Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Neurologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. A. C. Ludolph

α1-Antitrypsin als neurochemischer Marker der Parkinson-Demenz

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Saskia Tawfik Gindi

aus Berlin

2012

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Otto
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Tobias Böckers
Tag der Promotion: 24.10.2013

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III
1. Einleitung 1
1.1 Morbus Parkinson 1
1.2 Demenz bei Morbus Parkinson 3
1.3 Diagnose von Morbus Parkinson 6
1.4 Therapie bei Morbus Parkinson 7
1.5 Alpha-Synuklein 8
1.6 Lewy-Bodies 8
1.7 Serpine 9
1.8 α1-Antitrypsin (=Serpin A1) 10
1.9 Tau-Protein 11
1.10 Amyloid-β 11
1.11 DiGE 12
1.12 Biomarker 13
1.13 Aufgabenstellung und Zielsetzung 13
2. Material und Methoden 15
2.1 Patienten und gesunde Kontrollpersonen 15
2.1.1 Patienten 15
2.1.2 Gesunde Kontrollpersonen 16
2.2 Neuropathologie 17
2.3 Chemikalien und Materialien 17
2.3.1 Chemikalien 17
2.3.2 Lösungen und Puffer 19
2.3.3 Materialien 23
2.3.4 Geräte 24
2.3.5 EDV 24
2.3.6 Antikörper 25
2.4 Methoden 25
2.4.1 Vorversuche 25
2.4.2 2D-Gele DiGE (Fluorescence Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis) 27
2.4.3 2D-Blots 34

2.4.4 Massenspektrometrie 39
2.4.5 Western Blot 41
2.4.6 Färbemethoden 42
2.4.7 Gewinnung der Spots 49
2.4.8 Zellkultur 49
2.5 Berechnung und Statistische Auswertung 50
3. Ergebnisse 53
3.1 2D-Gelelektrophorese 53
3.2 Western Blots 56
3.3 2D-Blots von Liquorproben 63
3.4 2D-Blots von Serumproben 73
3.5 Isoformen in Kortex-Blots 82
3.6 Vorläufige Versuche: Isoformen in Leber-Blots 84
3.7 Massenspektrometrische Analyse der α1-Antitrypsin-Isoformen 85
4. Diskussion 88
4.1 Diskussion der Methodik 88
4.2 Diskussion der Ergebnisse 93
4.3 Schlussfolgerung 109
5. Zusammenfassung 111
6. Literaturverzeichnis 113

Abkürzungsverzeichnis

2D-DiGE	Fluorescence Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
°C	Grad Celsius
2D	zweidimensional
AAT/ α1-AT	α1-Antitrypsin
AD	Morbus Alzheimer
APP	Amyloid-Precursor-Protein
Aqua bidest.	Aqua bidestillatus, zweifach-destilliertes Wasser
Aqua dest.	Aqua destilatus
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovine serum albumine
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl- ammonio]-1-propane sulfonate
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung
cm	Zentimeter
CuSO4	Kupfersulfat
DLB	Lewy-Body-Demenz
DMF	Dimethylformamid
DSM	Diagnostic and Statistical Manual
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EEG	Elektroencephalogramm
FTLD	Frontotemporale Demenz
g	Gramm
HCl	Hydrochloric acid
H_2O bidest	Aqua bidestillatus
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IPG	Immobiline™ dry polyacrylamide gel strips
kDa	kiloDalton

l	Liter
LBD	Lewy-Body-Demenz
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption/ Ionisation time of flight mass-spectrometry
M	Mol pro Liter
MMSE	Mini-Mental State Examination
Mg	Milligramm
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl (number)
Na	Natrium
NL	nicht-linear
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PD	Morbus Parkinson ohne Demenz
PDD	Morbus Parkinson mit Demenz
pH	pontentia Hydrogenii
pI	isoelektrischer Punkt
PMF	Peptidmassen-Fingerprint
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
r/min	rounds/minute, Umdrehungen/Minute
REM	Rapid Eye Movement
ROC	Receiver Operating Characteristic
sec	Sekunde
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
Temed	N,N,N',N'- Tetramethylethylene-diamine
Tris/TRIS	Trishydroxymethylaminomethane
Upm	Units per minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
ZAG	Zinc-alpha-2 Glycoprotein

1. Einleitung

1.1 Morbus Parkinson

Morbus Parkinson wurde das erste Mal im Jahre 1817 von James Parkinson (1755-1824), einem britischen Arzt, als einheitliches Krankheitsbild beschrieben [189]. Diese Erkrankung ist nach Morbus Alzheimer die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung [61, 84] und kommt in allen Bevölkerungsgruppen vor. Die Prävalenz beträgt unter den 60-jährigen 1 %, bei den 80-jährigen steigt sie auf 3 % an [60], wobei Männer und Frauen etwa gleich häufig betroffen sind [48].

Die Kardinalsymptome des Morbus Parkinson sind Rigor, Tremor und Brady- oder Akinese sowie posturale Instabilität. Neben dieser Symptomkonstellation kommen auch nicht-motorische Symptome bei bis zu 60 % der Patienten vor [42, 43]. Zu diesen fakultativen Begleitsymptomen gehören sensorische Symptome wie Dysästhesien und Schmerzen. Weiterhin sind autonome Dysfunktionen wie orthostatische Hypotonie, verlangsamte Magenentleerung und Obstipation, gestörte Thermoregulation, REM-Schlafstörungen und Miktionsstörungen zu finden [16, 65, 147]. Zu den psychischen Veränderungen zählen Demenz, Depression und visuelle Halluzinationen. Diese sind zwar häufig, treten jedoch nicht in allen Fällen auf [188]. Diese nicht-motorischen Symptome führen zu einer deutlichen Reduktion der Lebensqualität, zu Komorbiditäten und zu frühzeitiger Hospitalisierung [43].

Die Mortalität unter Parkinson-Patienten ist zwei- bis fünffach höher als in altersangepassten Kontrollgruppen [18, 142]. Wenn die Erkrankung unbehandelt bleibt, sind 80% der Patienten innerhalb von 10 bis 14 Jahren nach Beginn der Erkrankung schwer behindert oder verstorben [198]. Dieses erhöhte Risiko bei Parkinson-Patienten ist unter anderem auf vermehrte Gangunsicherheiten zurückzuführen [18].

Die Ursache für Morbus Parkinson ist eine Degeneration von dopaminergen Neuronen, die von der Substantia nigra in das Striatum projizieren [20]. Als vermutliches Zeichen der Degeneration kommt es zu einer Ablagerung von Lewy-Körperchen, welche aus α-Synuklein bestehen [109]. Diese Degeneration ist progredient, so dass nach und nach alle Zellen der Substantia nigra zerstört werden. Neben dem Abbau von Neuronen in der Substantia nigra kommt es im

gesamten Zentralen Nervensystem zu einer Neurodegeneration [24]. Der Zellverlust bei Morbus Parkinson hat ein spezifisches Muster: Innerhalb der Pars compacta der Substantia nigra ist der Zellverlust in der ventrolateralen Schicht am höchsten [74]. Zu Beginn der Symptomatik beträgt er dort ca. 60 % bis 70 % [74]. Nach der ventrolateralen Schicht sind die medial-ventrale und die dorsale Schicht am stärksten von Zellverlust betroffen [74]. Dieses Muster korreliert auch mit dem Grad der Expression von mRNA für den Dopamintransporter [243]. Es wird davon ausgegangen, dass den nicht-motorischen Symptomen eine Degeneration von cholinergen, noradrenergen und serotinergen Systemen zugrunde liegt [123].

2003 haben Braak et al. Morbus Parkinson anhand der Verteilung der α-Synuklein-Einschlüsse in verschiedene Stadien eingeteilt [24]: Die Stadien 1 und 2 zeigen Lewy-Bodies und Lewy-Neuriten in der Medulla oblongata, Bulbus olfactorius und im unteren Stammhirn. In den Stadien 3 und 4 sind zusätzlich Alpha-Synuklein-Ablagerungen im oberen Stammhirn und im Mittelhirn sichtbar. In den Stadien 5 und 6 sind auch neokortikale Anteile betroffen [24, 124]. Die Verschlechterung der Symptome korreliert mit der Progression der Ablagerungen in den verschiedenen Regionen [100].

Die Gründe für das Absterben der Zellen sind bisher nicht vollständig geklärt. Allerdings wird von einem Zusammenspiel von oxidativem Stress, mitochondrialer Dysfunktion, Exzitotoxizität und der Zerstörung von Neuronen durch hohe Glutamatkonzentration, Eisenablagerung, veränderte Proteolyse und entzündlichen Veränderungen des Zentralen Nervensystems ausgegangen [153, 183]. Außerdem wurden Störungen des Ubiquitin-Proteasom-Systems und der Phosphorylierung nachgewiesen [105, 233]. Auch eine verstärkte Aktivität der Monoaminooxidase B, die Synthese von Stickstoffoxid, abnorme Faltung und Aggregation von Proteinen, reduzierte Expression von Wachstumsfaktoren, Depletion von endogenen Antioxidantien - beispielsweise von reduziertem Glutathion - und eine veränderte Kalziumhomöostase sind vermutlich an der Pathogenese von Morbus Parkinson beteiligt [167].

Eine Ausnahme davon sind die Fälle von genetisch determinierten Morbus Parkinson [83]. Hier konnten für die Krankheit verantwortliche genetische Mutationen identifiziert werden. Betroffen sind beispielsweise Gene, die Alpha-Synuklein, Parkin, DJ-1, PINK-1 und LRRK-2 kodieren [233]. Mutationen in PARK-1 führten zu autosomal-dominant vererbten Morbus Parkinson mit einem frühen

Beginn der Erkrankung, im Durchschnitt im Alter von 46 Jahren. PARK-2 kodiert für Parkin, eine E3-Ubiquitin-Ligase, die am Abbau von falsch-gefalteten oder beschädigten Proteinen im Ubiquitin-Proteasom-Abbauweg beteiligt ist [131]. Mutationen in PARK-2 führen zu einem autosomal-rezessiv vererbtem Morbus Parkinson, bei dem es schon bei durchschnittlich achtundzwanzigjährigen Betroffenen zu ersten Symptomen kommt. Mutationen in PARK-5, dem Gen für die Ubiquitin C-terminale Hydrolase-L1, können zu einem autosomal-dominant vererbten Morbus Parkinson führen [248]. Es gibt aber auch Mutationen in PARK-5, die das Risiko von Morbus Parkinson verringern [158]. Genetische Fälle machen jedoch nur einen Anteil von ungefähr 15 % aus [252]. Die Mehrheit der Parkinson-Fälle entsteht sporadisch [233].

1.2 Demenz bei Morbus Parkinson

Zu den neuropsychiatrischen Symptomen bei Morbus Parkinson gehören Depressionen, Psychosen und kognitive Einschränkungen, beziehungsweise Demenzen [251]. Außerdem kommt es zu Veränderungen der Persönlichkeit [63]. Demenz kommt unter Parkinson-Patienten ungefähr sechsfach häufiger als bei gleichaltrigen gesunden Kontrollpersonen vor [209]. Die Punktprävalenz beträgt zwischen 28 % und 44 % [1, 66, 107, 110]. Die Inzidenz der Demenz steigt mit dem Alter an [170]: Unter den Parkinson-Patienten, die älter als 85 Jahre sind, beträgt die Häufigkeit von Demenzen ca. 65 % [170], bei den 90-jährigen Parkinson-Patienten ist die Demenz mit ca. 80-90 % sogar noch häufiger [197]. Aber bereits bei der Diagnosestellung können bei bis zu 36 % der Patienten kognitive Einschränkungen festgestellt werden [77], in frühen Stadien der Erkrankung haben schon bis zu 50 % der Patienten leichte kognitive Einschränkungen [34].

Neben dem Alter des Patienten ist die Entwicklung von Demenzen auch abhängig von der Krankheitsdauer [197]. Zehn Jahre nach Beginn der Erkrankung hat sich bei durchschnittlich 75 % der Parkinson-Patienten eine Demenz entwickelt [7, 34]. In der Menge aller Dementen begründen 3-4 % aller Fälle auf Morbus Parkinson [57].

Die Häufigkeit von Depression unter dementen Parkinson-Patienten ist ungefähr zehnfach höher als unter nicht-dementen Parkinson-Patienten [2]. Auch die

Anzahl der Krankenhauseinweisungen ist bei dementen Patienten zehnfach höher [2]. Zusätzlich sind untypische neurologische Charakteristika häufiger bei dementen Patienten: Autonome Dysfunktionen treten früher auf, die Symptome treten eher symmetrisch in Erscheinung und der therapeutische Effekt von Dopamin-Agonisten ist tendenziell schwächer [2].

Pathologisch zeigen sich bei dementen Parkinson-Patienten eine erhöhte Lewy-Körperchen-Dichte und eine verminderte Menge von Neurotransmittern - vor allem von Acetylcholin - in neokortikalen und limbischen Hirnarealen [101]. Es ist davon auszugehen, dass eine Ursache für die kognitiven Einschränkungen die veränderten Mengen von dopaminergen, serotinergen und cholinergen Neurotransmittern sind [63, 71, 125, 209].

Außerdem scheinen bei dementen Parkinson-Patienten vermehrt andere subkortikale Strukturen wie der Nucleus basalis (Meynert) und der Locus caeruleus betroffen zu sein. Auch kortikale Bereiche, vor allem der entorhinale Kortex, sind bei dementen Patienten vermehrt betroffen [114]. Außerdem wurde beschrieben, dass Demenzen bei einem erhöhten Zellverlust in der medialen Substantia nigra vermehrt vorkommen [85]. Nach Churchyard et al. korreliert der Grad der kognitiven Einschränkung mit der Dichte von Lewy-Neuriten im CA2-Feld im Hippocampus [46].

Der Nachweis von Lewy-Körperchen eignet sich nicht zur Diagnose eines Morbus Parkinson oder einer Demenz bei Morbus Parkinson. Auch bei 2 bis 20 % der Normalbevölkerung werden α-Synuklein-Ablagerungen gefunden [190]. Es wird nur bei 20 % aller Patienten, in deren Cortex α-Synuklein-Ablagerungen nachgewiesen wurden, ein Morbus Parkinson mit Demenz oder eine Lewy-Body-Demenz diagnostiziert [190]. Selbst in der Substanti nigra kommen bei ca. 10 % der nicht an Morbus Parkinson erkrankten, älteren Bevölkerung Lewy-Körperchen vor. Dies zeigt, dass insbesondere bei Morbus Parkinson mit Demenz pathologische Untersuchungen von Proben des Gehirns nicht von Nutzen bei der Diagnosestellung sind. Auch zur Diagnosestellung einer Demenz bei bekannten Morbus Parkinson eignet sich die Analyse der α-Synuklein-Ablagerungen nur bedingt: Ungefähr 45 % aller Parkinson-Patienten mit Lewy-Körperchen im Kortex zeigten keine kognitiven Einschränkungen [190].

Risikofaktoren für die Entwicklung einer Demenz sind eingeschränkte visuospatiale und exekutive Funktionen, schwere motorische Symptome und - als

Folge der Therapie auftretende - visuelle Halluzinationen [1, 101]. Weitere Risikofaktoren sind die Dauer der Erkrankung und atypische Symptome wie ein akinetisch-rigides Syndrom mit symmetrischer Entwicklung der Symptome, eingeschränkter Gleichgewichtssinn, Depression, autonome Dysfunktionen, Gangunsicherheit und eine abgeschwächte Antwort auf L-Dopa [71, 73]. Außerdem sind psychiatrische Symptome wie Depression oder Psychose, leichte kognitive Einschränkungen und das männliches Geschlecht Risikofaktoren [197, 242]. Auch Patienten, , die bei Beginn der Erkrankung älter als 70 Jahre sind, bei denen die Parkinson-Erkrankung also spät auftritt, entwickeln früher eine Demenz [100]. Patienten mit einem niedrigen Ausgangswert im MMSE-Score von unter 29 und Patienten mit einem niedrigen Bildungsniveau haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko [1, 5].

Das Risiko für einen Parkinson-Patienten, eine Demenz zu entwickeln, ist auch abhängig von der genetischen Mutation. Zum Teil kann eine familiäre Häufung von Demenz bei Angehörigen von Patienten mit Morbus Parkinson und Demenz beobachtet werden [168]. Bei Patienten mit PARK 1, 4 und 8, die auch Lewy-Körperchen exprimieren, ist Demenz ein Teil des Phänotyps [120, 266]. Bei Patienten mit PARK 2 kommt es hingegen nicht zu der Ausbildung einer Demenz [75, 156]. Bei Untersuchungen von ApoE-Genotypen konnte in manchen Studien eine positive Korrelation mit E2- und E4-Allelen nachgewiesen werden [103, 192], in anderen eine negative Korrelation [36].

Die Art der Demenz ist bei Morbus Parkinson anders als bei Morbus Alzheimer [72], sie gleicht der Demenz bei Lewy-Körperchen-Demenz [72]. Die mit Morbus Parkinson assoziierte Demenz gehört wie auch die Lewy-Body-Demenz zu den gemischt kortikalen-subkortikalen Demenzen [88, 112].

Die cholinergen Defizite sind bei Morbus Parkinson stärker ausgeprägt als bei Morbus Alzheimer [72]. Der Prototyp der Demenz bei Parkinson ist ein dysexekutives Syndrom mit eingeschränkter Aufmerksamkeit, verschlechterten exekutiven Funktionen und eingeschränkter Gedächtnisfunktion [72]. Außerdem ist der Redefluss beeinträchtigt [255]. Mit der Demenz gehen Veränderungen des Verhaltens einher – zu diesen gehören optische Halluzinationen, die bei ca. 40-76% auftreten [4, 6], emotionale Veränderungen, Veränderungen der Persönlichkeit, ausgeprägte Tagesschläfrigkeit und Apathie [73, 88, 101]. Weiter treten zusammen mit Demenz Störungen der REM-Phasen, Psychosen und

Depressionen auf [101]. Depressionen sind mit einer Prävalenz von 13% bei Morbus Parkinson-assoziierter Demenz deutlich häufiger als bei Morbus Parkinson ohne Demenz. Hier kommen sie nur zu 9 % vor [6]. Zu den kognitiven Veränderungen gehören Einschränkungen der Aufmerksamkeit, der exekutiven und visiospatialen Funktionen, der Erinnerung und der Sprache [88].

Folgen der Demenz für den Patienten sind eine erhöhte Mortalität, ein erhöhtes Risiko für eine Institutionalisierung und ein vermehrter Pflegeaufwand. Dies erzeugt zusätzlichen psychischen Druck für den Patienten und seine Umwelt. Die Angehörigen leiden vermehrt unter Depressionen, kognitiven Beeinträchtigungen und Wahnvorstellungen [3]. Die Entwicklung von Demenzen hat also einen deutlichen Einfluss auf die Lebensqualität von Parkinson-Patienten [214] und deren Angehörigen [3, 161]. Auch die Lebenserwartung ist bei diesen Parkinson-Patienten vermindert [181] - Demenz trägt signifikant zur Morbidität und Mortalität bei Morbus Parkinson bei [116]. Ebenfalls trägt die Entwicklung einer Demenz zu einer Progression der Morbus Parkinson bei [161]. Erwähnenswert sind auch die ökonomischen Auswirkungen. Besonders der Umzug in ein Pflegeheim ist für eine Kostenerhöhung um bis zu 500 % verantwortlich [76]. Da davon auszugehen ist, dass die Anzahl der Parkinson-Patienten in den nächsten Jahren deutlich steigen wird [61], kommt auch der Demenz bei Morbus Parkinson eine zunehmend wichtige Rolle zu.

Da für die Behandlung der Kardinalsymptome Rigor, Tremor und Akinese effektive Therapien zur Verfügung stehen und somit die aus diesen Symptomen entstehenden Probleme verringert werden können, gewinnt das Problem der Demenz bei Morbus Parkinson stetig an Bedeutung. Therapeutisch werden bei dementen Parkinson-Patienten Acetylcholinesterase-Inhibitoren eingesetzt, die zumindest einen mäßigen symptomatischen Effekt haben [101]. Eine frühzeitige Behandlung ist entscheidend für den weiteren Verlauf [221].

