	0.704	0.871
Full_Model	0.910	0.055	0.861	0.959

Note: Values represent mean area under the curve (AUC) across 5 stratified cross-validation folds. SD indicates standard deviation across folds. 95% confidence intervals (CI) were calculated using normal approximation of the mean AUC.

5.2 Anhang- Theoretische Anzahl an Analyten pro Bild

Exemplarische Berechnung der theoretisch erwarteten Anzahl an Proteinaggregaten pro Bild auf Grundlage der folgenden Annahmen:

Probenkonzentration (c): $1\ fM \rightarrow\ 10^{-15}\ M$

Probenvolumen (V): $20\ \mu L\ \rightarrow 20 \times 10^{\ -6}\ L$

Avogadro Konstante (N_A): $6{,}022 \cdot 10^{23}\ mol^{-1}$

Die Fläche eines aufgenommenen Bildes (A_{Bild}): $0{,}33\ mm\ \times 0{,}33\ mm =\ 0{,}1089\ mm^2$

Die gesamte betrachtete Wellfläche (A_{Well}): $3{,}3\ mm\ \times 3{,}3\ mm =\ 10{,}89\ mm^2$

Theoretische Gesamtanzahl an Aggregate im Well (N_{Gesamt}):

$$c\ [M] \times V\ [L] \times\ N_A\ [mol^{-1}] = 10^{-15}\ M\ \times\ 20 \times 10^{\ -6}\ L\ \times\ 6{,}022 \cdot 10^{23}\ mol^{-1} =\ 12.044$$

Prozentualer Anteil eines Bildes an der gesamten Wellfläche (p):

$$p = \frac{A_{Bild}\ [mm^2]}{A_{Well}\ [mm^2]} \times 100 = \frac{0{,}1089\ mm^2}{10{,}89\ \ mm^2} \times 100 = 1\%$$

Theoretische Anzahl an Aggregate pro Bild (N_{Bild}):

$$N_{Bild}\ =\ N_{Gesamt} \times p\ = 12.044\ \times 0{,}01\ \approx 120$$

5.3 Anhang- Ergänzende Daten zu Kapitel 2.6

In den ergänzenden Daten wurden ausschließlich diejenigen Abbildungen aus den jeweiligen Supplementary-Material-Dokumenten aufgenommen, die für die vorliegende Dissertation relevant sind. Die vollständigen ergänzenden Informationen wurden unter dem jeweiligen Kapitel als Link angegeben und sind darüber hinaus über die DOI der entsprechenden Publikation zugänglich (s. Kapitel 2.6).