1.3 Diagnose von Morbus Parkinson

Die Diagnose Morbus Parkinson wird aufgrund von klinischen Kriterien und neuropsychologischen Untersuchungen gestellt [113, 150]. Da dieses aufgrund der vielen möglichen Symptome und des oft unspezifischen Beginns schwierig ist, kommt es öfter zu einer erst späten Diagnosestellung. Die Genauigkeit bei der

Diagnose von Morbus Parkinson beträgt weniger als 80 % [115]. Es gibt bisher keinen biochemischen Marker, durch den die Diagnose gestellt werden kann. Der Goldstandard für die Diagnose ist nach wie vor die neuropathologische Untersuchung.

Die Diagnose von Demenz bei Morbus Parkinson wird basierend auf von M. Emre et al. im Jahre 2007 verfassten Kriterien gestellt [73]. Dazu gehört, dass in mehr als einem Bereich des täglichen Lebens kognitive Einschränkungen festgestellt werden und dadurch das tägliche Leben beeinträchtigt ist. Auch Dubois et al. haben 2007 Kriterien für die Diagnose von PDD und für die Charakterisierung der Demenz festgelegt [64]. Bothe et al. empfehlen eine umfangreiche neuropsychologische Testbatterie zur Diagnosestellung [23].

Studien an Autopsien zeigen, dass die Diagnose Morbus Parkinson in 24 % der Fälle nicht korrekt gestellt war [204], wobei die häufigsten Fehldiagnosen progressive supranukleäre Paralyse, Multisystematrophie und Morbus Alzheimer sind [113].

Insbesondere die späte Diagnosestellung und die schwerwiegenden Folgen einer Demenzerkrankung begründen die Bedeutung der Forschung an biochemischen Markern, die eine sichere Diagnosestellung erlauben und so die Patienten früher einer sachgemäßen Therapie zuführen.

1.4 Therapie bei Morbus Parkinson

Die bisher angewandten Medikamente bewirken nur eine Verbesserung der Symptome, noch gibt es keine kausale Behandlung des Morbus Parkinson. Die dopaminergen Neuronen können bisher nicht erhalten werden. Dies liegt unter anderem daran, dass die Vorgänge, die zum Absterben der dopaminergen Neuronen führen, nicht vollständig erforscht sind [233].

In Tiermodellen kann durch Einsatz von Eisenchelatoren, Radikalfänger als Antioxidantien, MAO B-Inhibitoren, Glutamat-Antagonisten, Stickstoffmonoxid-Synthase-Inhibitoren, Kalziumkanalantagonisten und Wachstumsfaktoren eine Neuroprotektion erreicht werden [167]. Bisher konnte dieser Erfolg klinisch nicht reproduziert werden [41, 167].

Auch die Demenz bei Morbus Parkinson ist als solche nicht kausal therapierbar. Wenn man allerdings schon kognitive Defizite in frühen Stadien behandelt, kann

der Verlauf der Demenz verzögert und damit stabilisiert werden. Bei PDD bestehen cholinerge Defizite, daher werden bei dieser Form der Demenz therapeutisch vor allem Acetylcholinesteraseinhibitoren eingesetzt [197, 208]. Von den Acetylcholinesteraseinhibitoren wird zur Therapie in erster Linie Rivastigmin genutzt [197]. Unter dieser Therapie wird eine Verbesserung von Erinnerungsvermögen und Sprache beobachtet [213, 253]. Andere Medikamente, die zur Therapie von PDD genutzt werden, sind Donepezil, Galantamin und Memanin [39].

1.5 Alpha-Synuklein

Alpha-Synuklein wird bei Morbus Parkinson vermehrt abgelagert - entweder in Form von Lewy-Körperchen oder Lewy-Neuriten [100]

Es ist ein präsynaptisches Protein, das nach bisherigen Erkenntnissen an der Widerherstellung der präsynaptischen Vesikel, der Aufbewahrung und Kompartimentierung von Neurotransmittern beteiligt ist [261]. Außerdem ist es mit membranösen und vesikulären Strukturen verbunden [261]. Es sind drei Mutationen von menschlichem Alpha-Synuklein bekannt, die an der Entstehung der erblichen Form des Morbus Parkinson beteiligt sind: A30P, E46K und A53T [41]. Das Alpha-Synuklein-Protein hat eine Länge von 200-600 nm und einen Durchmesser von 5-10 nm [87]. Es konnte nachgewiesen werde, dass α-Synuklein protektiv wirkt, wenn es überexprimiert wird [69].

1.6 Lewy-Bodies

Lewy-Bodies sind runde, eosinophile Einschlüsse im Zellsoma und in den Neuriten von bestimmten Neuronen-Populationen, die vor allem in der Substantia nigra auftreten [222]. Ein wichtiger Bestandteil sind α-Synuklein-Filamente [87], aber auch andere Proteine sind in den Lewy-Bodies vorhanden: Ubiquitin [138], Proteasom-Einheiten [119], Heat-shock-Proteine [13] und Neurofilamente [80]. Die Bestandteile können in vier Gruppen aufgeteilt werden: Einerseits strukturelle Elemente der Lewy-Body-Filamente; zum anderen Proteine, die als zelluläre Antwort auf die Bildung von Lewy-Bodies entwickelt wurden. Weiterhin sind Enzyme wie Phosphatasen und Kinasen sowie andere zytosolische Proteine, die

bei der Bildung der Lewy-Bodies eingeschlossen wurden, zu finden [199]. Bei Morbus Parkinson treten die Lewy-Bodies vor allem im Hirnstamm, Cerebellum, Hypothalamus und im autonomen Nervensystem auf [44, 58, 247].

Lewy-Bodies treten im natürlich alternden Gehirn und bei mehreren neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Lewy-Body-Demenz auf [87]. Auch bei Morbus Alzheimer trifft die klassische Alzheimer-Pathologie öfters mit α-Synuklein-Pathologien zusammen [190]. Bis zu 60 % der Patienten mit Morbus Alzheimer zeigen α-Synuklein-Ablagerungen in der Amygdala [102, 190]. In dem Großteil aller Gehirne von Patienten mit Morbus Parkinson können Lewy-Bodies nachgewiesen werden [115]. Im Gehirn von gesunden Personen ist die Prävalenz von den Lewy-Bodies altersspezifisch: Bei den 60-jährigen liegt die Prävalenz bei 3,8 %, bei den 80-jährigen bei 12,8 % [84]. Die Lewy-Bodies sind also nicht pathognomonisch für Morbus Parkinson. Parkinnen et al. zeigten 2005, dass ca. 45 % aller Parkinson-Patienten mit Lewy-Körperchen im Kortex keine kognitiven Einschränkungen aufwiesen [190]. Dies zeigt, dass der Nachweis von Lewy-Körperchen alleine bei Patienten mit Morbus Parkinson nicht zur Diagnose einer Demenz ausreicht. Parkinnen et al. zeigten 2005 ebenfalls, dass sich weder die Anzahl noch die Verteilung an α-Synuklein-positiven Einschlüssen bei LBD und NDC unterscheiden [191].

Es wird noch diskutiert, ob die Lewy-Bodies neuroprotektiv oder zytotoxisch sind. Einige Studien deuten darauf hin, dass die Zellen, die Lewy-Bodies enthalten, sich damit vor dem Absterben geschützt haben [236]. Andere Veröffentlichungen zeigen, dass die Menge der Lewy-Bodies im Verhältnis zu den klinischen Symptomen steht [117].

Eine weitere pathologische Besonderheit bei Morbus Parkinson sind die Lewy-Neuriten. Diese sind Ubiquitin-positive neuronale Fortsätze oder Neuriten und werden in allen betroffenen Hirnregionen gefunden [79].

1.7 Serpine

Proteasen werden abhängig von ihrem katalytischen Zentrum in Serin-, Aspartat-, Metallo-, Threonin- und Cystein-Proteasen unterteilt [33].

Serpine sind spezifische und irreversible Inhibitoren von Serin-Proteasen [90]. Zu den Serin-Proteasen gehören Neuropsin, Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und verschiedene Blutgerinnungsfaktoren wie Plasmin und Thrombin [249].
Serinproteasen haben verschiedene Aufgaben, zu denen neuronale Entwicklung, Plastizität, Neurodegeneration und Neuroregeneration gehören [249]. Serpine sind an der Regulation von Entzündungen, Thrombosen und der Komplementkaskade beteiligt [90]. Neuropsin, eine der Serinproteasen, reguliert das Lernvermögen und das Gedächtnis. Andere Serpine neben α1-Antitrypsin sind α1-Antichymotrypsin, Antithrombin, Heparin Cofaktor II und C1-Inhibitor [90].
Es gibt Hinweise darauf, dass die Ablagerung von Serpinen neurodegenerative Erkrankungen mit Demenzen verursacht [51, 56, 159].

1.8 α1-Antitrypsin (=Serpin A1)

α1-Antitrypsin gehört zu den Akute-Phase-Proteinen [133], die bei entzündlichen Stimuli in das Plasma freigesetzt werden. Es besitzt antiinflammatorische Eigenschaften [234], unter anderem durch Hemmung von proinflammatorischen Zytokinen [201]. Es wirkt ausgleichend zwischen Proteasen und Antiproteasen [135]. α1-Antitrypsin ist ein Sialoglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 52 kDa [211] und besteht aus einer Polypeptidkette mit 394 Aminosäuren [59, 175]. α1-Antitrypsin setzt sich aus drei β-Faltblättern zusammen, die von neun α-Helices umgeben sind [59]. Bei der Serumelektrophorese macht es den Hauptteil der Subregion 1 der Alpha-Globuline aus [15]. α1-Antitrypsin wird zum größten Teil in Leberzellen produziert [92], ein kleinerer Teil entsteht auch in Monozyten und Epithelzellen der Lunge [25, 163]. Ebenso wurde in osteoblastischen Stammzellen die Produktion und Sekretion von α1-Antitrypsin nachgewiesen [136]. Anschließend wird es ins Plasma sezerniert, wo es in einer Plasmakonzentration von 1,5-3,5 g/l vorliegt [52]. Die Halbwertszeit liegt bei vier bis fünf Tagen [25]. Bisher sind mehr als 90 genetische Varianten des hochpolymorphen humanen A1-Antitrypsins bekannt [163, 211, 237].
α1-Antitrypsin hemmt verschiedene Serin-Proteasen, zu denen Cathepsin G [237], Proteinase 3 [237], Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin, Kallikrein und Plasmin gehören [151]. Die Hauptfunktion von α1-Antitrypsin ist jedoch die Hemmung der Neutrophilen Elastase. Diese kommt hauptsächlich in der Lunge vor. Ist bei α1-

Antitrypsin–Mangel der Abbau der Elastase gestört, kommt es zu einem proteolytischem Abbau von Lungengewebe und dadurch bei Erwachsenen zu Lungenemphysemen [25]. Auch führt α1-Antitrypsin–Mangel durch reduzierte Funktion zu Lebererkrankungen [25].

1.9 Tau-Protein

Das Tau-Protein ist mit Mikrotubuli assoziiert. Es ist vor allem im Zentralen Nervensystem lokalisiert [14] und kommt physiologisch in Neuronen vor [162]. Das Tau-Protein ist an einer Anzahl von neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt, unter anderem an Morbus Parkinson [55].

Bei Tauopathien löst sich das lösliche Tau- Protein von den Mikrotubuli und bildet abnorme, fibrilläre Strukturen von aggregiertem, hyperphosphoryliertem und ubiquitiniertem Tau [97, 98, 162]. Beim Menschen sind sechs verschiedene Isoformen von Tau-Proteinen bekannt [149].

Die Funktion von Tau ist abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus. Bei Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson besteht eine Hyperphosphorylierung von Tau-Protein. Dadurch kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation. Es wird diskutiert, dass eine toxische Interaktion mit Alpha-Synuklein zu der Hyperphosporylierung von Tau und zur Ablagerung beider Proteine im ZNS bei dieser Erkrankung führt [149].

1.10 Amyloid-β

Das Protein Amyloid-β 1-42 ist ein Abbauprodukt des Amyloid-Precursor-Proteins [230]. Das Vorläuferprotein gehört zu den Typ I–Membranproteinen und wird durch Alpha-, Beta- und Gamma-Sekretase (Zinkmetalloproteasen) in lösliche Produkte gespalten [82, 230, 232], unter anderem in Amyloid-β-Peptide. Diese stellen den Hauptanteil der Amyloid-Plaques bei Alzheimer-Patienten [232], [230]. Man geht davon aus, dass die Aggregation und Ablagerung von Amyloid-Proteinen der Pathogenese des Morbus Alzheimer zugrunde liegt. Sie führen zur Schädigung und zum Absterben von Neuronen und erhöhen deren Empfindlichkeit gegenüber Exzitotoxizität [169]. Hohe Amyloid-β-Werte beschleunigen die Entwicklung einer Demenz bei Morbus Parkinson [49].

1.11 DiGE

Die DiGE ist eine 2-D Gelelektrophorese, die mit der Markierung von Proteinen mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen kombiniert wird. Durch Nutzung der DiGE ist die Untersuchung des Proteoms möglich. Dies ist von Bedeutung, da die Proteinexpression das Effektororgan der zellulären Antwort auf Biomaterialien, Krankheiten oder Medikamente ist [172, 175]. Daher ist zu erwarten, dass eine Veränderung der Proteinexpression mit Veränderungen des Zellstatus einhergeht [172, 175]. Krankheiten selbst und das Verabreichen von Medikamenten resultieren in einer charakteristischen Veränderung des Proteinmusters von Zellen oder Gewebe. Durch die Untersuchung des Proteoms können Veränderungen im Expressionslevel der Proteine, der Isoformen und posttranslationalen Modifikationen näher betrachtet werden [148]. Dadurch kann ein Einblick in den physiologischen Status und die Funktion der Zelle gewonnen werden [172]. Bei der Untersuchung des Genoms hingegen ist lediglich die Feststellung der Aminosäurensequenz möglich, jedoch ist keine Aussage über die Expression der Proteine zu treffen [175].

Die DiGE bietet durch Analyse des Proteoms die Möglichkeit, globale Veränderungen im Proteinprofil der Zelle zu untersuchen und veränderte Proteine nachzuweisen. So können zudem Biomarker gefunden werden, die mit der Antwort der Zelle oder des Gewebes auf verschiedene Materialien oder Veränderungen verbunden sind und Hinweise auf die Physiologie oder Pathogenese von Erkrankungen geben können [148]. So ist es möglich, die Auswirkungen von Krankheiten oder Medikamenten auf die Menge oder die Verteilung der Isoformen zu untersuchen [148, 172]. Dadurch kann man Proben auf Veränderungen screenen, die für den jeweiligen Zustand charakteristisch sind.

Durch Nutzung von Fluoreszenzfarbstoffen können auf einem Gel bis zu drei Proben pro Gel aufgetrennt werden. Die DiGE ist hoch auflösend, da bis zu 5000 Proteine aufgetrennt werden können [216]. Weitere Vorteile bestehen darin, dass schon geringe Probenvolumina für eine Untersuchung ausreichend und komplexe Analysemöglichkeiten möglich sind. Zu diesen Möglichkeiten gehört der Vergleich von Proben sowohl unter unterschiedlichen Bedingungen als auch im zeitlichen Verlauf [172].

1.12 Biomarker

Biomarker sind Anzeiger für normale physiologische Prozesse, pathologische Veränderungen oder pharmakologische Reaktionen auf therapeutische Intervention [12, 39]. Sie werden objektiv gemessen und validiert [39]. Die Bestimmung der Biomarker dient unterschiedlichen Zwecken: Neben der Diagnosestellung können die Biomarker auch die Bestimmung des Ausmaßes der Krankheit und der aktuellen Krankheitsaktivität erleichtern. Außerdem ist es möglich, dass Biomarker bei dem Erkennen der Prognose oder der Auswirkungen von Interventionen auf die Krankheit helfen [12]. Weiterhin ist es denkbar, durch Biomarker Einblick in die Pathogenese einer Erkrankung zu bekommen. Von einem guten Biomarker wird erwartet, zuverlässig und reproduzierbar zu sein. Außerdem sollte er nicht-invasiv gewonnen werden und preiswert zu untersuchen sein [177].

1.13 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Da der Demenz bei Morbus Parkinson aufgrund der immer effektiveren Therapie der anderen Symptome eine stets größere Bedeutung zukommt, ist es wichtig, diese frühzeitig zu entdecken und zu behandeln [221]. Da neuroprotektive Therapien am wirkungsvollsten vor Beginn oder in frühen Stadien einer Demenz sind, ist ein Diagnoseverfahren, das die Demenz zuverlässig voraussagen kann, von großer Bedeutung [221]. Da bei 2 bis 20 % der Normalbevölkerung α-Synuklein-Ablagerungen nachgewiesen werden können, eignet sich der Nachweis dieser nicht zur Diagnosestellung eines Morbus Parkinson [190].

Das Ziel der hier vorliegenden Doktorarbeit ist es, Proteine in Liquor und Serum zu finden, die im Vergleich der drei Versuchsgruppen von Parkinson-Patienten mit und ohne Demenz und der nicht-dementen Kontrollgruppe untereinander verändert oder neu aufgetreten sind. Dies geschieht, um geeignete Biomarker zu finden – mit dem Zweck, diejenigen Parkinson-Patienten, die sich in einem frühen Stadium einer Demenz befinden, möglichst früh zu identifizieren. Weiterhin sollen die veränderten Proteine dazu dienen, das Verständnis für den Pathomechanismus bei PDD zu verbessern. Zu diesem Zwecke werden mehrere Proteine bei nicht-dementen Kontrollpersonen (NDC), Parkinson-Patienten (PD)

und Parkinson-Patienten mit Demenz (PDD) in Hinblick auf ihre diagnostische Bedeutung untersucht.

Für die Identifikation von Biomarkern gibt es verschiedene Wege: Neben der Untersuchung des Proteoms kommen auch Expressionsanalysen der mRNA in Frage. Diese liefern aber keine optimalen Ergebnisse, da mRNA- und Protein-Level nicht notwendigerweise korrelieren [180]. Außerdem können durch posttranslationale Veränderungen verschiedenen Isoformen entstehen. Daher wird für die vorliegende Fragestellung die Untersuchung des Proteoms gewählt.

Zu Beginn wird eine DiGE von Proben von nicht-dementen Kontrollpersonen, Parkinson-Patienten und Parkinson-Patienten mit Demenz untersucht und die jeweiligen Proteinmengen verglichen. Diejenigen Proteine, die signifikant reguliert sind, werden ausgewählt und massenspektrometrisch identifiziert. Anschließend werden zur Bestätigung der Ergebnisse der DiGE 1D- und 2D-Western Blot durchgeführt. Nur bei dem Protein α1-Antitrypsin bestätigte sich die Regulation. Aus diesem Grund wird es genauer in Hinblick auf Isoformen untersucht. Da dieses Protein sowohl zu den Akute-Phase-Proteinen gehört, als auch beim Abbau verschiedener Proteasen beteiligt ist, ist gerade bei diesem die Frage, ob es signifikant reguliert ist, sehr wichtig für einen tieferen Einblick in die Pathogenese von PD und PDD.

Außerdem kann es interessant sein, bei der signifikanten Regulation eines Proteins der Frage nachzugehen, an welchem Ort im menschlichen Organismus die zusätzliche Menge und die zusätzlichen Isoformen von diesem Protein produziert oder sezerniert wird. Auch dies kann Aufschluss über die Pathogenese geben.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten und gesunde Kontrollpersonen

2.1.1 Patienten

Alle Liquor-Proben für die proteomische Analyse wurden von Patienten der Neurologie des Universitätsklinikums Ulm in den Jahren 2006 und 2007 entnommen.

Der Liquor wurde hierbei bei -80°C gelagert. Zusätzliche Liquor- und Serumproben für die Validierung der Ergebnisse der Proteomanalyse stammen aus zwei Quellen: Aus der Abteilung für Neurologie, Kuopio, Finnland (8 PD, 10 PDD) und aus der Abteilung für Neurologie, Perugia, Italien (8 PD, 8 PDD). Die Liquor- und Serumproben der NDC, AD, CJD und FTLD stammen ebenfalls aus der Neurologie des Universitätsklinikums Ulm und wurden in den Jahren 2006 und 2007 gesammelt. Sowohl die Sammlung als auch die Untersuchung der Liquor- und Serumproben wurden von der Ethik-Kommission zugelassen und entsprachen der Deklaration von Helsinki aus dem Jahr 1964. Es liegt von jedem Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung für die Teilnahme an der Studie vor. Bei dementen Patienten wurde das Einverständnis von den Angehörigen gegeben.

Bei allen Patienten wurde eine klinische, neurologische und neuroradiologische Untersuchung durchgeführt, sowie ein kurzes neuropsychologisches Screening zur Untersuchung der globalen kognitiven Funktion vorgenommen. Dieses Screening dient der eindeutigen Klassifizierung des mentalen Status und dem Ausschluss von depressiven Symptomen. Alle PD und PDD Patienten wurden mit einer ausführlichen psychometrischen Testbatterie begutachtet. Die zu dieser Testbatterie gehörenden Teste sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1:Psychomotorische Testbatterie

Mini Mental State Test [9]
Geriatric Depression Scale [262]
Parkinson Neuropsychometric Dementia Assessment [129]
Regensburger Wortflüssigkeitstest [240]
Doors Test [229]
Alertness/Go/Nogo/geteilte Aufmerksamkeit [75]
Boston Naming Test [176]
Wechsler-Memory Scale [227]
Coloured Progressive Matrices [185]
Visual Object and Space Perception Battery [206]
Uhrentest [241]
Wortschatztest: Schmidt, Metzler

Die Diagnose von den Parkinson-Patienten wurde nach den Kriterien für PD/PDD [171] und nach den DSM- IV Kriterien gestellt. Sie wurde in Zusammenarbeit von Neurologen und Neuropsychologen ermittelt. Alle Untersucher waren in Bezug auf die neurochemischen Ergebnisse verblindet.

2.1.2 Gesunde Kontrollpersonen

Die nicht-dementen Kontrollpersonen zeigten weder Symptome von extrapyramidal-motorischen Störungen noch von Demenz. Die Diagnosen der Kontrollpersonen sind der Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 2: Diagnosen der nicht-dementen Patienten (Kontrollgruppe zu PD und PDD)
Daten aus Universitätsklinikum Ulm, 2007 bis 2008

Diagnose	**Anzahl**
Ischämie	9
Komplex-fokale Epilepsie	4
Polyneuropathien	3
Lumboischalgien	3
Migräne	2
Pseudotumor cerebri	2
dissoziative Störungen	2
Autoimmunerkrankungen	1

2.2 Neuropathologie

Das menschliche Kortexgewebe stammt aus der German Brain Bank **(**Ludwig-Maximilian Universität, München). Die beiden LBD-Patienten im Altern von 63 und 80 Jahren befanden sich im Braak Stadium II und III. Lewy-Körperchen wurden hier neokortikal beschrieben. Die beiden gesunden Kontrollpersonen im Alter von 59 und 46 Jahre befanden sich im Braak Stadium 0 und I. Hier wurden keine Lewy-Körperchen beschrieben.

2.3 Chemikalien und Materialien

2.3.1 Chemikalien

Acrylamid-Bis 30%, BioRad, Hercules CA, USA

Agarose Biozym, Sigma, Steinheim, Deutschland

Albumin und Ig-Depletion Kit „Slurry“RPN 6300, GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Schweden

APS (Ammoniumperoxidsulfat), AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Bicinchoninsäure (BCA) Thermo Scientific, Rockford, IL, USA

Borsäure, Baker, Deventer, Holland

Bromphenolblau, Merck KGa, Darmstadt, Deutschland

Butanol, Merck KGa, Darmstadt, Deutschland

CHAPS (reinst), Merck KGa, Darmstadt, Deutschland
Complete Mini Tabletten, Roche, Mannheim, Deutschland
Coomassie-Brilliant-Blau, Serva, Heidelberg, Deutschland
Cover-Fluid (Paraffin-Öl); GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Schweden
CyDye-Farbstoffe, (Cy 2, Cy 3, Cy 5) Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Dithiothreitol (DTT) (Äquilibrieren: Applichem, Darmstadt; Rehydrieren: Sigma, Steinheim, Deutschland)
DryStrip Cover Fluid, GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Schweden
ECL Plus, GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Schweden
Essigsäure (10%), Merck KGa, Darmstadt, Schweden
Ethanol absolut Sigma, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin Fluka, Steinheim, Deutschland
Glycin, Merck KGa, Darmstadt, Deutschland
Harnstoff (reinst) Fluka, Steinheim, Deutschland
Iodacetamid Sigma, Steinheim, Deutschland
IPG-Puffer pH 4-7, 3-10 NL, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
IPG-Strips 7 cm, pH 4-7, pH 3-10 NL, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Isopropanol absolut, Sigma, Steinheim, Deutschland
Kupfersulfat (CuSO4) (4%), Sigma, Steinheim, Deutschland
Lysin, Applichem, Darmstadt, Deutschland
Magic Mark, Invitrogen, Carlsbad, USA
Mercaptoethanol, Sigma, Steinheim, Deutschland
Methanol, Sigma, Steinheim, Deutschland
Milchpulver, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS), Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumkarbonat, Merck KGa, Darmstadt, Deutschland
Natriumsulfat (Na2SO4) (5%), Sigma, Steinheim, Deutschland
PBS (pH = 8), Sigma, Steinheim, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA) SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Roti Load, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl), VWR, Darmstadt, Deutschland

Silbernitrat, AppliChem, Darmstadt, Deutschland
TEMED, Serva, Heidelberg, Deutschland
Thioharnstoff, Fluka, Steinheim, Deutschland
Trizma, Sigma, Steinheim, Deutschland

2.3.2 Lösungen und Puffer

Coomassie-Färbung:

Coomassie Stocklösung 1:

5 g Coomassue Brilliant Blue ad 100 ml A. bidest

Coomassie Stocklösung 2:

20 g H_3PO_4
100 g Ammoniumsulfat
800 mL A. bidest.
20 mL von Stocklösung 1
ad 1000 ml A. bidest (mindestens 1 h rühren)

Coomassie Working Solution:

80 mL Stocklösung 2
20 mL Methanol (mindestens 1 h rühren)

Entfärbelösung:

20 % v/v Methanol
2 % v/v Essigsäure
ad Aqua Bidest.

Stripping-Lösung:

5 mL Stripping Buffer (0,625 M Tris-HCL)
10 mL 10 %iger SDS-Lösung.
mit Aqua bidest auf 50 mL auffüllen
350 µL Mercaptoethanol.

Protease-Inhibitor:

Lösung von 1 Tablette Complete mini in
10 mL einer Tris-HCl-Lösung (pH-Wert von 7,4)

Kupfersulfatlösung ($CuSO_4$-Lösung) (Proteinbestimmung):

49 Teile BCA und 1 Teil Kupfersulfat

1,5 M TRIS-HCl-Lösung (pH 8,8)

Lösung von 182 g TRIS werden in 850 mL H_2O bidest
Hinzutitrieren von HCl, bis pH von 8,8 erreicht
mit H_2O bidest bis Volumen von 1 L auffüllen

10% SDS-Lösung:

20 g SDS wird mit Aqua bidest. auf 200 mL aufgefüllt.

10% APS-Lösung

1g APS wird mit Aqua bidest. 100 mL aufgefüllt

Displacing solution

25 % (v/v) 1,5 M Tris-HCl-Stammlösung
50 % (v/v) Glycerol
0,0002 % (w/v) Bromphenolblau

PBS-Tween

7,5 mL von 10 %iger Tween-Lösung werden in 1 L PBS gelöst.

Blotpuffer für Semy-Dry-Westernblots:

<u>Blotpuffer A:</u>
Stammlösung für Blotpuffer A: Tris 2,1 M, pH 10,4 (pH-Einstellung mit 0,5 M Borsäure)
Methanol 30 % v/v
Mit Aqua bidest auffüllen
<u>Blotpuffer B:</u>

Stammlösung Blotpuffer B und C: Tris 250 mM, pH 10,4 (pH-Einstellung mit 0,5 M Borsäure)

Methanol

Mit Aqua bidest ad auffüllen

Blotpuffer C:

Stammlösung Blotpuffer B und C

Bidest ad

0,5 M Borsäure

10 % w/v SDS

Mit Aqua bidest auffüllen

Rehydrierungspuffer (=Lysispuffer):

7 M Harnstoff (reinst),

2 M Thioharnstoff,

4 % (w/v) CHAPS (reinst),

1 % (w/v) DTT (reinst),

1 % (v/v) IPG-Puffer (den IPG-Streifen entsprechender pH-Wert)

Äquilibrierungspuffer 1:

1 % DTT

50 mM Tris-HCl pH 8,8

3 % SDS

6 M Harnstoff

30 % Glycerin

Äquilibrierungspuffer 2:

4 % IAA

50 mM Tris-HCl pH 8,8

3 % SDS

6 M Harnstoff

30 % Glycerin

Lösung für SDS-Polyacrylamidgele:

30 %igen Acrylamid-Lösung,

1,5 M TRIS-HCl-Lösung mit einem pH von 8,8

10 %ige SDS-Lösung

10 %ige APS-Lösung

100 % Temed

Aqua bidest.

Laufpuffer TRIS-Glycin-Gele:

Kathoden-Laufpuffer:

0,05 M Tris

0,384 M Glycin

0,2 % SDS

Anoden-Laufpuffer:

0,025 M Tris

0,192 M Glycin

0,1 % SDS

Trenngelpuffer

1,5 M Tris HCl pH 8,3

0,4 % SDS

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris HCl pH 6,8

0,4 % SDS

Trenngellösung für 12%-Polyacrylamidgele

Trenngelpuffer

12 % Acrylamid

10 %iges APS

Temed

Aqua bidest.

Sammelgellösung für Polyacrylamidgele

Sammelgelpuffer

4 % Acrylamid

10 %iges APS

Temed

Aqua bidest.

Agaroselösung:

Auflösung von 0,5 % (w/v) Agarose in Kathoden-Laufpuffer

Bromphenolblau

Block-Lösung:

5 g Milchpulver (5 % w/v) ad 100 ml PBS/Tween

Stripping-Lösung:

5 mL Stripping Buffer

10 mL 10 %iger SDS-Lösung.

mit Aqua bidest auf 50 mL auffüllen

350 µL Mercaptoethanol

2.3.3 Materialien

96-well Platte, Nunc, Roskilde, Dänemark

Albumin and IgG Removal Kit, GE-Healthcare, Uppsala, Schweden

Falconröhrchen (15 ml; 50 ml), Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Deutschland

Pipetten (10 µL, 20 µL, 100µL, 200µL, 1000µL), VWR, Darmstadt

Pipettenspitzen, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Polyvinyliden-Difluorid-Membran, Millipore, Eschborn, Deutschland

Blot Paper (Filterblätter für Semidry-Blots), Bio-Rad, München, Deutschland

Reagiergefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml), Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Safe Lock Tubes (Eppendorfgefäß), Eppendorf ,Hamburg, Deutschland

Transferpipetten 3 mL, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Vivaspin 2, Sartorius, Göttingen, Deutschland

Filterpapier, Whatman (GE), Healthcare Biosciences, Uppsala, Schweden

2.3.4 Geräte

Blotter, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland

CCD-Kamera, Fuji LAS 1000, Tokio, Japan

Electrophoresis Power Supply, Consort, Turnhout, Belgien

Eppendorf-Pipette: Eppendorf Reference 0,5–10 µL; Eppendorf 2–20µL; Eppendorf 20–200µL; Eppendorf 100–1000µL, Eppendorf, Hamburg

Ettan-Dalt II Elektrophoreseeinheit, Amersham Biotech, Uppsala, Schweden

Ettan DALT II Gießkammer, Amersham Biotech, Uppsala, Schweden

DryStrip Reswelling Tray, Amersham Biotech, Uppsala (Schweden)

ELISA-Reader EL x 800 Biotek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland

IPG-Phor GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA

Kühlschrank +4°C Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland

Kühlschrank -20°C Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland

Kühlschrank -80°C, Sanyo, Japan

Kühlzentrifuge Biofuge fresco Heraeus, Hanau, Deutschland

Magnetrührer, IKA, Staufen, Deutschland

Ultraflex MALDI-ToF mass spectrometer, Bruker Daltonics, Billerica, USA

Mikrowellengerät (AEG) Bosch, Nürnberg, Deutschland

PAGE-Kammer für kleine Gele Miniprotean 3 und Tetracell, Biorad, Hercules, USA

PAGE-Kammer für große Gele Ettan Dalt Twelve, GE-Healthcare, Uppsala, Schweden

pH-Meter pH 523, WTW, Weilheim, Deutschland

Thermoschüttler comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA

Feinwaage Korona, Langgöns, Deutschland

Wasseraufbereitungssystem, Millipore, Schwalbach, Deutschland

Wasserbad, GFL, Burgwedel, Deutschland

Zentrifuge, Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland

Zentrifuge, Biofuge pico, Heraeus, Hanau, Deutschland

2.3.5 EDV

DeCyder™ Differential Analysis Software (Version 5.0), Amersham Biotech, Uppsala, Schweden

GraphPad Prism
Microsoft Office Excel
Microsoft Office Word
Quantity One (BioRad)

2.3.6 Antikörper

Transferrin, BioVendor, Katalognummer**:** RE11258C100
Serpin F1, R&D Systems, Katalognummer: BAF1177
Serpin A8, R&D Systems, Katalognummer: BAF3156
Fetuin A, R&D Systems, Katalognummer: BAF1184
Ceruloplasmin, BD Biosciences, Katalognummer: 611488
Complement C3 precursor, Abcam, Katalognummer: Ab11872
Zinc-alpha-2 Glycoprotein, BD Biosciences, Katalognummer: 612354
Serpin A1, R&D Systems, Katalognummer: MAB1268
Leucin-rich Glycoprotein, Abnova, Katalognummer: H00116844-A01
Serin-Threonin-Kinase 32A, Abnova, Katalognummer: H00202374-M01
Haptoglobin Hp2, Abnova, Katalognummer: Ab52652
Sekundärer Antikörper: Goat-anti-mouse (Dako), bzw. Goat anti-rabbit (BioRad)

2.4 Methoden

2.4.1 Vorversuche

2.4.1.1 Homogenisierung des Gewebes

Die Zellen werden homogenisiert, indem zuerst ein Protease-Inhibitor, dem Gewicht der Zellen entsprechend, hinzugegeben wird. Pro 100 µg Gewebe bzw. Zellen wird 1 mL Puffer mit Protease-Inhibitor hinzugefügt. Anschließend wird das Gewebe bzw. die Zellen mit einem Ultraschallstab homogenisiert (Zyklus 5, dreimal 10 sec, Power 70 %). Zwischen den einzelnen Schritten werden die Proben in Eis gekühlt, um ein Überhitzen zu verhindern. Anschließend wird das Homogenat in einer Zentrifuge 20 Minuten lang bei 4°C und bei 13.000 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert. Schließlich wird der Überstand abgenommen, aliquotiert und das Pellet verworfen.

2.4.1.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wird mit einem Bicinchoninsäure-Assay (Sigma) durchgeführt. Diese Proteinbestimmung beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+}. Diese Reaktion wird Biuret-Reaktion genannt. Die Cu^{+}-Ionen ergeben mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Die Farbintensität der Lösung ist ein Maß für die Proteinkonzentration. Die Intensität des Farbtons zeigt eine positive Korrelation mit der Menge der Proteine in der Probe. Die Farbintensität wird photometrisch in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Es wird eine Eichgerade mit BSA als Standard erstellt. Für diesen Zweck werden zwei Standardreihen mit BSA pipettiert, aus denen dann die Kalibriergerade berechnet wird [111].

Es wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Dies bedeutet, es werden von jeder Probe drei Verdünnungen hergestellt (1:100, 1:200, 1:400). Außerdem werden zwei Standardreihen (BSA) pipettiert. Folgende BSA-Konzentrationen werden verwendet:

0 µg/mL
5 µg/mL
10 µg/mL
15 µg/mL
25 µg/mL
50 µg/mL
75 µg/mL
100 µg/mL

Hierzu wird die entsprechende Menge von BSA mit Aqua bidest. auf 1000 µL aufgefüllt.

Die Messung wird in einer 96-well Platte (ELISA-Platte) durchgeführt Von jeder Verdünnung werden 100 µL in ein Well der 96-Well-Platte aufgetragen. Hinzugefügt wird pro Well 100 µL einer $CuSO_4$-Lösung (Kupfersulfat). Diese wird für jede Proteinbestimmung frisch hergestellt. Anschließend wird die ELISA-Platte 30 Minuten lang bei 80°C inkubiert, dann wird die Absorption mithilfe eines ELISA-Readers bestimmt. Diese ist proportional zur Anzahl der Peptidbindungen. Folglich kann daraus die Proteinmenge pro Milliliter berechnen werden. Dies geschieht, indem anhand der Absorption der BSA-Lösungen mit bekannten Konzentrationen eine Eichgerade erstellt wird. Daraufhin kann mit Hilfe der Eichgerade eine

Gleichung für die Proteinkonzentration erstellt werden, anhand derer aus der Absorption der Lösungen mit unbekannter Protein-Konzentration diese Konzentration berechnet werden kann.

2.4.2 2D-Gele DiGE (Fluorescence Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis)

Die in der Proteinanalytik am weitesten verbreitete Technik ist die Gelelektrophorese. Bei dieser kommt es zur Wanderung von elektrisch geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld. Die unterschiedlichen Größen und Ladungen der Moleküle bewirken eine Verteilung der Teilchen auf der Matrix und führt so zu Trennungseffekten [215, 216]. Dadurch wird die Darstellung des Proteoms mithilfe der Elektrophorese ermöglicht. Der Begriff Proteom bezeichnet die Gesamtheit aller in einer Zelle oder einem Lebewesen vorliegenden Proteine unter definierten Bedingungen und zu einem definierten Zeitpunkt. Die Menge und die Zusammensetzung können sich als Reaktion auf Modifikation verschiedener Faktoren ändern [172]. Das Proteom zeigt eine große Dynamik.

Die 2D-Gelelektrophorese setzt sich aus der 1. Dimension, der isoelektrischen Fokussierung, und der 2. Dimension, der SDS-Page, zusammen [37]. Die DiGE gehört zu den trägergestützten Elektrophorese-Methoden, da eine Matrix in Form von Gelen verwendet wird.

Ein bedeutender Vorteil der DiGE ist die direkte Visualisierung von Unterschieden zwischen zwei Proben in einem Gel. Bei der Untersuchung von Biomaterialien können durch den Einsatz von DiGE generelle Veränderungen des Proteoms als Reaktion auf Veränderungen der Umgebung dargestellt werden. Bis zu 5000 Proteine können in nur einem Gel aufgetrennt werden [215].

2.4.2.1 Probenvorbereitung

2.4.2.1.1 Einengung des Liquors

Albumin macht mit 50 % den größten Anteil an Proteinen im Liquor aus, Albumin und Immunglobuline gemeinsam 75 % [223]. Um eine bessere Untersuchung der anderen Proteine im Liquor zu gewährleisten, ist es sinnvoll, Albumin und Immunglobuline aus diesem zu entfernen. Dadurch können diejenigen Proteine,

die in geringer Konzentration vorliegen, aufkonzentriert und dadurch besser identifiziert werden [205]. Zu diesem Zweck wird eine Einengung des Liquors vorgenommen.

Nachdem die Liquorproben bei Raumtemperatur aufgetaut sind, werden sie für eine Dauer von zehn Sekunden lang gevortext. Anschließend wird ein Milliliter Liquor in einem Vivaspin 2-Röhrchen auf 50 bis 200 µL eingeengt. Dies geschieht mit Hilfe eines Festwinkelrotors bei 5500 Upm, wobei der Cut-off bei 3 kDa liegt. Dieser Vorgang benötigt bei einer Temperatur von 20°C zwei bis vier Stunden.

Anschließend wird das eingeengte und entsalzte Retentat für eine Dauer von fünf Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wird verworfen.