2. Validation of α-synuclein binding of cCAP-1

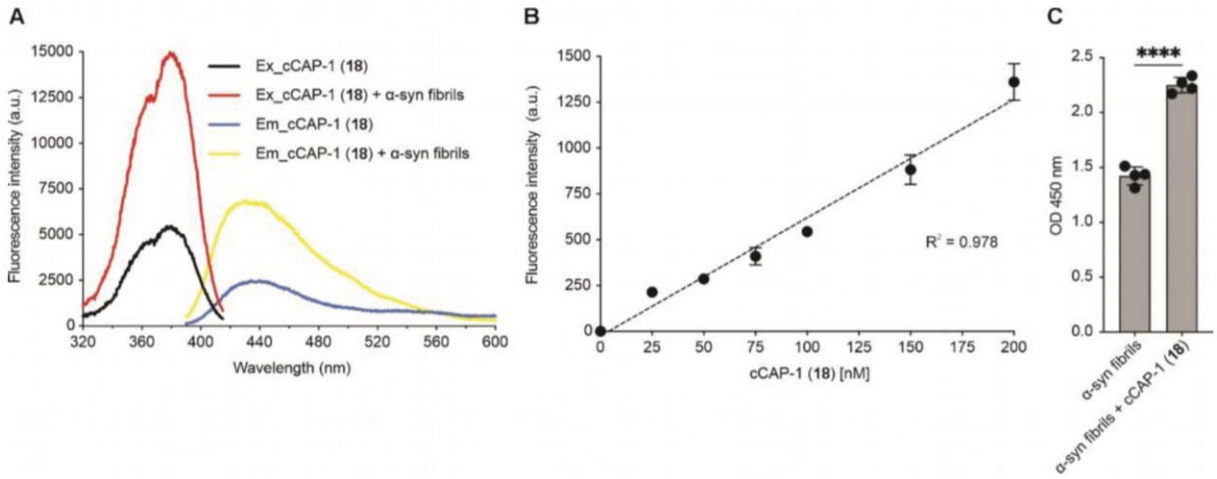
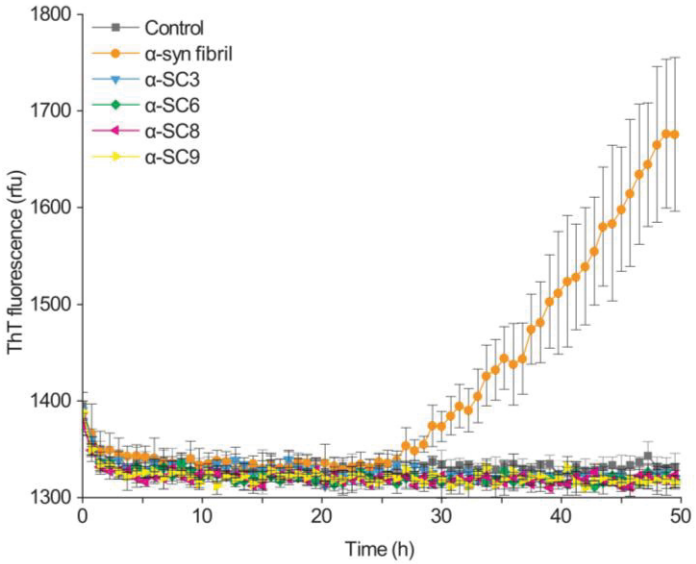


Figure S2. Spectral validation of cCAP-1 (**18**) and its streptavidin-binding for purification of α-syn fibrils. **A**. cCAP-1 binds to α-syn fibrils and allows their detection in aqueous solution via fluorescence measurements. Fluorescence excitation and emission spectra for 20 μM cCAP-1 were measured in the absence and presence of 10 μM (monomer equivalent) α-syn fibrils and demonstrate that cCAP-1 binds to α-syn fibrils and enables their detection in aqueous solution by showing increased absorption (2.8-fold) and enhanced fluorescence emission (2.9-fold) after excitation at 365 nm. Excitation maximum and emission maximum of cCAP-1 at 380 nm and 433.5 nm were slightly shifted in the presence of α-syn fibrils to 379 nm and 431 nm, respectively, giving a Stokes shift of 52 nm. **B**. cCAP-1 shows good solubility and binding to α-syn fibrils in aqueous solution. Fluorescence measurements with increasing concentrations (0–200 nM) of cCAP-1 in the presence of 10 μM (monomer equivalent) α-syn fibrils show a linear relationship for the binding of cCAP-1 to α-syn fibrils and good solubility in aqueous solution. The experiment was performed in triplicates. **C**. cCAP-1 allows improved purification of α-syn fibrils from aqueous solution. Indirect ELISA measurements showed that preincubation of 0.34 μM (monomer equivalent) α-syn fibrils with 10 μM cCAP-1 resulted in a 58% increase in binding of α-syn fibrils to streptavidin-coated 96-well polystyrene plates. The experiment was performed in quadruplicates. Error bars indicate standard deviation. ****$P < 0.0001$.

5.4 Anhang- Ergänzende Daten zu Kapitel 2.7

In den ergänzenden Daten wurden ausschließlich diejenigen Abbildungen aus den jeweiligen Supplementary-Material-Dokumenten aufgenommen, die für die vorliegende Dissertation relevant sind. Die vollständigen ergänzenden Informationen wurden unter dem jeweiligen Kapitel als Link angegeben und sind darüber hinaus über die DOI der entsprechenden Publikation zugänglich (s. Kapitel 2.7).