2.4.2.1.2 Entfernung von Albumin und Immunglobulin G

Nun wird aus der eingeengten Probe Albumin und Immunglobulin G unter Nutzung des „Albumin and IgG Removal kits“ entfernt. Dazu wird der Liquor mit agarosegebundenen Antikörpern versetzt. Dafür wird pro Milliliter Liquor 750 µL dieser Antikörper hinzugefügt. Antikörper und eingeengter Liquor werden in einem Reaktionsgefäß gemischt und auf einem Rotationsschüttler bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Danach wird die Suspension in eine Säule (Mikrospin column) gegeben. Diese wird für eine Dauer von fünf Minuten bei 5000 rpm und einer Temperatur von 4°C abzentrifugiert.

2.4.2.1.3 Acetonfällung

Der Liquor, der mittlerweile an Albumin und IgG verarmt ist, wird nun der Acetonfällung zugeführt. Bei der Acetonfällung wird die Probe mit dem dreifachen Volumen kalten Acetons (-20°C) versetzt und kurz vermischt. Dann werden die Proteine bei -20°C über Nacht gefällt. Am nächsten Tag wird die Probe durch Zentrifugieren über eine Dauer von 20 Minuten mit 14000 rpm bei 4°C pelletiert. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und dann verworfen. Das Pellet wird bei Raumtemperatur unter dem Abzug getrocknet.

2.4.2.2 Probenaufnahme

Zu dem getrockneten Pellet wird Lysis-Puffer hinzugefügt. Die Zusammensetzung des Lysis-Puffers entspricht der des Rehydrierungspuffers. Das Pellet wird in dem Lysis-Puffer gelöst, indem es für mindestens eine Stunde auf dem Rotationsschüttler gelöst wird.

2.4.2.3 Rehydrieren der IPG-Streifen

Die IPG-Streifen bestehen aus getrockneten Gelen. Von den IPG-Streifen wurden sowohl einige mit einem pH-Wert von 4-7 als auch andere mit einem pH-Wert von 3-5,6 NL genutzt. Die trockenen IPG-Streifen werden bei -80°C gelagert. Da eine Methode der getrennten Quellung und Probenbeladung mittels Probenaufgabetricher genutzt wird, müssen die IPG-Streifen vor der Probenauftragung quellen. Dazu werden sie zunächst mit dem Rehydrierungspuffer rehydriert. Im Rehydrierungspuffer sind Zusätze wie Harnstoff und Thioharnstoff vorhanden, die die Löslichkeit der Proteine erhöhen [216].

Die Streifen werden in das DryStrip Reswelling Tray gelegt. In diesem Plexiglasgefäß können einzelne Gelstreifen in Quellkammern waagerecht liegend rehydriert werden. Auf dem Boden jeder Quellkammer wird 1 mL des Rehydrierungspuffers pipettiert. Anschließend werden die aufgetauten Gelstreifen mit der Gelseite nach unten so in die Quellkammern gelegt, dass ein luftblasenfreier Flüssigkeitsfilm zwischen Gel und Kammerboden entsteht. Danach wird jede Strip-beladene Kammer mit 2-3 mL Paraffinöl überschichtet, um ein Austrocknen der Streifen zu verhindern. Schließlich muss sorgfältig geprüft werden, dass sich keine Luftblasen unter den Strips befinden. Die Rehydrierung erfolgt über Nacht, besser noch über 24 Stunden. Sie findet bei geschlossenem Deckel und Raumtemperatur statt.

2.4.2.4 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Bei der isoelektrischen Fokussierung werden die Teilchen entsprechend ihrer isoelektrischen Punkte getrennt [216]. Aufgrund ihrer Ladungen können Proteine im elektrischen Feld bewegt werden. Proteine sind Amphotere, das heißt, ihre

Nettoladung ist abhängig vom pH-Wert ihrer Umgebung. Sie bewegen sich so lange in Richtung der Anode oder Kathode, bis sie ihren isoelektrischen Punkt erreicht haben. Der isoelektrische Punkt ist eine spezifische Größe für jedes Protein [216]. Er ist erreicht, wenn sich die positiven und negativen Ladungen ausgleichen und ihre Nettoladung 0 ergibt. Sobald dies geschehen ist, kann das elektrische Feld nicht mehr auf die jetzt neutralen Proteine wirken und sie lagern sich ab. Die Ladung eines Proteins ist abhängig von der Anzahl der geladenen Aminosäuren, von seinen Phosphorylierungen und Glykosilierungen.
Es werden immobilisierte pH-Gradienten genutzt, die sowohl in den Gelstreifen, als auch im Äquilibrierungspuffer vorhanden sind.
Nach ausreichend langer Rehydrierung der Gelstreifen werden diese dem DryStrip Reswelling Tray entnommen und in das Keramik-Manifold eingelegt, das zuvor mit ca. 100 mL Cover-Fluid (Paraffin-Öl) gefüllt wurde. Mit der nach oben zeigenden Gelseite werden die rehydrierten Streifen mittig in die Vertiefungen des Öl-gefüllten Keramik-Manifolds der IPG-Phor gelegt, so dass das azide Streifenende zur Anode und das basische entsprechend zur Kathode zeigt. Über die Gelränder wird, an jedem Rand ca. 5 mm überlappend, jeweils ein Streifen Filterpapierstreifen gelegt, der zuvor mit destilliertem Wasser getränkt wurde. Diese Filterpapierstreifen werden mit Klemmelektroden auf den Gelstreifen befestigt. Anschließend werden die Cup-Loading-„Hüte“ aufgeklemmt. Durch die Beschaffenheit der Hüte sollte eine Beschädigung der IPG-Strips ausgeschlossen werden. Die Proben werden in die Cups pipettiert, wobei das Probenvolumen zwischen 20 und 110 µL liegen sollte. Falls sich auf der Oberfläche der Cups kein Öl befindet, werden einige Tropfen Paraffin-Öl auf die Oberfläche der Proben gegeben. Anschließend wird das IPG-Phor mit folgendem Laufstundenprotokoll gestartet:

Tabelle 3: Einstellung der isoelektrischen Fokussierung der DiGE
V: Volt

	Zeit	**Spannung**	**Einstellung**
Stufe 1	8 h	300 V	step&hold
Stufe 2	6 h	1000 V	gradient
Stufe 3	4 h	8000 V	gradient
Stufe 4	3 h	8000 V	step&hold

Dieses Protokoll dauert 21 Stunden. Ist eine längere Laufzeit gewünscht, kann zu Beginn noch ein weiterer Schritt eingefügt werden. Dieser Schritt beinhaltet eine Spannung von 100 V und darf maximal sechs Stunden andauern. Alternativ kann der 300 V-Schritt kann auf bis zu 10 h verlängert werden.

2.4.2.5 Äquilibrierung

Damit die Proteine ohne größere Verluste von der ersten in die zweite Dimension übertragen werden können, muss ein zweistufiger Äquilibrierungsschritt zwischengeschaltet werden. Beim Äquilibrieren werden die Gelstreifen in verschließbaren Kunststoffröhrchen in dem Äquilibrierungspuffer leicht geschüttelt. Im ersten Äquilibrierungsschritt werden die Proteine mit SDS elektrophoretisch mobil gemacht und zugleich werden mit DTT die Disulfidbindungen reduziert. Der erste Äquilibrierungsschritt dauert 25 Minuten an, im zweiten Schritt werden die IPG-Streifen für 20 Minuten im Äquilibrierungspuffer 2 geschwenkt. Dabei wird durch Iodoacetamid die Reoxidation der Thiolgruppen während der weiteren Elektrophorese verhindert. Pro Schritt wird ein Volumen von 20 mL des Äquilibrierungspuffers je Gelstreifen eingesetzt.

2.4.2.6 SDS-Polyacrylamidgele

Polyacrylamidgele sind die am häufigsten in der Gelelektrophorese eingesetzten Medien, da sie mehrere Vorteile aufweisen. Sie tragen keine elektrischen Ladungen und gehen somit keine Wechselwirkungen mit den zu untersuchenden Substanzen ein. Zusätzlich können sie nach Trocknung für längere Zeit aufbewahrt werden. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, die Proteine direkt im Gel anzufärben und so sichtbar zu machen. Außerdem haben Polyacrylamidgele durch ihre Porengröße eine Siebwirkung, die sich genau festlegen lässt. Allerdings können Proteine, die größer als 800 kDa sind, nicht in die Gele hineinwandern. Der Untersucher muss aufgrund der toxischen Wirkung der unpolymerisierten Gele Vorsicht bei der Versuchsdurchführung walten lassen [216].

Zum Auftrennen der Proteine werden 1 bzw. 1,5 mm dicke, 19 cm hohe und 26 cm breite Polyacrylamidgele genutzt. Für die Auftrennung der Proteine wurden TRIS-Glycin-Gele genutzt. Der Acrylamid-Anteil in den Gelen beträgt 12,5 %. Zum Gießen von sechs Gelen wird ein Volumen von 500 mL der Gellösung benötigt;

beim Gießen von neun Gelen 750 mL, für zwölf Gele 900 mL. Die Temed-Lösung wird der Gel-Lösung erst hinzugefügt, wenn die restlichen Inhaltsstoffe bereits gut durchmischt sind, damit es nicht zu einer vorzeitigen Polymerisierung kommt.
Anschließend wird die Gellösung in eine Gießkammer, die zum Ettan DALT II System gehört, gefüllt. Die Gelkassette wird mit Low-Fluorescence-Glasplatten, die aus transparentem Glas bestehen, bestückt. Die Anzahl der Glasplatten entspricht der Anzahl der benötigten Gele. Der überschüssige Platz wird mit Plastikkassetten als Platzhalter ausgefüllt. Plastikfolien werden jeweils zwischen zwei Glaskassetten oder Plastikkassetten eingelegt, um die spätere Entnahme zu erleichtern. Anschließend wird die Gießapparatur verschlossen. Die Acrylamidlösung wird zügig durch ein seitliches Reservoir in die Gießkammer eingegossen, so dass die Gelplatten von unten gefüllt werden. Die Lösung wird eingefüllt, bis ein Abstand von ca. zwei Zentimetern zum oberen Rand der kürzeren Platte erreicht ist. Anschließend wird die Displacing Solution eingefüllt, bis der Abstand auf einen Zentimeter reduziert ist. Dies geschieht, um eine Polymerisierung der Acrylamidlösung im Gießsystem zu verhindern.
Die Gele werden nun mit ca. 3 mL wassergesättigtem Butanol überschichtet. Wassergesättigtes Butanol wird gewonnen, indem Butanol mit Aqua bidest. im Überschuss versetzt wird (mindestens 50 %); dann wird die Mischung geschüttelt. Nach erneut aufgetretener Trennung der Flüssigkeiten wird die obere Phase entnommen und zum Feuchthalten der Gele genutzt. Schließlich wird die Gelkassette mit Parafilm abgedeckt. Die Gele polymerisieren über mindestens sechs Stunden, besser über Nacht.
Nach dem Aushärten der Gele werden die Gelkassetten mit zweifachem Laufpuffer für eine Dauer von zwei Stunden überschichtet. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Gele aus der Gießkammer entnommen und die Butanolreste abgegossen. Anschließend wird die Oberfläche der Gele gründlich mit Aqua bidest gespült. Die auf der Geloberfläche stehende Flüssigkeit wird mit Filterpapier entfernt.

2.4.2.7 2. Dimension (SDS-Page)

Bei der SDS-Page werden die Proteine senkrecht zur ersten Dimension entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt.

SDS ist ein Detergenz, das sich den Proteinen anlagert und zu einer Aufspaltung ihrer Quartärstruktur führt. Unter dem Einfluss des SDS erhalten die Proteine eine negative Grundladung und bewegen sich nur in Richtung der Anode. Außerdem nehmen sie alle eine ähnliche Konformation an [216]. Durch die im Überschuss vorhandenen negativen Ladungen des SDS-Proteinkomplexes ist die Eigenladung der Proteine vernachlässigbar. Durch diese negative Ladung und die ähnliche Konformation ist nur die Masse der Proteine relevant. Je leichter die Proteine sind, desto weiter wandern sie. Dementsprechend sind sie am Ende der 2. Dimension weiter von dem Gelstreifen entfernt, der auf das Gel aufgelegt wird. Aufgrund der starken negativen Ladung kommt es zu einer sehr schnellen Trennung.

Nach dem Äquilibrieren werden die Streifen mit zweifachem Lämmlipuffer (Kathoden-Laufpuffer) abgespült. Der Streifen wird auf die Oberfläche des Gels in der Kassette aufgetragen. Dabei dürfen sich zwischen Gelstreifen und Gel keine Luftblasen befinden. Liegt der Streifen auf, wird der überschüssige Laufpuffer mit Filterpapier abgetragen. Die Gelstreifen werden mit handwarmer Agaroselösung, in der Bromphenolblau gelöst ist, überschichtet. Dabei ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen den Gelstreifen und der Agarose bilden, da dadurch der Aufbau eines homogenen elektrischen Feldes gestört werden würde.

Die zweite Dimension erfolgt in der Elektrophoreseeinheit. Diese unterteilt sich in ein unteres und ein oberes Reservoir. In das untere Reservoir werden sieben Liter Anodenpuffer gefüllt.

Wenn die Agarose ausgehärtet ist, werden die Kassetten in die Etan-Dalt II Elektrophoreseeinheit gestellt. Werden weniger Gele als möglich untersucht, werden die freien Stellen mit speziellen Kunststoffplatten als Platzhaltern bestückt. Anschließend werden in das obere Reservoir drei Liter Kathodenpuffer gefüllt. Nach dem Verschluss der Kammer wird die 2. Dimension gestartet. Abhängig von der Anzahl der Gele wird die Einstellung an der dazugehörigen Spannungsquelle gewählt: Pro Gel 1 h 0,25 W, dann 1 h 0,5 W, anschließend bis zu 13 h bei 3,5 W.

Der Lauf der 2. Dimension ist beendet, sobald die blaue Bromphenol-Lauffront den unteren Rand der Glasplatte erreicht. Insgesamt beträgt die Dauer zwischen 12 und 15 Stunden, wobei die Dauer des letzten Schrittes zwischen 10 und 13 Stunden variieren kann. Die Temperatur des systeminternen Kühlaggregates wird auf konstante 20°C eingestellt.

2.4.2.8 Entwicklung

Nach der Elektrophorese müssen die Proteine in den Gelen sichtbar gemacht werden. Zu diesem Zweck werden die anfangs hergestellten 2D-Gele mit Silberfärbung behandelt. Die 2D-Gele, von denen Spots gewählt werden, werden zunächst zur Auswertung mit CyDye-Fluoreszenz angefärbt, wobei der Zusatz der fluoreszierenden Substanzen bereits vor der Elektrophorese stattfindet. Anschließend wird die Coomassie-Färbung genutzt, um die Spots zu picken. Schließlich wird das Ergebnis digital dokumentiert.

2.4.3 2D-Blots

2D-Blots bieten gegenüber herkömmlichen Western Blots den Vorteil, dass eine Darstellung der verschiedenen Isoformen der Proteine ermöglicht wird. Dies gewährleistet einen besseren Vergleich verschiedener Proben.
Mit den 2D-Blots können durch Bindung von passenden primären Antikörpern spezifische Proteine identifiziert werden. In einem weiteren Schritt binden die sekundären Antikörper an den Komplex aus primären Antikörper und Protein.

2.4.3.1 Probenvorbereitung

Liquorproben werden vorbereitet, indem zu 5 µL der Liquorprobe 95 µL Lysepuffer hinzugegeben werden. Anschließend wird die Probe gut vermischt.
Serumproben werden vorbereitet, indem zunächst 1 µL der Serumprobe mit 19 µL H_2O bidest. vermischt werden. Nach gründlichem Vortexen wird von dieser Lösung wieder 1 µL entnommen und mit 99 µL Lysepuffer verdünnt.
Bei anderen Materialen, beispielsweise Zellen, wird zunächst eine 1D-Verdünnungsreihe angelegt, um eine geeignete Konzentration zu finden. Danach werden die Proben mit einer Acetonfällung (siehe Kapitel 2.4.2.3.1) vorbereitet.
Nach der Acetonfällung wird das Pellet in 100 µL Lysepuffer gelöst und danach für zwei Minuten in einem Ultraschallbad behandelt. Anschließend werden die Proben in die Cup-Loading-„Hüte“ pipettiert.

2.4.3.2 Rehydrieren der IPG-Streifen

Für die 2D-Blots werden 7 cm lange IPG-Streifen mit einem pH-Spektrum von 3 bis 5,6 benutzt. Die Rehydrierung erfolgt analog der Rehydrierung der IPG-Streifen für die DiGE (beschrieben in Kapitel 2.4.2.3).

2.4.3.3 Polyacrylamidgele

Zum Auftrennen der Proteine werden 1 mm dicke, 6,2 cm hohe und 8,1 cm breite Polyacrylamidgele genutzt. Diese setzen sich aus Trenngel und Sammelgel zusammen. Die Trenngellösung wird in die Gelgießapparatur zwischen zwei Glasscheiben gegossen und die Geloberfläche zur Begradigung der Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung des Trenngels wird das Isopropanol entfernt und die Oberfläche mit Aqua dest. gespült. Die auf der Geloberfläche stehende Flüssigkeit wird mit Filterpapier aufgesaugt, dann wird die Sammelgellösung aufgetragen und mit einem Kamm die Sammeltaschen gebildet. Nach der Polymerisierung des Sammelgels wird der Kamm gezogen und die Sammelgeltaschen werden mit Aqua bidest. gespült.

2.4.3.4 Isoelektrische Fokussierung

Für die isoelektrische Fokussierung gibt es zwei verschiedene Protokolle – je nachdem, ob die Laufzeit über Tag oder über Nacht geplant ist.

IEF über Tag:
Stufe 1: 100 Volt, 1 Minute
Stufe 2: 300 V, 3 Stunden
Stufe 3: 1000 V, 30 Minuten
Stufe 4: 5000 V, 90 Minuten
Stufe 5: 5000 V, 30 Minuten

IEF über Nacht:
Stufe 1: 100 Volt, 4 Stunden
Stufe 2: 300 V, 4,34 Stunden
Stufe 3: 1000 V, 30 Minuten

Stufe 4: 5000 V, 90 Minuten
Stufe 5: 5000 V, 10 Stunden

2.4.3.5 Äquilibrierung

Die Äquilibrierung erfolgt analog zu der Äquilibrierung in der DiGE (siehe Kapitel 2.4.2.5). Für die 2D-Blots werden geringere Mengen Äquilibrierungspuffer benötigt: Für jeden Äquilibrierungsschritt werden 25 mL Puffer benutzt, unabhängig von der Anzahl der zu äquilibrierenden Gelstreifen.

2.4.3.6 2. Dimension

Nach dem Äquilibrieren werden die Streifen mit einfachem Lämmli-Puffer (Kathoden-Laufpuffer) abgespült. Eine Tasche vom Sammelgel bleibt erhalten, die übrigen werden entfernt. Hierbei wird darauf geachtet, dass die Oberfläche des Trenngels homogen bleibt, damit die Übertragung der Proteine nicht behindert wird. Der Streifen wird ohne Bildung von Luftblasen auf die Oberfläche des Trenngels aufgetragen. Überschüssiger Lämmlipuffer wird mit Filterpapier abgesaugt. Die Gelstreifen werden mit Bromphenolblau in Agarose überschichtet. In die überstehende Sammelgeltasche wird eine 1D-Spur aufgetragen. Zum Teil wird eine bei allen Gelen identische Serumprobe, zum Teil ein Protein-Standard namens Magic Mark aufgetragen. Dieser wird mit vierfach konzentriertem Roti 1:10 verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung werden 4 µL aufgetragen. Dies dient der Abschätzung des molekularen Gewichtes der Proteine in den Proben.
Anschließend werden je zwei Gele in eine Gelkassette gesetzt, der Zwischenraum wird mit 1-fach konzentriertem Lämmli bis zum oberen Rand der Glaskanten gefüllt. Daraufhin wird die Elektrophorese mit 25 mA pro Gel bei 300 Volt und 100 Watt gestartet. Die Laufzeit ist davon abhängig, wie schnell die blaue Lauffront den unteren Rand der Glasplatte erreicht. Sie liegt zwischen 1 und 1,25 h.