Supplementary Figure 3 The vaccine candidates do not seed aggregation of monomeric α-syn in an RT-QuIC assay. Aggregation of monomeric α-syn was seeded with 160 pM (final monomer equivalent) of sonicated N-acetylated human wild-type α-syn fibrils (orange circles) and resulted in a steady increase in thioflavin T fluorescence beginning at approximately 25 h. In contrast, 160 pM (final monomer equivalent) of sonicated α-SC3 fibrils (blue triangles), α-SC6 fibrils (green diamonds), α-SC8 fibrils (magenta triangles), or α-SC9 fibrils (yellow triangles) did not seed aggregation of monomeric α-syn within 50 h. Aggregation of α-syn monomers was also not observed without seeding (black squares).

5.5 Anhang- Druckgenehmigung für Kapitel 2.2



This is a License Agreement between Pelin Özdüzenciler ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	06-Jul-2026	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1747252-1		
ISSN	1758-9193	Publisher	BioMed Central Ltd
		Portion	Chapter/article

LICENSED CONTENT

Publication Title	Alzheimer's research & therapy	Rightsholder	Springer Nature BV
		Publication Type	e-Journal
Article Title	Elevated Aβ aggregates in feces from Alzheimer's disease patients: a proof-of-concept study	Start Page	223
		Issue	1
		Volume	16
Author / Editor	BioMed Central Ltd.	URL	http://www.alzres.com
Date	01/01/2009		
Language	English		
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chapter/article	Rights Requested	Main product
Page Range(s)	1-15	Distribution	Worldwide
Total Number of Pages	15	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Copies for the Disabled?	No
Who Will Republish the Content?	Academic institution	Minor Editing Privileges?	No
		Incidental Promotional Use?	No
Duration of Use	Life of current edition		
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	EUR

NEW WORK DETAILS

Title	sFIDA-basierte Detektion peripherer Aβ-, Tau- und α-Synuclein-Aggregate bei neurodegenerativen Erkrankungen	Institution Name	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
		Expected Presentation Date	2026-09-30
Instructor Name	Pelin Özdüzenciler		

ADDITIONAL DETAILS

The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Pelin Özdüzenciler

REQUESTED CONTENT DETAILS

Title, Description or Numeric Reference of the Portion(s)	1	**Title of the Article / Chapter the Portion Is From**	Elevated Aβ aggregates in feces from Alzheimer's disease patients: a proof-of-concept study
Editor of Portion(s)	Pils, M.; Dybala, A.; Schaffrath, A.; Rehn, F.; Kutzsche, J.; Blömeke, L.; Tusche, M.; Özdüzenciler, P.; Bujnicki, T.; Kraemer-Schulien, V.; Gramespacher, H.; Schmieschek, M.H.T.; Barbe, M.T.; Onur, O.A.; Fink, G.R.; Tamgüney, G.; Bannach, O.; Willbold, D.	**Author of Portion(s)**	Pils, M.; Dybala, A.; Schaffrath, A.; Rehn, F.; Kutzsche, J.; Blömeke, L.; Tusche, M.; Özdüzenciler, P.; Bujnicki, T.; Kraemer-Schulien, V.; Gramespacher, H.; Schmieschek, M.H.T.; Barbe, M.T.; Onur, O.A.; Fink, G.R.; Tamgüney, G.; Bannach, O.; Willbold, D.
Volume / Edition	16		
Page or Page Range of Portion	223	**Publication Date of Portion**	2024-12-01

5.6 Anhang- Druckgenehmigung für Kapitel 2.3

CCC Marketplace

This is a License Agreement between Pelin Özdüzenciler ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	06-Jul-2026	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1747256-1		
ISSN	2373-8057	Publisher	Nature Publishing Group; Parkinson's Disease Foundation
		Portion	Chapter/article