2.4.3.7 Semidry-Blots

Bei diesem Schritt werden die Proteine von den Gelen auf Membranen übertragen. Pro Gel werden vier Filterblätter und eine Polyvinyliden-Difluorid-

Membran (PVDF-Membran) benötigt. Sie werden auf eine Länge von 8,1 cm und eine Höhe von 6,2 cm zugeschnitten.
Nach der 2. Dimension werden die Gele aus den Gelkassetten entfernt. Das Gel wird für zwei bis drei Minuten in Blotpuffer C gelegt. Die Membranen werden erst kurz in Methanol geschwenkt, dann in eine Plastikschale mit Blotpuffer B gelegt. Von den vier Filterblättern, die pro Gel benötigt werden, wird jeweils eines in eine Plastikschale mit Blotpuffer A und mit Blotpuffer B, zwei in eine Plastikschale mit Blotpuffer C gelegt.
Die Filterblätter, Membranen und Gele werden in der Blotkammer folgendermaßen geschichtet: Der Boden der Blotkammer wird mit Puffer A befeuchtet. Anschließend wird das in Blotpuffer A geschwenkte Filterblatt auf dem Boden der Blotkammer ausgerollt. Das in Blotpuffer B geschwenkte Filterblatt wird behutsam darauf gelegt. Dann wird vorsichtig die Membran ausgerollt. Auf diese wird das Gel luftblasenfrei gelegt. Auf dem Gel werden die beiden in Blotpuffer C geschwenkten Filterblätter ausgerollt. Der Deckel der Blotkammer wird mit Blotpuffer C befeuchtet. Bei jedem Ausrollen muss darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen entstehen.
Der Deckel wird gleichmäßig beschwert, um die Übertragung der Proteine von dem Gel auf die Membran zu optimieren. Anschließend wird für 45 Minuten bei einer Stromstärke von 47 mA pro Gel das Blotten durchgeführt.

2.4.3.8 Blocken

Die Membranen werden eine Stunde in Blocklösung geschwenkt, um eine unspezifische Adsorption des Antikörpers an freie Proteinbindungsstellen der Membran und damit unspezifische Signale zu verhindern.
Das Gel wird mit Coomassie Brilliant blue G 250 gefärbt, um zu überprüfen, ob der Transfer von dem Gel auf die Membran erfolgreich war.

2.4.3.9 Antikörper

Nach dem Blocken werden die Membranen mit dem primären Antikörper inkubiert. Dies geschieht über Nacht bei 4°C. Die Antikörper werden in der Blocklösung gelöst. Pro Membran sollte ein Volumen von 3 mL eingesetzt werden, da die

Membran keinesfalls austrocknen darf. Um diese Schädigung zu verhindern, wird die Membran mit einem Plastikdeckel abgedeckt.
Die Verdünnung des Antikörpers gegen α1-Antitrypsin wird im Verhältnis von 1:1500 bei der Untersuchung von Liquor, beziehungsweise 1:2000 bei der Untersuchung von Serum durchgeführt. Dementsprechend werden in 3 mL Milch 1,5 µL Antikörper gelöst. Die Antikörper gegen Transferrin, Fetuin A, Complement C3 precursor und Serin-Threonin-Kinase 32A werden im Verhältnis 1:500 verdünnt. Bei den Antikörpern gegen Serpin F1, Serpin A8, Zinc-alpha-2 Glycoprotein und Haptoglobin Hp2 beträgt die Verdünnung 1:1000. Bei der Untersuchung von Ceruloplasmin wird der Antikörper im Verhältnis 1:250 verdünnt, bei Leucin-rich Glycoprotein 1:2500.
Nach der Inkubation mit dem 1. Antikörper werden die Membranen dreimal für jeweils zehn Minuten in PBS-Tween geschwenkt. Anschließend werden die Membranen für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser wird ebenfalls in der Block-Lösung gelöst. Der sekundäre Antikörper ist gegen den primären Antikörper gerichtet.
Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper werden die Membranen wieder dreimal für jeweils zehn Minuten in PBS-Tween geschwenkt.

2.4.3.10 Entwicklung

Nach dem zweiten Waschvorgang mit PBS-Tween werden die Membranen entwickelt. Dies geschieht unter Nutzung einer CCD-Kamera.
Nach dem Waschen wird jede Membran für 120 Sekunden mit zwei ECL-Lösungen inkubiert, die erst kurz vor dem Auftragen vermischt werden. Vermischt werden 1,5 mL von Lösung A und 37,5 µL von Lösung B. Durch die Inkubation kommt es zu einer Enzymreaktion und zu Chemilumineszenz.
Dann werden die Membranen in der CCD-Kamera belichtet. Die Belichtungszeit variiert zwischen zwei Sekunden und zwei Minuten. Anschließend werden die Bilder digital dokumentiert.

2.4.3.11 Strippen von Blots

Um mit den getrockneten Blots eine zweite Immundetektion mit neuen Antikörpern durchführen zu können, müssen diese gestrippt werden. Strippen bezeichnet die

Entfernung von primären und sekundären Antikörpern von der Membran eines Western Blots oder eines 2D-Blots. Das Strippen ist in den meisten Fällen nur einmal mit guten Ergebnissen möglich.
Zum Strippen wird zunächst die Stripping-Lösung im Wasserbad auf 60°C erhitzt. Die trockenen Membranen werden kurz in Methanol geschwenkt. Dann werden sie in eine dicht schließende Plastikdose gelegt und die Stripping-Lösung mit dem Mercaptoethanol wird hinzugefügt. Anschließend werden die Membranen im 60°C-heißen Wasserbad für 30 Minuten geschüttelt. Danach folgt ein zweistündiger Waschgang der Membranen mit PBS-Tween, bis der typische Geruch von Mercaptoethanol nicht mehr vorhanden ist. Dabei wird die PBS-Tween-Lösung mehrmals ausgewechselt.

2.4.4 Massenspektrometrie

2.4.4.1 Spots aus Cye-Gelen (in Kooperation mit der Proteomics Gruppe am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen)

Manuell gepickte Spots werden mittels einer automatisierten Plattform zur Identifikation der Proteine, die mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden, analysiert [122]. Mit einem Ultraflex MALDI-ToF Massenspektrometer (Bruker Daltonics) werden mit Hilfe der FlexControl 3.0 Software automatisiert ein Peptidmassen-Fingerprint (PMF) sowie sechs Ionenspektren aufgenommen. Die PMF-Spektren werden mit Hilfe des Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics) kalibriert. Die Zuordnung der monoisotopischen Peptidsignale im Massenbereich (m/z) von 9800 bis 4000 mittels des SNAP-Algorithmus' (signal to noise Verhältnis >4; Qualtitätsfaktorlimit 50; maximal 100 Peaks) wird mit der FlexAnalysis 3.0 Software (Bruker Daltonics) durchgeführt. Auch die Erstellung der dazugehörigen Peakliste wird mit dieser Software durchgeführt. Hierbei werden Hintergrundsignale, die durch typische Trypsin-Autolyse Fragmente und einem CHCA-Cluster (m/z = 833) verursacht werden, aus der Peakliste entfernt. Fragmentionenspektren werden ebenso mit leicht veränderten Einstellungen für den SNAP-Algorithmus (signal to noise Verhältnis >3; Qualtitätsfaktorlimit 30; maximal 200 Peaks) prozessiert.
PMF und MS/MS Datensets werden als Batch mit der BioTools 3.1 Software (Bruker Daltonics) als Interface zur Mascot 2.2-Software (Matrix Science)

analysiert. Datenbanksuchen werden in der Swiss-prot Primärsequenz-Datenbank Sprot 56.9 (vom 3. März 2009 mit 412525 Einträgen) mit der Einschränkung „Homo sapiens“ (20402 Einträge) durchgeführt. Carboxamidomethylierung wird als feste und Oxidation von Methionin als variable Modifikation festgelegt. Eine ungespaltene Trypsin-Schnittstelle pro Peptid wird erlaubt. Die Massentoleranzen für PMF werden mit 100 ppm und die für MS/MS-Spektren mit 100 ppm (Vorläuferionen) bzw. 0,7 Da (Fragmentionen) festgelegt. Für letztere wird MALDI-ToF/ToF als Instrumententyp ausgewählt. Als Minimalbedingung für die Identifikation eines Proteins wird mindestens ein sicher identifiziertes Peptid mit einer Sequenzabdeckung von mindestens 20 % im PMF verlangt.

2.4.4.2 In-Gel-Verdau und LC-MS/MS von α1-Antitrypsin-Isoformen (NextGenSciences, Ann-Arbor, Michigan, USA)

Die Proteinspots werden einem proteolytischen Verdau an einer ProGest-Arbeitsstation (Genomic solutions) unterzogen. Dies geschieht wie folgt: Die Proben werden mit DTT bei 60°C reduziert und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Dann werden die Proben mit IAA alkyliert und anschließend mit Trypsin bei 37°C für eine Dauer von vier Stunden inkubiert. Die Reaktion wird mit Ameisensäure abgestoppt und die Proben sofort analysiert.

Die Proben werden mittels nano LC/MS/MS an einer ThermoFisher LTQ Orbitrap XL analysiert. 30 µl des Hydrolysats werden auf eine 5mm 75 µm IDC12-Säule (Jupiter Proteo, Phenomenex) mit einer Flussrate von 300 nl/min aufgetragen. Ein dreißigminütiger Gradient wird angelegt. Das Massenspektrometer wird im datenabhängigen Modus betrieben und die sechs häufigsten Ionen für MS/MS ausgewählt. Die Parameter der MS/MS-Analyse (Mascot) sind: MS/MS-Ionen Suche; Trypsinverdau; humane Proben; Massentoleranz (Vorläuferion) 10 ppm; Massentoleranz (Produktion) 0,5 Da. Carboxamidomethylierung wird als feste, Oxidation von Methionin sowie N-terminale Acetylierung, diverse Methylierungen und pyro-Glu (N-term. Q) als variable Modifikation festgelegt. Es werden bis zu zwei ungeschnittene Trypsinschnittstellen pro Peptid akzeptiert.

2.4.5 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine durch Elektrophorese aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine von einem Gel auf eine Nitrozellulosefolie übertragen. Auf dieser Membran werden die Proteine mithilfe von markierten Antikörpern visualisiert.

Es wird von allen Proben die gleiche Proteinmenge denaturiert, indem die Proben mit vierfachem Roti-Load versetzt werden, sodass Roti-Load am Ende einfach konzentriert vorliegt. Bei Liquorproben werden 30 µL des Liquors eingesetzt und mit 10 µL des vierfach konzentrierten Roti-Load vermischt.

Anschließend wird die Probe mit einem Vortex gut vermischt und bei 99°C für fünf Minuten im Thermomixer gekocht. Daraufhin wird die Probe für eine Dauer von 20 Sekunden zentrifugiert.

Anschließend wird eine SDS-Page mit zwölfprozentigen Gelen durchgeführt. Dies geschieht nach Lämmli [141]. Dafür werden die Proben mit Gelloader-Tips in die Taschen pipettiert. Jedes Gel besitzt zehn Sammelgeltaschen, deswegen können mit jedem Gel neun Proben und ein Standard untersucht werden. Die SDS-Page erfolgt entsprechend der SDS-Page bei den 2D-Blots, beschrieben im Kapitel 2.4.3.6. Die Laufzeit der Gele ist beendet, sobald die Lauffront die untere Glaskante überschreitet.

Im nächsten Schritt folgt der Vorgang des Blottens, bei dem die Gele auf PVDF-Membranen übertragen werden. Dies geschieht nach der Semidry-Methode – das Vorgehen ist analog zu dem bei den 2D-Gelen (siehe Kapitel 2.4.3.7). Anschließend werden die Membranen mit dem primären und dann dem sekundären Antikörper inkubiert. Die Verdünnung und das Volumen, das pro Western Blot eingesetzt wird, können Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: Angabe der primären Antikörper mit Information über Verdünnung und pro Blot eingesetztem Volumen bei Western Blot
WB: Western Blot, µL: Mikroliter

Protein	**Verdünnung**	**µl/WB**
Transferrin	1:500	30
Serpin F1	1:1000	10
Serpin A8	1:1000	1
Fetuin A	1:500	15
Ceruloplasmin	1:250	30
Complement C3 precursor	1:500	30
Zinc-alpha-2 Glycoprotein	1:1000	10
Serpin A1	1:1000	1
Leucin-rich Glycoprotein	1:2500	30
Serin-Threonin-Kinase 32A	1:500	75
Haptoglobin Hp2	1:1000	40

Als Abschluss erfolgt die Darstellung mittels einer CCD-Kamera. Auch diese Durchführungen erfolgen entsprechend der Beschreibung im Kapitel 2.4.3.10.
Die Western Blots werden quantitativ ausgewertet mit Quantity One von Biorad. Die statistische Auswertung erfolgt mit Sigma Stat.

2.4.6 Färbemethoden

2.4.6.1 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung wird zur Visualisierung der Spots eingesetzt, wenn anschließend Proteinspots für die MS-Analytik ausgestanzt werden sollen. Die Vorteile dieser Färbung sind die leichte Durchführbarkeit und die niedrigen Kosten. Außerdem ist die Coomassie-Färbung kompatibel mit einer nachfolgenden Massenspektrometrie.
Coomassie-Brilliant-Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich an den basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert und damit die Proteine unspezifisch anfärbt. Die basischen Seitenketten sind Arginin-, Histidin- und Lysinreste. Die Nachweisgrenze bei der Coomassie-Färbung liegt bei 100 ng Protein/Spot [216].
Zur kolloidalen Coomassie-Färbung werden die Gele nach der 2. Dimension oder nach dem Blotten für 30 Minuten in zweiprozentige Essigsäure mit Aqua bidest.

geschwenkt. Die Färbung wird in verschließbaren Plastikwannen durchgeführt, um das Risiko der Kontamination mit Keratin zu verringern. Anschließend wird die zweiprozentige Essigsäure gegen die Working Solution, die frisch zubereitet wird, ausgetauscht. In dieser Lösung werden die Gele für mindestens 12 h unter Schwenken inkubiert. Alternativ kann die Inkubationszeit auf 24 h ohne Schwenken im Kühlraum verlängert werden. In diesem Fall müssen die Gele allerdings vollständig untergetaucht sein und dürfen sich nicht überlagern. Der Coomassie-Brilliant-Blau-Farbstoff hat unspezifische Wechselwirkungen. Hierdurch werden nicht nur die Proteine angefärbt, sondern auch die Gelmatrix. Wegen dieser hohen Färbung des Gelhintergrunds wird ein Vorgang des Entfärbens angeschlossen, wodurch die Proteine sichtbar gemacht werden. Dazu wird die Färbelösung abgegossen und durch Entfärber gleichen Volumens ersetzt. Nach 30 Minuten wird dieser Vorgang wiederholt.

Durch Coomassie Brillant Blue G250 wird die Proteinmenge in wässrigen Lösungen quantifiziert. Dies geschieht nach der Methode von Bradford: Der Farbstoff bildet in saurer Lösung mit positiven und neutralen Seitenketten von Proteinen Komplexe. Durch die Bildung dieser Komplexe wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten Sulfonatform stabilisiert.

Die Working Solution muss bei jeder Färbung frisch angesetzt werden. Pro Gel werden ca. 400 mL Färbelösung eingesetzt. Entfärbt wird durch Abgießen der Färbelösung, danach wird zweimalig gegen 400 mL Entfärberlösung ausgetauscht. Die Gele werden in dieser Lösung geschwenkt. Um eine sehr empfindliche Anfärbung zu erreichen, werden die Gele im Kühlraum bei 4°C ohne Schwenken für 24-48 Stunden entfärbt.

2.4.6.2 Silberfärbung (modifiziert nach Blum)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine sollen diese sichtbar gemacht werden. Dazu dient beispielsweise die Silberfärbung. Die Silberfärbung ist die empfindlichste unspezifische Färbemethode. Die Nachweisgrenze liegt bei unter 1ng Protein/Spot [216]. Das Prinzip der Silberfärbung ist eine Reduktion der Silberionen zu metallischem Silber, bei der sie sich an die Proteine, die sich auf dem Gel befinden, befinden. Dadurch kommt es zu einer Reduktion zu metallischem Silber.

Der Nachteil der Silberfärbung ist, dass diese Färbung langwierig und aufwendig ist. Auch die Quantifizierung ist schwierig, da verschiedene Proteine unterschiedlich intensiv angefärbt werden. Außerdem ist sie wenig reproduzierbar. Für die Silberfärbung müssen die Proteine zunächst in den Polyacrylamidgelen fixiert werden. Anschließend werden störende Substanzen ausgewaschen.
Nach der Elektrophorese werden die Glasplatten aus der Gelkammer entnommen, die Gele vorsichtig gelöst und in große Glasschalen gelegt, die mit Aqua bidest. gefüllt sind. Die Gele werden für zehn Minuten in dieser Flüssigkeit geschwenkt, die anschließend ausgetauscht wird. Anschließend folgt ein weiterer zehnminütiger Waschvorgang.
Es folgt die Fixierung der Proteine. Für diesen Schritt werden die Gele für mindestens zwei Stunden, vorzugsweise über Nacht, in der Fixierlösung geschwenkt. Diese besteht aus 40 % Ethanol und 10 % Essigsäure. Durch die Fixierung werden die Proteine immobilisiert. Darauf folgt die eigentliche Silberfärbung, modifiziert nach Blum. Für jeden Schritt wird pro Gel ein Volumen von einem Liter benötigt.
Nach der Fixierung werden die Gele zweimal für je 20 Minuten in einer dreißigprozentigen Ethanol-Lösung gewaschen. Darauf folgt ein zwanzigminütiger Waschschritt in Aqua bidest..
Nach den Waschschritten wird eine Natriumsulfatlösung (0,02 % $Na_2SO_2O_3x5H_2O$) zur Sensitivierung genutzt. Diese dient der Verstärkung der sich anschließenden Silberfärbung. Die Gele werden für eine Minute in der Lösung geschwenkt. Danach schließen sich zwei weitere Waschschritte in Aqua bidest. an, die jeweils 20 Sekunden dauern.
Dann folgt die zwanzigminütige Färbung in 0,2 %-iger Silbernitratlösung. Nach der Färbung werden erneut zwei Waschschritte in Aqua bidest. durchgeführt, die wieder jeweils 20 Sekunden andauern.
Als nächstes folgt die Entwicklung. Dabei werden die Gele in einer Lösung, die aus 3 % Na_2CO_3 und 0,5 % Formaldehyd besteht, entwickelt und unter Sichtkontrolle gefärbt. Sobald die Spots eine entsprechende Farbe aufweisen, wird die Entwicklung gestoppt. Dafür muss beachtet werden, dass nach der Beendigung der Entwicklung die Gele noch ein wenig nachfärben. Die Silberfärbung ist eine Färbung ohne Endpunkt. Ohne das Beenden der Färbung würde der Hintergrund zu dunkel werden.

Gestoppt wird die Entwicklung mit fünfprozentiger Essigsäure durch Herabsetzung des pH-Wertes. Die Gele werden für fünf Minuten in der Lösung geschwenkt. Es muss darauf geachtet werden, dass die Inkubation in der Essiglösung nicht verlängert wird, da es ansonsten zu einer Vergilbung der Gele kommt.
An diesen Schritt schließt sich ein letzter Waschschritt in Aqua bidest. an. Anschließend werden die Gele eingescannt.

2.4.6.3 CyDye-Labelling

Die CyDye DIGE fluor minimal dyes bestehen aus drei verschiedenen Farbstoffen, Cy2, Cy3 und Cy5. Diese drei Farbstoffe besitzen unterschiedliche Spektraleigenschaften und zeigen dadurch Emissionen verschiedener Wellenlängen. Die CyDye-Farbstoffe gehören zur Familie der Cyanin-Farbstoffe und binden nicht-kovalent an die Lysinreste der Proteine [216, 218].
Der Vorteil der Anfärbung von Proteinen mit Fluoreszenz-Farbstoffen ist die Möglichkeit der DiGE (Differential Imaging Gel Electrophoresis). Hierbei können mehrere Proben aufgrund der unterschiedlichen Wellenlängen auf einem Gel aufgetragen werden, indem sie mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen angefärbt werden. Dadurch wird der direkte Vergleich verschiedener Proben ermöglicht. Bei dieser Studie werden drei verschiedene massenangepasste Fluoreszenz-Farbstoffe verwendet. So können jeweils drei Proben auf ein Gel aufgetragen und direkt verglichen werden.
Die Aceton-gefällten und getrockneten Liquorproben werden in jeweils 30 µL Lysepuffer aufgenommen und für fünf Minuten im Ultraschallbad aufgelöst. Anschließend werden die Proben für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt.
Die CyDye DIGE Fluor minimal dyes liegen als Stocklösung in einer Konzentration von 1nmol/µl vor. Sie werden bei -80°C aufbewahrt. Zur Herstellung der Working Solution werden pro 10 nmol CyDye-Farbstoff 10 µL DMF (<0,005 % H_2O) hinzugefügt. Diese Lösung wird nun für 30 Sekunden unter Nutzung des Vortex-Mischgerätes gemischt und anschließend für 30 Sekunden bei 12.000 r/min zentrifugiert.
Diese Working Solution wird nun verdünnt, indem pro 1,5 µL Farbstofflösung 4,5 µL DMF hinzugefügt werden. Diese Verdünnungslösung wird gründlich gemischt.

Pro 20 µL Probe wird 1 µL der verdünnten Working Solution hinzugefügt. Die Proben werden für 30 Sekunden mittels eines Vortex gemischt und für 30 sec bei 12.000 r/min zentrifugiert. Danach werden sie für 30 Minuten in ein 10°C kühles Wasserbad gestellt. Nach diesen 30 Minuten wird pro 20 µL Probe 1 µL einer 10 mM Lysin-Lösung hinzugefügt. Mit dem Hinzufügen von Lysin ist das Labeling beendet. Die Proben werden wieder für 30 Sekunden bei 12.000 r/min zentrifugiert. Anschließend folgt nochmals eine Inkubationsphase von zehn Minuten im 10°C kühlen Wasserbad.

Nun werden die Proben, die auf ein Gel aufgetragen werden zusammengefügt - jeweils eine Cy2, Cy3 und Cy5-markierte Probe. Jede dieser Proben besteht nun aus 20 µL der Liquorprobe, 1 µL Farbstoff und 1 µL Lysin. Zu diesen 66 µL Lösung werden 22 µL des vierfachen Lysispuffers hinzugefügt, sodass 88 µL Lösung pro Gel aufgetragen werden. Die Probenauftragung geschieht, nachdem die Proben für eine Dauer von einer Stunde geschüttelt wurden.

Der interne Standard besteht aus 10 µL jeder in einem Versuchsdurchgang untersuchten Probe. Im Falle von sechs Gelen, auf denen jeweils zwei Liquorproben aufgetragen werden, entspricht das 120 µL. Von diesen 120 µL werden pro Gel 20 µL aufgetragen. Der interne Standard wird konstant mit Cy2 angefärbt.

Tabelle 5: Probenvolumina beim CyDye-Labelling

µL: Mikroliter, NDC: nicht-demente Patienten; PD: Parkinson-Patienten ohne Demenz; PDD: Parkinson-Patienten mit Demenz

	Probenvolumen	**Farbstoff**	**Lysin**	**Endvolumen**
PD	20 µL	1 µL	1 µL	22 µL
PDD	20 µL	1 µL	1 µL	22 µL
NDC	20 µL	1 µL	1 µL	22 µL
Interner Standard	120 µL	6 µL	6 µL	132 µL

Das Verteilungsschema kann Tabelle 6 entnommen werden.

Tabelle 6: Schema der Gruppenverteilung beim CyDye-Labelling
Gruppen im Lauf 1: PD und PDD
Gruppen im Lauf 2: NDC und PD
Gruppen im Lauf 3: NDC und PDD
NDC: nicht-demente Patienten; PD: Parkinson-Patienten ohne Demenz; PDD: Parkinson-Patienten mit Demenz

IPG-Streifen	Cy 2	Cy 3	Cy 5
1	jeweils 20 µL	Gruppe 1	Gruppe 2
2	aus dem	Gruppe 2	Gruppe 1
3	internen	Gruppe 2	Gruppe 1
4	Standard	Gruppe 1	Gruppe 2
5		Gruppe 2	Gruppe 1
6		Gruppe 1	Gruppe 2

Pro Gel werden drei markierte Proben aufgetragen: Zwei Liquorproben und der interne Standard. Dieses besteht zu gleichen Anteilen aus 10 mL des jeweils zu untersuchenden Liquors. Bei der Untersuchung von beispielsweise vier Gelen besteht der interne Standard aus 80 µL, von denen jeweils 20 µL auf jedes Gel aufgetragen werden. Der interne Standard dient zur Normalisierung aller Proteinspots [216, 235].

2.4.6.4 CyDye-Fluoreszenz-Scan mit Laserscanner

Die Fluoreszenzsignale der CyDye-gelabelten Proteine werden mit einem Ettan Dige Imager Scanner (GE) aufgezeichnet. Dazu werden die Gelkassetten nach Abschluss der Elektrophorese der 2. Dimension der Ettan Dalt-Elektrophoresekammer entnommen und mit Aqua bidest. abgespült. Anschließend werden die Gele direkt gescannt. Dies sollte möglichst umgehend nach Abschluss der Elektrophorese erfolgen, damit es nicht zu einer Austrocknung der Gele kommt. Direkt vor dem Scannen werden die Glasplatten wiederholt mit achtzigprozentigem Alkohol eingesprüht und mit staubfreien Tüchern abgetrocknet. Danach werden die Glasplatten erneut mit achtzigprozentigem Alkohol eingesprüht. Diesmal trocknet der Alkohol bei Raumtemperatur, damit sich möglichst wenig Staub auf den Glasplatten befindet.

Am Scanner wird im Programmmenü das Format Ettan Dalt 2 gewählt. Die Gelkassetten werden in schwarze Plastikboxen gelegt; diese werden in das Scan-Feld des Scanners gelegt. Am Scanner (DiGE Imager, GE) werden des Weiteren folgende Werte festgelegt: DIGE Naming Format/ Fluorescence/ 3 Wellenlängen

(Cy3, 5, 2). Außerdem wird die Expositionszeit für alle drei Wellenlängen bestimmt. Die Exzitationsfilter sind bei Cy2 480 nm mit einer Bandbreite von 30 nm, bei Cy3 540 nm mit einer Bandbreite von 25 nm und bei Cy5 635nm mit einer Bandbreite von 30 nm. Die Emissionsfilter sind folgende: bei Cy2 530nm mit einer Bandbreite von 40 nm, bei Cy3 595 nm mit einer Bandbreite von 25 nm. Bei Cy5 beträgt der Emissionsfilter 680 nm mit einer Bandbreite von 30 nm.

Es wird ein Pre-Scan mit einer Auflösung von 500 µm angefertigt. Anhand von diesem Pre-Scan wird beurteilt, ob alle Wellenlängen die gleiche Fluoreszenzsignal-Intensität zeigen und ob eine Sättigung auftritt. Dies zeigt sich durch rote Spots. Außerdem wird darauf geachtet, ob ein oder mehrere Kanäle zu schwache Signale liefern. Durch empirisches Erhöhen oder Erniedrigen der Expositionszeit jeder Wellenlänge soll eine gleichmäßige Signalstärke aller drei Images erreicht werden. Dafür muss eventuell der Pre-Scan mehrfach wiederholt werden, bis die Signalstärken zufrieden stellend sind. Wird dieser Pre-Scan nicht durchgeführt, können unter Umständen Schwierigkeiten bei der Normalisierung der drei Images auftreten. Die drei Fluoreszenzfarbstoffe reagieren auf unterschiedliche Anregungswellenlängen. Der eigentliche Scan mit den unterschiedlichen Wellenlängen wird schließlich mit einer Auflösung von 100 µm durchgeführt. Für alle Gele werden die gleichen Einstellungen verwendet.

Anschließend werden die Bilder ausgewertet. Dazu wird eine Software namens Image Quant genutzt. Mithilfe dieser Software wird eine Überlagerung der verschiedenen Kanäle eines Gels zum besseren Vergleich ermöglicht. Zur Analyse der Gele wird anschließend die DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software genutzt. Mittels der Software können durch verschiedene statistische Tests die qualitativen und quantitativen Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben bestimmt werden [99].

Die Quantifizierung der Protein-Spots wird durchgeführt, indem das Volumenverhältnis im Vergleich zu dem ersten gescannten Gel berechnet wird. Diese gilt als vermindert, wenn die Protein-Konzentration im ersten Gel höher ist. Sie gilt als erhöht, wenn die Protein-Konzentration im ersten Gel niedriger ist [99].

2.4.7 Gewinnung der Spots

2.4.7.1 Auswertung der Spots

Die Spots werden mit einer Software namens „DeCyder“ ausgewertet. Diese Software vergleicht die Daten der verschiedenen Gele und setzt korrespondierende Spots in Verhältnis zueinander. Jeder Spot entspricht hierbei einem Protein. Es wird die Regulation der Proteine berechnet und sowohl graphisch als auch statistisch angezeigt.
Wenn zwei Spots eine Regulation von mindestens 50 % zeigen, wird diese Regulation als signifikant angesehen. Sie werden anschließend gepickt und mittels Massenspektrometrie untersucht.

2.4.7.2 Picken der Spots

Um die Spots in der Massenspektroskopie untersuchen zu können, müssen sie zuvor aus dem Gel gepickt werden. Dies geschieht, indem unter das transparente Gel ein Ausdruck der CyDye-markierten Proteinverteilung gelegt wird. Die zu untersuchenden Spots werden vorher in der Software markiert. Nun werden sie unter Zuhilfenahme einer Pipettenspitze gepickt und in eine 96-Well-Platte positioniert. Diese wird mit Plastikdeckeln verschlossen.

2.4.8 Zellkultur

Die verwendeten Zellen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kulaksiz, Universität Ulm, bereitgestellt.
Verwendet werden HepG2-Zellen, die zunächst in T25 ausgesät. Hinzugefügt werden 2,5 mL einer achtzigprozentigen konfluenten T75. Die Zellen wachsen über eine Dauer von zwei Tagen. Nach Ablauf dieser Tage wird in allen vier Flaschen der Zellkultur das Medium abgesaugt. Anschließend werden die Zellen mit PBS gespült. Danach werden in den Flaschen die entsprechenden Zusätze hinzugefügt. Eine der Flaschen erhält keinen Zusatz, wird also nicht stimuliert. Zur Flasche 2 wird Probe 146 (NDC), zur Flasche 3 Probe 74 (LBD) und zu der Flasche 4 wird die Probe 358 (LBD) hinzugefügt.

Die nachfolgende Inkubation dauert 24 Stunden an. Danach werden die Zellen abgeerntet. Das Medium wird einzeln abgenommen und in Eppendorf-Gefäße gefüllt.
Die Zellen werden mit kaltem PBS gewaschen und das PBS abgesaugt. Danach wird erneut 1mL PBS auf die Zellen gegeben und die Zellen mittels eines Schabers geerntet. Die Lösung wird in Eppendorf-Gefäße abgefüllt. Die Eppendorf-Gefäße werden bei 4°C 10 Minuten lang bei 1500 r/min zentrifugiert. Der Überstand (PBS) wird abgenommen und verworfen. Die Pellets und die Medienüberstände werden bei -80°C eingefroren.

2.5 Berechnung und Statistische Auswertung

Die Volumina der Banden der Western Blots werden durch Nutzen der Quantity One Software (BioRad) ermittelt. Der Membranhintergrund wird adjustiert.
Die Analyse von Unterschieden aller oder jeweils zwei Gruppen wird mittels des Kruskal-Wallis-Tests beziehungsweise des Mann-Whitney Tests (Sigma Stat Software, GraphPad Prism Software) berechnet. Die Korrelation zwischen den Parametern wird durch Anwendung der Spearman-Rang-Korrelation untersucht.
Weiter werden die Sensitivität und die Spezifität berechnet. Diese sind Effizienzmaße von diagnostischen Tests und beschreiben die Güte eben dieser.
Die Sensitivität eines Testes gibt die Wahrscheinlichkeit an, einen tatsächlich positiven Sachverhalt auch durch ein positives Testergebnis zu erkennen. Sie wird berechnet durch die Division der Anzahl der richtig positiven Testergebnisse durch alle in Wirklichkeit positiven Testergebnisse [143].
Die Spezifität beschreibt die Wahrscheinlichkeit, durch ein negatives Testergebnis einen tatsächlich negativen Sachverhalt zu erkennen. Sie wird berechnet, indem die Anzahl der richtig negativen Ergebnisse durch die Anzahl aller tatsächlich negativen Testergebnisse dividiert wird [143].
Für die Anwendung in der Praxis bieten sich eher der positive und der negative prädiktive Wert an. Der positiv prädiktive Wert gibt den Anteil der Kranken unter allen Personen mit positivem Testergebnis an. Der negative prädiktive Wert ist als der Anteil der Gesunden unter allen Personen mit negativen Testergebnissen definiert [143].

Außerdem wird eine ROC-Analyse durchgeführt, um zu bestimmen, welcher Wert am besten als Schwellenwert für die Berechnung der Sensitivität und Spezifität geeignet ist. Die ROC-Analyse wird zur Beurteilung von diagnostischen Testen, die zwischen zwei Zuständen unterscheiden, genutzt. Dafür wird jeder der Testwerte als potentieller Schwellenwert betrachtet und für jeden dieser Schwellenwerte die Sensitivität und Spezifität berechnet.
Die jeweiligen Werte für Sensitivität und 1-Spezifität werden für jeden Testwert als Schwellenwert aufgetragen. Dies wird als ROC-Kurve bezeichnet. Als Maß für die Güte des Testes wird die Fläche unter der Kurve (Area under curve) ausgewertet. Dieser Wert kann zwischen 0,5 und 1 liegen, wobei ein Wert von 1 die höchste Güte kennzeichnet.
Außerdem wurde zur Schätzung der Signifikanz der Mann-Whitney Normality Test und der Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Der Mann-Whitney U-Test ist auch bekannt als Mann–Whitney–Wilcoxon-Test oder als Wilcoxon-Rangsummen-Test. Er ist ein Homogenitätstest und gehört zu den nicht-parametrischen Testverfahren. Dieser Test wird bei unverbundenen, zufälligen Stichproben angewendet, wenn bei einer Datenmenge keine Normalverteilung vorliegt. Nicht-parametrische Verfahren berechnen den Differenztest nicht auf der Basis von Messwerten, sondern auf Basis von Rängen. Es werden die Mediane zweier Stichproben verglichen. Mit diesem Verfahren werden die Veränderungen zwischen zwei Messpunkten darauf getestet, ob sie signifikant sind [32, 106]. Berechnet wird der p-Wert. Dieser p-Wert, auch Signifikanzwert genannt, ist das Resultat eines statistischen Signifikanztests. Das Signifikanzniveau muss dabei vorab festgelegt werden. Ist der p-Wert kleiner als dieses Niveau, gilt er als signifikant. Es wurde festgelegt, dass Ergebnisse mit einem p-Wert unter 0,05 als statistisch signifikant gelten. Wenn der p-Wert klein ist, geht man davon aus, dass die Ergebnisse nicht zufällig unterschiedlich sind, sondern dass die Gruppen eine unterschiedliche Verteilung aufweisen. Ein hoher p-Wert besagt, dass es keinen Hinweis darauf gibt, dass die untersuchten Gruppen sich unterscheiden.
Der Kruskal-Wallis Test gehört zu den nicht-parametrischen Testverfahren. Er dient beim Vorliegen von unabhängigen Variablen und nicht normal-verteilten Werten dazu, drei oder mehr ungepaarte Gruppen zu vergleichen. Damit entspricht er dem Mann-Whitney U-Test bei dem Vergleich von drei oder mehr

Werten. Mit diesem Test werden die Mediane der verschiedenen Gruppen verglichen.

In der vorliegenden Studie werden sowohl zentrale Lagemaße wie der arithmetische Mittelwert und der Median, als auch Variabilitätsmaße wie die Standardabweichung angegeben.

Die Variabilitätsmaße zeigen, wie sehr die einzelnen Werte um die zentralen Lagemaße streuen. Zu den Variabilitätsmaßen gehört die Standardabweichung. Je kleiner die Standardabweichung ist, desto kleiner ist die Streuung. Der Mittelwert ± Standardabweichung schließt 66,6 % aller Werte ein.

Außerdem wurde zum Teil die Darstellung mithilfe von Box-and-Whisker-Blots gewählt. Dies ist eine schnelle Möglichkeit, sich über die Datensätze zu informieren. Die in diesen Graphiken dargestellten Boxen werden durch das 25 %- und das 75 %-Quantil begrenzt. Zwischen der 25 %-, auch 1. Quartil genannt, und 75 %-Quantile, auch bekannt als 3. Quartil, liegt die Hälfte der beobachteten Werte. Der Median, auch das 2. Quartil genannt, wird durch den Strich in dem Kasten symbolisiert. Er teilt das Diagramm in zwei Hälften, in denen jeweils die Hälfte der beobachteten Werte liegt. Das 1. Quartil ist der Wert, unter dem 25 % der Testergebnisse liegen. Der Median wird von 50 % der Ergebnisse unterschritten. Unter dem Testwert, der das 3. Quartil darstellt, liegen 75 % der Werte [144, 146].

Weiterhin wird das 95 %-Konfidenzintervall angegeben. Ein Konfidenzintervall, auch Vertrauensbereich genannt, ist der Unsicherheitsbereich bei der Schätzung eines gesuchten, wahren Parameters. Er beinhaltet mit einer zuvor festgelegten Wahrscheinlichkeit, dem Konfidenzniveau, den nicht bekannten Parameter. Im 95 %- Konfidenzintervall befindet sich der gesuchte Parameter mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % [62, 145].

3. Ergebnisse

3.1 2D-Gelelektrophorese

Anfangs werden CyDye-gefärbte Liquorproben von nicht-dementen Patienten, Parkinson-Patienten und Parkinson-Patienten mit Demenz mittels 2D-Gelelektrophoresen analysiert. Von jeder Gruppe werden sechs Proben untersucht. Dabei wird ein interner Standard, der aus allen 18 Liquorproben besteht, verwendet, damit die Vergleichbarkeit während der folgenden Software-basierten Auswertung gewährleistet ist. Auf jedes Gel werden jeweils zwei Proben von verschiedenen Patientengruppen und der interne Standard aufgetragen. Da die Proben jeweils paarweise aufgetragen werden, führt dies dazu, dass insgesamt 18 Gele untersucht werden. Der interne Standard wird konstant mit Dye 2 markiert. Zusätzlich wird ein Dye-Wechsel durchgeführt, indem die Liquorproben von Parkinson-Patienten mit Demenz je nach Gel mit Dye 3 oder Dye 5 angefärbt werden. Dieses Verfahren wird zum Ausschluss falscher Ergebnisse aufgrund bevorzugter Bindung von bestimmten Proteinen an einen Dye-Farbstoff gewählt [27].