LICENSED CONTENT

Publication Title	NPJ Parkinson's disease	Rightsholder	Springer Nature BV
Article Title	Patients with isolated REM-sleep behavior disorder have elevated levels of alpha-synuclein aggregates in stool	Publication Type	Journal
		Start Page	14
		Issue	1
		Volume	9
Author / Editor	Parkinson's Disease Foundation (U.S.),, Nature Publishing Group,	URL	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/?term="NPJ Parkinsons Dis"[journal]
Date	01/01/2015		
Language	English		
Country	United States of America		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chapter/article	Rights Requested	Main product
Page Range(s)	1-11	Distribution	Worldwide
Total Number of Pages	11	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Copies for the Disabled?	No
Who Will Republish the Content?	Academic institution	Minor Editing Privileges?	No
		Incidental Promotional Use?	No
Duration of Use	Life of current edition		
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	EUR

NEW WORK DETAILS

Title	sFIDA-basierte Detektion peripherer Aβ-, Tau- und α-Synuclein-Aggregate bei neurodegenerativen Erkrankungen	Institution Name	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
		Expected Presentation Date	2026-09-30
Instructor Name	Pelin Özdüzenciler		

ADDITIONAL DETAILS

The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Pelin Özdüzenciler

REQUESTED CONTENT DETAILS

Title, Description or Numeric Reference of the Portion(s)	1
Editor of Portion(s)	Schaffrath, A.; Schleyken, S.; Seger, A.; Jergas, H.; Özdüzenciler, P.; Pils, M.; Blömeke, L.; Cousin, A.; Willbold, J.; Bujnicki, T.; Bannach, O.; Fink, G.R.; Willbold, D.; Sommerauer, M.; Barbe, M.T.; Tamgüney, G.
Volume / Edition	9
Page or Page Range of Portion	14
Title of the Article / Chapter the Portion Is From	Patients with isolated REM-sleep behavior disorder have elevated levels of alpha-synuclein aggregates in stool
Author of Portion(s)	Schaffrath, A.; Schleyken, S.; Seger, A.; Jergas, H.; Özdüzenciler, P.; Pils, M.; Blömeke, L.; Cousin, A.; Willbold, J.; Bujnicki, T.; Bannach, O.; Fink, G.R.; Willbold, D.; Sommerauer, M.; Barbe, M.T.; Tamgüney, G.
Publication Date of Portion	2023-02-02

5.7 Anhang- Druckgenehmigung für Kapitel 2.4

Der folgende Artikel ist unter der Creative Commons Attribution 3.0 International License (CC BY 3.0) veröffentlicht. Diese Lizenz erlaubt die Nutzung, Verbreitung und Wiedergabe in jedem Medium, sofern die Originalarbeit korrekt zitiert und auf die Lizenz verwiesen wird. Die Lizenz ist abrufbar unter: https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/

Müller, L., Özdüzenciler, P., Schedlich-Teufer, C., Seger, A., Jergas, H., Fink, G. R., Willbold, D., Sommerauer, M., Barbe, M. T., & Tamgüney, G. (2025). Elevated α-Synuclein Aggregate Levels in the Urine of Patients with Isolated REM Sleep Behavior Disorder and Parkinson's Disease. Annals of Neurology, 98(1), 147–151. https://doi.org/10.1002/ana.27250



CCC RightsLink

Elevated α-Synuclein Aggregate Levels in the Urine of Patients with Isolated REM Sleep Behavior Disorder and Parkinson's Disease

Author: Laura Müller, Pelin Özdüzenciler, Charlotte Schedlich-Teufer, et al

Publication: Annals of Neurology

Publisher: John Wiley and Sons

Date: Apr 26, 2025

© 2025 The Author(s). Annals of Neurology published by Wiley Periodicals LLC on behalf of American Neurological Association.

Open Access Article

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons CC BY license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.

For an understanding of what is meant by the terms of the Creative Commons License, please refer to Wiley's Open Access Terms and Conditions.

Permission is not required for this type of reuse.