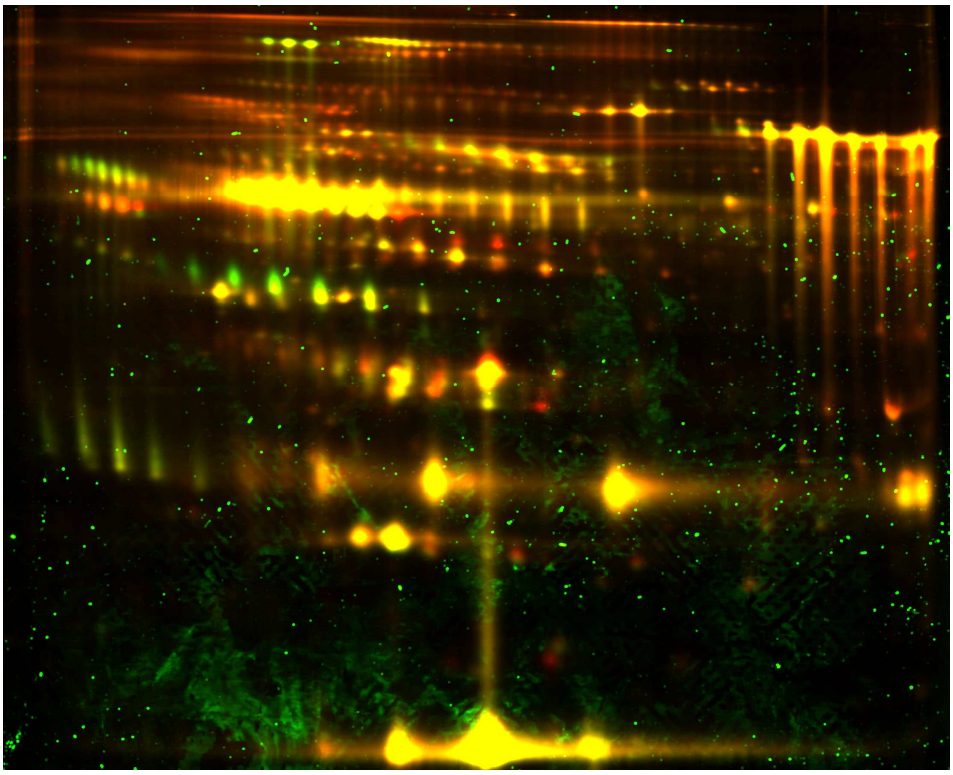

Abbildung 1: Original Beispiel-DiGE-Gel von Liquor von NDC und PDD

Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm aus den Jahren 2006 und 2007

DiGE: Fluorescence Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis, NDC: nicht-dementer Patient; PDD: Patient mit Morbus Parkinson assoziierter Demenz

Die Protein-Spots, die eine Regulation um mindestens 50 % im Vergleich zu demselben Protein auf dem jeweiligen Vergleichs-Gel zeigen, werden unter Nutzung der Software DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software ermittelt. Dies geschieht, um Proteine zu identifizieren, die zwischen zwei Proben einen signifikanten Unterschied in der Menge zeigen. Manuell wird kontrolliert, dass der Regulation keine Artefakte zugrunde liegen.

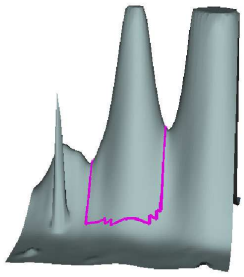

Abbildung 2: Darstellung eines Proteinspots von α1-Antitrypsin mittels DeCyder-Software bei PDD
Liquorprobe aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm aus den Jahren 2006 und 2007
PDD: Patient mit Morbus Parkinson assoziierter Demenz

Die Spots werden manuell entfernt und mittels MALDI-ToF MS/MS Analyse identifiziert. Einige Proteine, die in den Spots vorhanden sind, können nicht identifiziert werden.
Die regulierten, identifizierbaren Proteine sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Regulierte Proteine im Vergleich von NDC, PD und PDD in der 2D-Elektrophorese
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-demente Patienten; PD: Parkinson-Patienten ohne Demenz; PDD: Patient mit Morbus Parkinson assoziierter Demenz

Protein	Art der Regulation	Anzahl der Gele	Regulationsfaktor
Transferrin	PD ↑, PDD ↓	12/18	-2,91
Serpin F1	PDD ↑, NDC ↓	15/18	1,59
Serpin A8	PDD ↑, NDC ↓	18/18	1,36
Fetuin A	NDC ↑, PDD ↓	12/18	-1,32
Ceruloplasmin	PD ↑; NDC ↓	12/18	-2,23
Complement C3 precursor	NDC ↑, PDD ↓	12/18	-1,79
Zinc-alpha-2 Glycoprotein	NDC ↑, PDD ↓	12/18	-1,79
α1-Antitrypsin	PDD ↑, NDC ↓	12/18	1,61
Leucin-rich Glycoprotein	PDD ↑, NDC ↓	12/18	1,85
Serin-Threonin-Kinase 32A	PD ↑; NDC ↓	18/18	-1,76
Haptoglobin Hp2	PDD ↑, NDC ↓	18/18	1,75

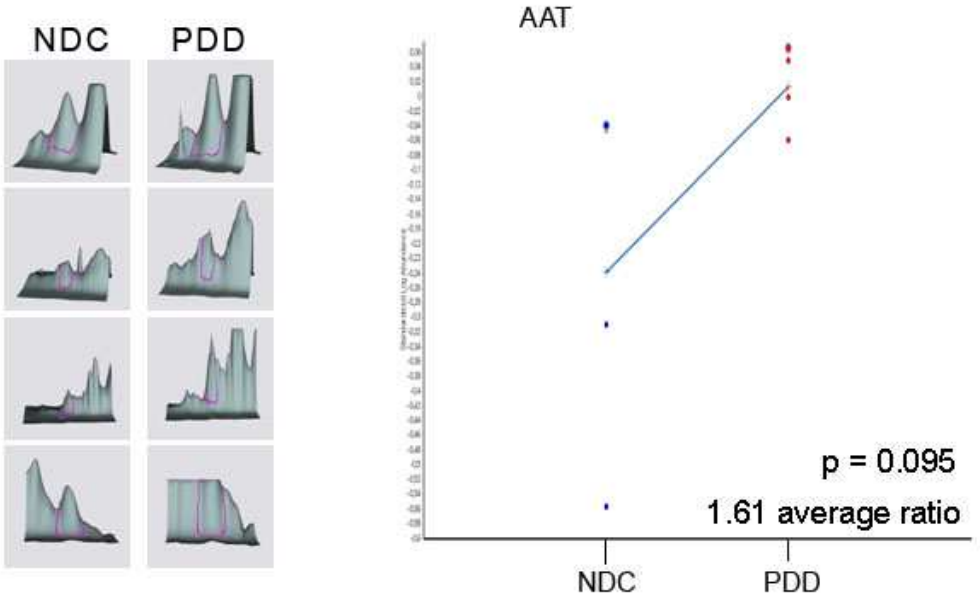

Abbildung 3: Darstellung der Regulation im Liquor an dem Beispiel von AAT
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm aus den Jahren 2006 und 2007
AAT: α1-Antitrypsin, NDC: nicht-dementen Kontrollen, PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

3.2 Western Blots

Für jedes dieser Proteine, die in der DiGE als reguliert eingestuft werden, werden Western Blots zur Bestätigung der Ergebnisse durchgeführt. Hierbei werden Liquorproben von 19 nicht-dementen Kontrollpersonen, 23 PD-Patienten und 10 PDD-Patienten untersucht.

Bei den Western Blots, mit denen Transferrin nachgewiesen wird, zeigen sich die in Tabelle 8 dargestellten Werte:

Tabelle 8: Menge an Transferrin im WB (Liquor) bei NDC-, PD- und PDD-Patienten mit Median, 25 %- und 75 %-Perzentile
Einheit: arbitrary units
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
n: Anzahl an Proben, NDC: nicht-demente Patienten; PD: Parkinson-Patienten ohne Demenz; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz, WB: Western Blot

	n	**Median**	**25 %**	**75 %**
NDC	6	280,823	176,914	307,447
PD	18	421,386	158,409	533,584
PDD	5	405,674	263,077	561,861

Anschließend werden die Proteinmengen in jeweils zwei Proben miteinander verglichen. Dabei wird PD mit PDD, NDC mit PD und NDC mit PDD betrachtet (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Vergleich von jeweils zwei Patientengruppen in Hinblick auf das Protein Transferrin im Western Blot (Liquor)
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

	Normalverteilung	**Mann-Whitney Test**
PD-PDD	gegeben (p = 0,638)	p = 0,911
NDC-PD	gegeben, (p = 0,692)	p = 0,194
NDC-PDD	gegeben, (p = 0,144)	p=0,177

Der Mann-Whitney Normality-Test wird bestanden, es liegt also eine Normalverteilung vor.

Bei der Untersuchung auf das Protein Serpin F1 zeigen sich die in Tabelle 10 dargestellten Werte:

Tabelle 10: Menge an Serpin F1 im WB (Liquor) bei NDC-, PD- und PDD-Patienten mit Median, 25 %- und 75 %-Perzentile
Einheit: arbitrary units
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinik Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
n: Anzahl, NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz, WB: Western Blot

	n	Median	25 %	75 %
NDC	13	218,601	143,744	330,205
PD	16	251,247	207,083	329,59
PDD	7	186,043	30,896	282,657

Anschließend werden wiederum die Proteinmengen in jeweils zwei Proben miteinander verglichen. Die berechneten p-Werte sind Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: Vergleich von jeweils zwei Patientengruppen in Hinblick auf das Protein Serpin F1 im Western Blot (Liquor)
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

	Normalverteilung	Mann-Whitney Test
PD-PDD	gegeben, (p = 0,852)	p= 0,242
NDC-PD	gegeben, (p = 0,848)	p = 0,497
NDC-PDD	gegeben, (p = 0,742)	p = 0,428

Darauf folgend werden Western Blots durchgeführt, die mit Antikörpern gegen Serpin A8 inkubiert werden (Tabelle 12)

Tabelle 12: Menge an Serpin A8 im WB (Liquor) bei NDC-, PD- und PDD-Patienten mit Median, 25 %- und 75 %-Perzentile
Einheit: arbitrary units
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
n: Anzahl, NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz, WB: Western Blot

	n	Median	25 %	75 %
NDC	13	131,622	38,507	555,719
PD	16	343,56	146,115	639,004
PDD	7	347,064	229,706	756,744

Dann werden die Proteinmengen in jeweils zwei Proben miteinander verglichen. Tabelle 13 zeigt die Gegenüberstellung von PD mit PDD, NDC mit PD und schließlich NDC mit PDD.

Tabelle 13: Vergleich von jeweils zwei Patientengruppen in Hinblick auf das Protein Serpin A8 im Western Blot (Liquor)
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

	Normalverteilung	**Mann-Whitney Test**
PD-PDD	gegeben, (p = 0,208)	p = 0,713
NDC-PD	nicht gegeben, (p < 0,050)	p = 0,228
NDC-PDD	nicht gegeben (p < 0,050)	p = 0,235

Auch das Protein Fetuin A wird im Western Blot untersucht. Dabei zeigen sich folgende Lagemaße in Tabelle 14.

Tabelle 14: Menge an Fetuin A im WB (Liquor) bei NDC-, PD- und PDD-Patienten mit Median, 25 %- und 75 %-Perzentile
Einheit: arbitrary units
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
n: Anzahl, NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz, WB: Western Blot

	n	**Median**	**25 %**	**75 %**
NDC	13	181,865	120,977	304,351
PD	16	156,058	65,193	211,618
PDD	7	182,89	119,196	226,993

Anschließend werden die Proteinmengen in jeweils zwei Proben miteinander verglichen. Wie bereits zuvor durchgeführt, werden PD mit PDD, NDC mit PD und NDC mit PDD verglichen (Tabelle 15)

Tabelle 15: Vergleich von jeweils zwei Patientengruppen in Hinblick auf das Protein Fetuin A im Western Blot (Liquor)
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

	Normalverteilung	**Mann-Whitney Test**
PD-PDD	gegeben, (p = 0,561)	p = 0,367
NDC-PD	gegeben, (p = 0,694)	p = 0,228
NDC-PDD	gegeben, (p = 0,245)	p = 0,937

Für das Protein Ceruloplasmin zeigen sich im Western Blot folgende Werte (Tabelle 16).

Tabelle 16: Menge an Ceruloplasmin im WB (Liquor) bei NDC-, PD- und PDD-Patienten mit Median, 25 %- und 75 %-Perzentile
Einheit: arbitrary units
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
n: Anzahl, NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz, WB: Western Blot

	n	Median	25 %	75 %
NDC	13	7,26	4,335	10,068
PD	16	9,74	6,12	12,435
PDD	7	8,39	7,095	11,663

Anschließend werden die Proteinmengen in jeweils zwei Proben miteinander verglichen: PD mit PDD, NDC mit PD und NDC mit PDD. Tabelle 17 zeigt den Vergleich von jeweils zwei Patientengruppen in Hinblick auf das Protein Ceruloplasmin.

Tabelle 17: Vergleich von jeweils zwei Patientengruppen in Hinblick auf das Protein Ceruloplasmin im Western Blot (Liquor)
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

	Normalverteilung	Mann-Whitney Test
PD-PDD	Nicht gegeben, ($p < 0,050$)	$p = 0,920$
NDC-PD	Nicht gegeben, ($p < 0,050$)	$p = 0,181$
NDC-PDD	Nicht gegeben, ($p < 0,050$)	$p = 0,383$

Bei den Western Blots, mit denen Complement C3 Vorläufer-Protein untersucht wird, zeigen sich folgende Werte (Tabelle 18).

Tabelle 18: Menge an Complement C3 Vorläufer-Protein im WB (Liquor) bei NDC-, PD- und PDD-Patienten mit Median, 25 %- und 75 %-Perzentile
Einheit: arbitrary units
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
n: Anzahl, NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz, WB: Western Blot

	n	Median	25 %	75 %
NDC	9	81,96	81,96	23,38
PD	11	82,74	41,043	484,768
PDD	6	35,555	20,99	59,71

Anschließend werden die Proteinmengen von jeweils zwei Proben einander gegenübergestellt. Der Vergleich geschieht nach oben beschriebenem Schema. Die Ergebnisse sind Tabelle 19 zu entnehmen.

Tabelle 19: Vergleich von jeweils zwei Patientengruppen in Hinblick auf das Protein Complement C3 Vorläufer-Protein im Western Blot (Liquor)
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

	Normalverteilung	**Mann-Whitney Test**
PD-PDD	Nicht gegeben, (p < 0,050)	p = 0,119
NDC-PD	Nicht gegeben, (p < 0,050)	p = 0,543
NDC-PDD	Nicht gegeben, (p < 0,050)	p = 0,444

Bei der Untersuchung des Proteins Zinc-alpha-2 Glycoprotein zeigen sich folgende Ergebnisse (vergleiche Tabelle 20).

Tabelle 20: Menge an Zinc-alpha-2 Glycoprotein im Western Blot (Liquor) bei NDC-, PD- und PDD-Patienten mit Median, 25 %- und 75 %-Perzentile
Einheit: arbitrary units
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
n: Anzahl, NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

	n	**Median**	**25 %**	**75 %**
NDC	6	122,61	59,11	475,3
PD	20	147,31	85,69	516,895
PDD	8	152,44	107,855	313,44

Auch hier werden die Proteinmengen in jeweils zwei Proben miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 beschrieben.

Tabelle 21: Vergleich von jeweils zwei Patientengruppen in Hinblick auf das Protein Zinc-alpha-2 Glycoprotein im Western Blot (Liquor)
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson- assoziierter Demenz

	Normalverteilung	**Mann-Whitney Test**
PD-PDD	Nicht gegeben, (p < 0,050)	p = 0,899
NDC-PD	Nicht gegeben, (p < 0,050)	p= 0,523
NDC-PDD	Nicht gegeben, (p < 0,050)	p= 0,662

Das Protein α1-Antitrypsin ist in den Tabelle 22 zu entnehmenden Mengen in den Liquorproben enthalten.

Tabelle 22: Menge an α1-Antitrypsin im Western Blot (Liquor) bei NDC-, PD- und PDD-Patienten mit Median, 25 %- und 75 %-Perzentile
Einheit: arbitrary units
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
n: Anzahl, NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

	n	**Median**	**25 %**	**75 %**
NDC	19	171,606	93,389	506,485
PD	23	300,629	85,114	456,581
PDD	10	593,855	375,764	706,672

Anschließend werden die Proteinmengen in jeweils zwei Proben miteinander verglichen (siehe Tabelle 23). PD wird mit PDD, NDC mit PD und NDC mit PDD verglichen.

Tabelle 23: Vergleich von jeweils zwei Patientengruppen in Hinblick auf das Protein α1-Antitrypsin im Western Blot (Liquor)
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

	Normalverteilung	**Mann-Whitney Test**
PD-PDD	gegeben, ($p = 0{,}223$)	$p = 0{,}020$
NDC-PD	Nicht gegeben, ($p < 0{,}050$)	$p = 0{,}960$
NDC-PDD	Nicht gegeben, ($p < 0{,}050$)	$p = 0{,}037$

Die Analyse der Proteine Serin-threonin-kinase 32 A, Leucin-rich α 2 Glykoprotein 1 und Haptoglobin Hp2 ist im Western-Blot aufgrund der niedrigen Konzentrationen nicht möglich.
Dementsprechend zeigt die quantitative Analyse nur für α1-Antitrypsin eine signifikante Regulation: Dieses Protein ist zum einen zwischen PDD und PD, zum anderen zwischen PDD und NDC signifikant reguliert. Die jeweiligen p-Werte aller analysierten Proteine sind Tabelle 24 zu entnehmen.

Tabelle 24: Signifikanztest der Regulation von unterschiedlichen Proteine im Western Blot (Liquor) im Vergleich der drei Gruppen NDC; PD und PDD, berechnet mittels des Mann-Whitney-Tests.
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

Protein	PD vs. PDD	PD vs. NDC	PDD vs. NDC
Complement C3 Vorläufer	p = 0.119	p = 0.543	p = 0.444
Ceruloplasmin	p = 0.920	p = 0.181	p = 0.383
Fetuin A	p = 0.367	p = 0.228	p = 0.937
α1-Antitrypsin	p = 0.020	p = 0.960	p = 0.037
Serpin A8	p = 0.713	p = 0.228	p = 0.235
Serpin F1	p = 0.242	p = 0.228	p = 0.428
Transferrin	p = 0.911	p = 0.194	p = 0.177
Zinc-alpha-2 Glycoprotein	p = 0.899	p = 0.523	p = 0.662

α1-Antitrypsin zeigt zwar eine signifikante Regulation, aber auch deutliche Überschneidungen zwischen den analysierten Gruppen. Dies ist in Abbildung 4 dargestellt.

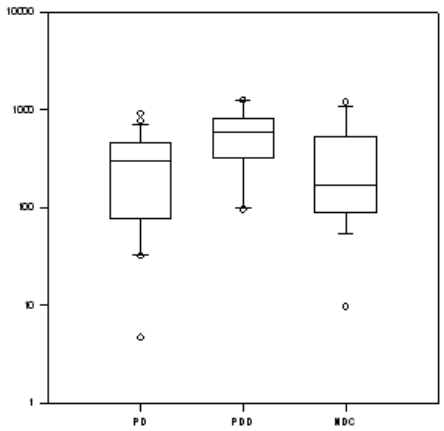

Abbildung 4: Menge an α1-Antitrypsin im Western Blot (Liquor)
Darstellung der Lagemaße mittels Boxplot
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

Aufgrund der Überschneidungen der verschiedenen Gruppen eignet sich die Bestimmung der Menge von α1-Antitrypsin allein nicht zur Diagnostik.

3.3 2D-Blots von Liquorproben

α1-Antitrypsin wird weiter untersucht, da es eine signifikante Regulation zwischen PD und PDD zeigt. Damit scheint es zur Identifikation von Parkinson-Patienten, die eine Demenz haben, prinzipiell geeignet zu sein. Auch im Vergleich von PDD und NDC zeigt sich eine Regulation. Im Gegensatz hierzu ist zwischen PD und NDC keine signifikante Regulation zu beobachten. Da trotz signifikanter Regulation eine Überschneidung zwischen den verschiedenen Gruppen zu sehen ist, werden die Liquorproben außerdem in 2D-Blots verglichen.

Aus diesem Grund werden 2D-Blots mit den Liquorproben von nicht-dementen Patienten, Patienten mit Morbus Parkinson und Patienten mit Parkinson-Demenz durchgeführt. Diese werden auf das Protein α1-Antitrypsin untersucht. Durch 2D-Blots können verschiedene Isoformen in den einzelnen Gruppen dargestellt werden. Hierdurch ist zu erwarten, dass ein Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen – wenn vorhanden – zu sehen ist.

Es können in den verschiedenen Gruppen unterschiedliche Isoformen-Muster dargestellt werden. In den Liquorproben der PD und NDC zeigen sich meist fünf Isoformen. In den Proben der PDD-Patienten sind meist sechs oder mehr Isoformen zu sehen. Diese Daten können auch mit den Proben aus Kuopio/Finnland und Perugia/Italien reproduziert werden. Alle Proben werden verblindet untersucht.