Wiley offers a professional reprint service for high quality reproduction of articles from over 1400 scientific and medical journals. Wiley's reprint service offers:

- Peer reviewed research or reviews
- Tailored collections of articles
- A professional high quality finish
- Glossy journal style color covers
- Company or brand customisation
- Language translations
- Prompt turnaround times and delivery directly to your office, warehouse or congress.

Please contact our Reprints department for a quotation. Email corporatesaleseurope@wiley.com or corporatesalesusa@wiley.com or corporatesalesDE@wiley.com.

5.8 Anhang- Druckgenehmigung für Kapitel 2.5



This is a License Agreement between Pelin Özdüzenciler ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	07-Jul-2026	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1747587-1		
ISSN	1531-8249	Publisher	JOHN WILEY & SONS, INC.
		Portion	Chapter/article

LICENSED CONTENT

Publication Title	Annals of neurology	Publication Type	e-Journal
Article Title	Reply to "Urinary α-Synuclein for Parkinson's Detection: Key Limitations and Future Directions"	Start Page	639
		End Page	640
		Issue	3
Author / Editor	American Neurological Association., Child Neurology Society.	Volume	98
		URL	https://onlinelibrary.wiley.com/journal/15318249
Date	01/01/1977		
Language	English		
Country	United States of America		
Rightsholder	John Wiley & Sons - Books		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chapter/article	Rights Requested	Main product
Page Range(s)	1-2	Distribution	Worldwide
Total Number of Pages	2	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Copies for the Disabled?	No
Who Will Republish the Content?	Academic institution	Minor Editing Privileges?	No
		Incidental Promotional Use?	No
Duration of Use	Life of current edition		
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	EUR

NEW WORK DETAILS

Title	sFIDA-basierte Detektion peripherer Aβ-, Tau- und α-Synuclein-Aggregate bei neurodegenerativen Erkrankungen	Institution Name	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
		Expected Presentation Date	2026-09-30
Instructor Name	Pelin Özdüzenciler		

ADDITIONAL DETAILS

The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Pelin Özdüzenciler

REQUESTED CONTENT DETAILS

Title, Description or Numeric Reference of the Portion(s)	1	**Title of the Article / Chapter the Portion Is From**	Reply to "Urinary α-Synuclein for Parkinson's Detection: Key Limitations and Future Directions"
Editor of Portion(s)	Müller, Laura; Özdüzenciler, Pelin; Schedlich-Teufer, Charlotte; Seger, Aline; Jergas, Hannah; Fink, Gereon R.; Willbold, Dieter; Sommerauer, Michael; Barbe, Michael T.; Tamgüney, Gültekin	**Author of Portion(s)**	Müller, Laura; Özdüzenciler, Pelin; Schedlich-Teufer, Charlotte; Seger, Aline; Jergas, Hannah; Fink, Gereon R.; Willbold, Dieter; Sommerauer, Michael; Barbe, Michael T.; Tamgüney, Gültekin
Volume / Edition	98		
Page or Page Range of Portion	639-640	**Publication Date of Portion**	2025-09-01

5.9 Anhang- Druckgenehmigung für Kapitel 2.6

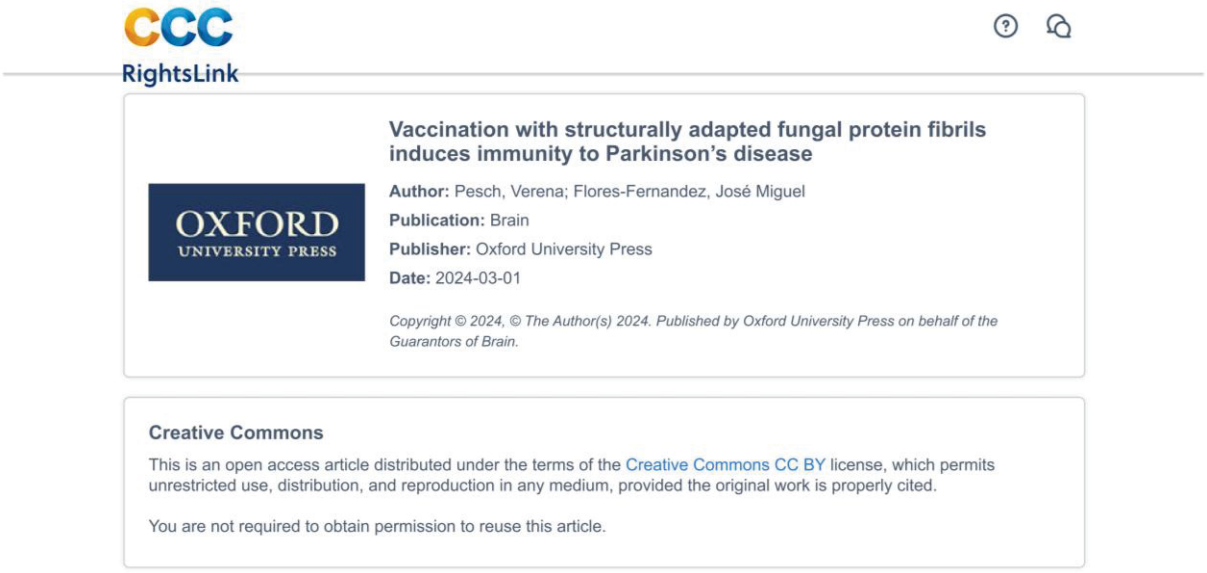
Der folgende Artikel ist unter der Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0) veröffentlicht. Diese Lizenz erlaubt die Nutzung, Verbreitung und Wiedergabe in jedem Medium, sofern die Originalarbeit korrekt zitiert und auf die Lizenz verwiesen wird. Die Lizenz ist abrufbar unter: https://creativecommons.org/licenses/by/4.0

Weber, T. M., Özdüzenciler, P., Tamgüney, G., & Pietruszka, J. (2024). Utilization of a Branched Late-Stage Clickable Biotinylated Chassis on the Example of a Pittsburgh B Analogue. Organic Letters, 26(31), 6771–6775. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.4c02527

5.10 Anhang- Druckgenehmigung für Kapitel 2.7

Der folgende Artikel ist unter der Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0) veröffentlicht. Diese Lizenz erlaubt die Nutzung, Verbreitung und Wiedergabe in jedem Medium, sofern die Originalarbeit korrekt zitiert und auf die Lizenz verwiesen wird. Die Lizenz ist abrufbar unter: https://creativecommons.org/licenses/by/4.0

Pesch, V., Flores-Fernandez, J. M., Reithofer, S., Ma, L., Özdüzenciler, P., Busch, Y., Sriraman, A., Wang, Y., Amidian, S., Kroepel, C. V. M., Müller, L., Lien, Y., Rudtke, O., Frieg, B., Schröder, G. F., Wille, H., & Tamgüney, G. (2024). Vaccination with structurally adapted fungal protein fibrils induces immunity to Parkinson's disease. Brain, 147(5), 1644–1652. https://doi.org/10.1093/brain/awae061



5.11 Anhang- Druckgenehmigung für Kapitel 2.8

Der folgende Artikel wurde als akzeptiertes Manuskript unter der Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0) veröffentlicht. Diese Lizenz erlaubt die Nutzung, Verbreitung und Wiedergabe in jedem Medium, sofern die Originalarbeit korrekt zitiert und auf die Lizenz verwiesen wird. Die Lizenz ist abrufbar unter: https://creativecommons.org/licenses/by/4.0

Hinweis: Zum Zeitpunkt der Einreichung dieser Dissertation lag der Artikel als akzeptiertes Manuskript vor; die finale gesetzte Version kann geringfügige Änderungen enthalten.

Ma, L., Reithofer, S., Pesch, V., Flores-Fernandez, J.M., Sriraman, A., Duckering, C., Amidian, S., Özdüzenciler, P., Müller, L., Werner, K., Wille, H., Tamgüney, G. Vaccines mimicking conformational epitopes on α-synuclein fibrils provide immunity to Parkinson's disease. Brain, awag010. https:/ /doi.org/10.1093/brain/awag010