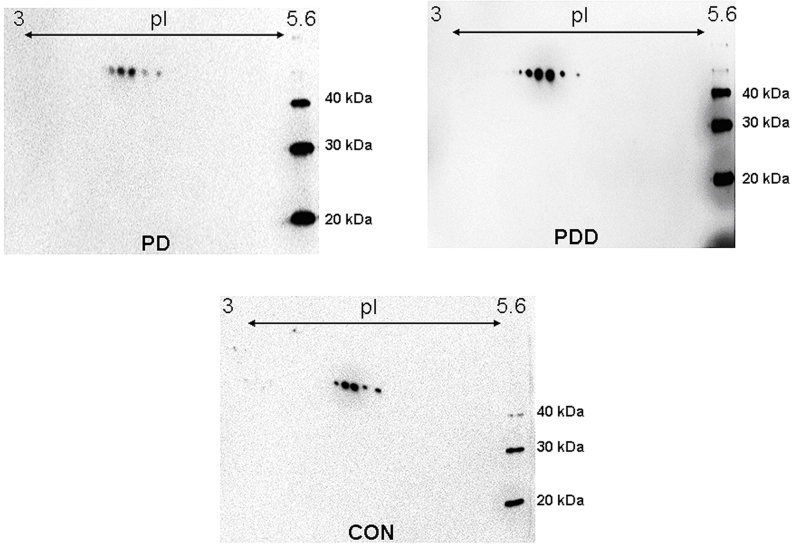

Abbildung 5: Beispiele für typische Verteilung der Isoformen von α 1-Antitrypsin im Liquor von NDC, PD und PDD
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinik Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

Von allen Proben wurden die 25 %- und die 75 %-Perzentile, der Median, die minimale und die maximale Anzahl an Isoformen in der jeweiligen Gruppe, der Mittelwert, die Standardabweichung und das 95 %-Konfidenzintervall berechnet. Diese Werte sind Tabelle 25 zu entnehmen.

Tabelle 25: Verteilung der Isoformen im Liquor bei NDC, PD und PDD
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
IF: Isoformen, KI: Konfidenzintervall, NDC: nicht-dementer Patient, PD: Patient mit Morbus Parkinson, PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz, SD: Standardabweichung,

	Anzahl bei NDC	**Anzahl bei PD**	**Anzahl bei PDD**
Minimum	2,000	4,000	5,000
25 %-Perzentile	3,000	5,000	6,000
Median	4,000	5,000	6,000
75 %-Perzentile	5,000	5,000	7,000
Maximum	6,000	6,000	7,000
Mittelwert	4,156	4,929	6,286
SD	0,9873	0,4746	0,6437
95 %-KI	3,800-4,512	4,655-5,203	5,993-6,579

Im Liquor werden die drei Gruppen NDC, PD und PDD miteinander verglichen. Der Kruskal-Wallis-Test mit einem p-Wert, der kleiner als 0,0001 ist, zeigt, dass die drei Gruppen signifikant variieren.
Die graphische Darstellung der Anzahl der Isoformen ist in Abbildung 6 zu sehen.

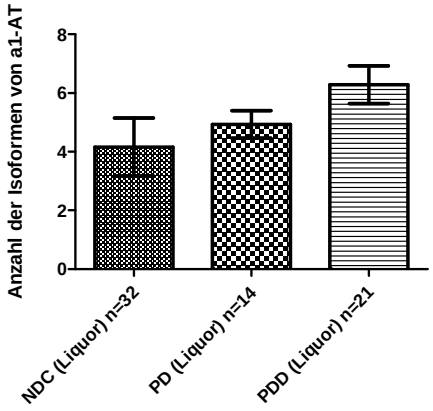

Abbildung 6: Anzahl an Isoformen von Alpha-1-Antitrypsin im Liquor von NDC, PD und PDD
Mittelwert mit Standardabweichung
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
α1-AT: α1-Antitrypsin, NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson, PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

Die Lagemaße können mittels der Boxplot-Darstellung gut dargestellt werden. Dies ist in Abbildung 7 zu sehen.

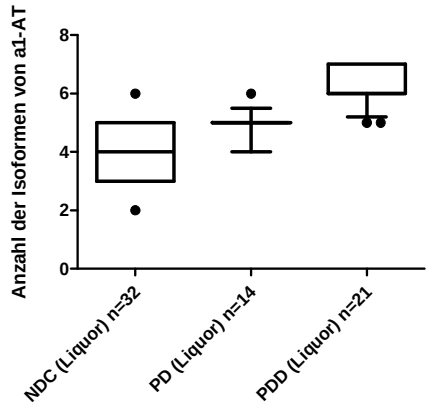

Abbildung 7: Anzahl an Isoformen von α-1-Antitrypsin im Liquor von NDC, PD und PDD
Angabe von 25 %-, 50 %- und 75 %-Perzentile
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
α1-AT: α1-Antitrypsin, NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson, PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

Weiter wird die Anzahl an Isoformen im Liquor zwischen NDC und PDD verglichen. Dem Vergleich liegen 32 Liquorproben von NDC und 21 Liquorproben von PDD zugrunde. Bei der Durchführung des Mann-Whitney-Tests ergibt sich ein p-Wert von <0,0001. Damit sind die Mediane signifikant unterschiedlich.

Nun soll aus der Anzahl der Isoformen bei NDC und PDD die Sensitivität, Spezifität, der positive und der negative prädiktive Wert berechnet werden. Dafür muss ein Schwellenwert für die Vierfeldertafel festgelegt werden. Für diesen Zweck wird die ROC-Analyse angewandt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind Tabelle 26 zu entnehmen. Die ROC-Kurve ist in Abbildung 8 zu sehen.

Tabelle 26: Angabe von Sensitivität und Spezifität für verschiedene Schwellenwerte der Isoformen von α1-Antitrypsi beim Vergleich von NDC und PDD im Liquor
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
KI: Konfidenzintervall NDC: nicht-dementer Patient; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

Schwellenwert	Sensitivität in %	95 % KI	Spezifität in %	95 % KI
> 2,500	100	83,89 % - 100,0 %	3,125	0,079 % - 16,22 %
> 3,500	100,0	83,89 % - 100,0 %	31,25	16,12 % - 50,01 %
> 4,500	100,0	83,89 % - 100,0 %	53,13	34,74 % - 70,91 %
> 5,500	90,48	69,62 % - 98,83 %	96,88	83,78 % - 99,92 %
> 6,500	38,10	18,11 % - 61,56 %	100,0	89,11 % - 100,0 %

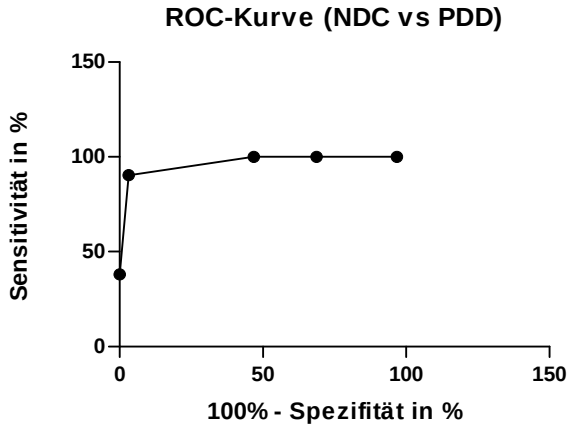

Abbildung 8: ROC-Kurve - Vergleich von Sensitivität und Spezifität bei unterschiedlichen Schwellenwerten von α1-Antitrypsin-Isoformen bei NDC und PDD im Liquor
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-dementer Patient; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz, ROC: Receiver Operating Characteristic

Die Berechnung der Fläche unter der Kurve ergibt 0,9680. Das 95 %-Konfidenzintervall beträgt 0,9242 bis 1,012.

Nach Erhebung dieser Daten wird der Schwellenwert für die Vierfeldertafel auf 5,5 festgelegt. Dieser Schwellenwert wird für alle anderen Differenzierungen übernommen.

Es werden 32 Proben von NDC und 21 Proben von PDD verglichen. Es wird eine Vierfeldertafel berechnet (Tabelle 27)

Tabelle 27: Verteilung der α-1-Antitrypsin-Isoformen im Liquor bei PD und PDD
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson assoziierter Demenz

	NDC	**PDD**
≤5	31	2
≥6	1	19

Die Sensitivität des Testes zur Unterscheidung von NDC und PDD beträgt 90,5 %, die Spezifität 96,9 %. Der positive prädiktive Wert beträgt 95 %, der negative prädiktive Wert beträgt 93,3 %.
Es werden 32 Liquor-Proben von nicht-dementen Kontrollpersonen und 14 Proben von Parkinson-Patienten untersucht. Bei der Darstellung des Vergleichs der Liquorproben von den nicht-dementen Kontrollen und von den Parkinson-Patienten ergeben sich die Tabelle 28 zu entnehmenden Werte.

Tabelle 28: Verteilung der α1-Antitrypsin-Isoformen im Liquor bei NDC und PD
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson

	NDC	**PD**
≤5	31	13
≥6	1	1

Aus der Anzahl der Isoformen werden Berechnungen angestellt. Die Sensitivität des Testes zur Unterscheidung von PD und NDC beträgt 7,1 %. die Spezifität 96,90 %. Der positive prädiktive Wert beträgt 50 %, der negative prädiktive Wert beträgt 70,5 %.

Es wurden 14 Proben von Parkinson-Patienten und 21 Proben von Patienten, die mit Parkinson-assoziierte Demenz haben, untersucht.
Dies wird durch eine Vierfeldertafel berechnet, welche in Tabelle 29 zu sehen ist.

Tabelle 29: Verteilung der α1-Antitrypsin-Isoformen im Liquor bei PD und PDD
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinik Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson assoziierter Demenz

	PD	**PDD**
≤5	13	2
≥6	1	19

Die Sensitivität des Testes zur Unterscheidung von PD und PDD beträgt 90,5 %, die Spezifität 92,9 %. Der positive prädiktive Wert liegt bei 95 %, der negative prädiktive Wert bei 86,7 %.

Anschließend werden Liquorproben von Patienten mit Alzheimer-Demenz, Creutzfeldt-Jakob-Demenz und mit frontotemporaler Demenz untersucht. Dies geschieht mit dem Ziel, festzustellen, ob nur bei mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz oder generell bei Demenz zusätzliche Isoformen von α1-Antitrypsin vorkommen. Es wurden 18 Proben von Patienten mit anderen Demenzen untersucht, jeweils sechs Proben der genannten drei Gruppen von Demenzerkrankungen. Diese drei Demenzgruppen werden zunächst zu einer zusammengefasst, die PDD gegenüber gestellt wird.

Dabei zeigt sich folgende Verteilung (Tabelle 30).

Tabelle 30: Lagemaße der Isoformen von α1-Antitrypsin im Liquor von PDD-, AD-, CJD- und FTLD-Patienten
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
AD: Morbus Alzheimer, CJD: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, FTLD: Frontotemporale Demenz, 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall, PDD: Patient mit Morbus Parkinson assoziierter Demenz, SD: Standardabweichung

	Anzahl bei AD	**Anzahl bei CJD**	**Anzahl bei FTLD**	**Anzahl bei PDD**
Minimum	3,000	4,000	3,000	5,000
25 %-Perzentile	5,250	4,750	3,750	6,000
Median	6,500	5,000	5,000	6,000
75 %-Perzentile	7,000	5,250	5,250	7,000
Maximum	7,000	6,000	6,000	7,000
Mittelwert	6,000	5,000	4,667	6,286
SD	1,549	0,6325	1,033	0,6437
95 %-KI	4,374-7,626	4,336-5,664	3,583-5,751	5,993-6,579

Typische Verteilungen der Isoformen bei AD, CJD und FTLD zeigt Abbildung 9.

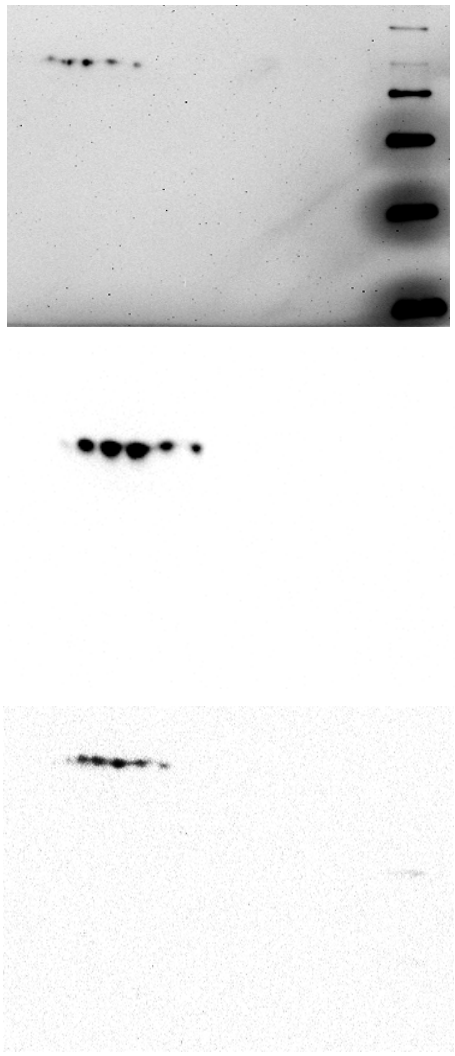

Abbildung 9: Beispiele für typische Verteilung der Isoformen von Alpha1-Antitrypsin im Liquor von AD, CJD und FTLD (in dieser Reihenfolge)
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
AD: Morbus Alzheimer, CJD: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, FTLD: Frontotemporale Demenz

Mit einem p-Wert von 0,003 variieren die Mediane der beiden Gruppen signifikant. Im direkten Vergleich zu PDD zeigen sich die Lagemaße folgendermaßen (Abbildung 10).

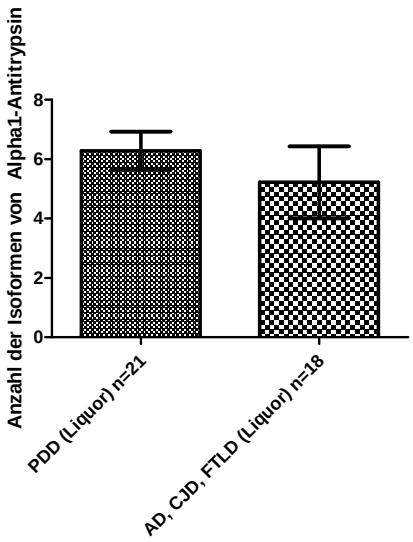

Abbildung 10: Anzahl an Isoformen von α1-Antitrypsin im Liquor von PDD, AD, CJD und FTLD
Angabe von Mittelwert und Standardabweichung
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
AD: Morbus Alzheimer, CJD: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, FTLD: Frontotemporale Demenz, PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

Die Darstellung der Isoformen mittels Boxplotdarstellung zeigt sich folgendermaßen (Abbildung 11).

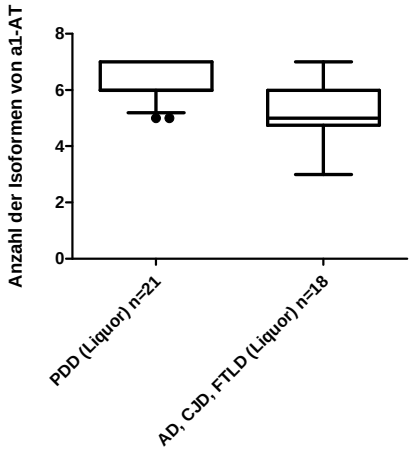

Abbildung 11: Anzahl an Isoformen von α1-Antitrypsin im Liquor von PDD, AD, CJD und FTLD
Angabe von 25 %-, 50 %- und 75 %-Perzentile
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
α1-AT: α1-Antitrypsin, AD: Morbus Alzheimer, CJD: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, FTLD: Frontotemporale Demenz, PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

Es wurden 18 Proben von Patienten mit AD, CJD oder FTLD und 21 Proben von PDD-Patienten analysiert (siehe Tabelle 31).

Tabelle 31: Verteilung der α1-Antitrypsin-Isoformen im Liquor bei PDD und anderen Demenzen
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
AD: Morbus Alzheimer, CJD: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, FTLD: Frontotemporale Demenz, PDD: Patient mit Morbus Parkinson assoziierter Demenz

	AD, CJD, FTLD	**PDD**
≤5	11	2
≥6	7	19

Die Sensitivität des Testes zur Unterscheidung von PDD und anderen Demenzen beträgt 90,5 %, die Spezifität 61,1 %. Der positive prädiktive Wert beträgt 73,10 %, der negative prädiktive Wert beträgt 84,6 %.
Auch der Vergleich mit den einzelnen Demenzgruppen ist sinnvoll, um bei schwieriger klinischer Unterscheidung einen Differenzierungsmarker zur Verfügung zu haben. Abbildung 12 zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichung der einzelnen Patientengruppen.

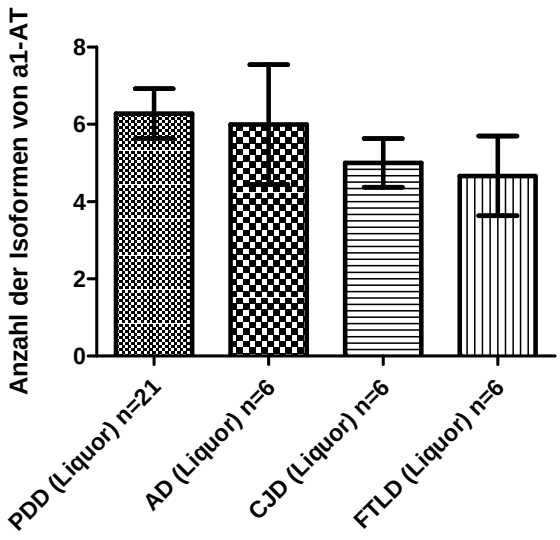

Abbildung 12: Anzahl an Isoformen von α1-Antitrypsin im Liquor von PDD, AD, CJD und FTLD
Angabe von Mittelwert und Standardabweichung
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
α1-AT: α1-Antitrypsin, AD: Morbus Alzheimer, CJD: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, FTLD: Frontotemporale Demenz, PDD: Patient mit Morbus Parkinson assoziierter Demenz

Abbildung 13 zeigt die Lagemaße der einzelnen Patientengruppen mittels Boxplot-Darstellung.

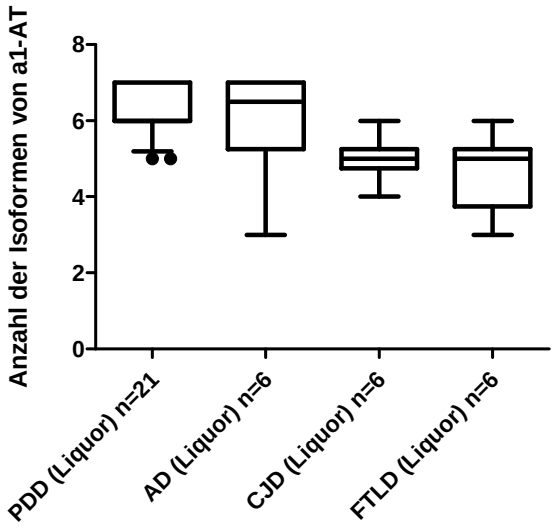

Abbildung 13: Anzahl an Isoformen von α1-Antitrypsin im Liquor von PDD, AD, CJD und FTLD
Angabe von 25 %-, 50 %- und 75 %-Perzentile
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
α1-AT: α1-Antitrypsin, AD: Morbus Alzheimer, CJD: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, FTLD: Frontotemporale Demenz, PDD: Patient mit Morbus Parkinson assoziierter Demenz

Bei dem Vergleich von AD und PDD wird ein p-Wert von 0,8722 berechnet. Es liegt also keine signifikante Regulation vor.

Wenn α1-Antitrypsin im Liquor bei PDD und CJD verglichen wird, ergibt sich ein p-Wert von 0,0015. Damit liegt eine signifikante Regulation vor.
Die Vierfeldertafel des Vergleiches von PDD und CJD ist Tabelle 32 zu entnehmen.

Tabelle 32: Verteilung der α1-Antitrypsin-Isoformen im Liquor bei PDD und CJD
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
CJD: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, PDD: Patient mit Morbus Parkinson assoziierter Demenz

	CJD	**PDD**
≤5	5	2
≥6	1	19

Die Sensitivität liegt hier bei 90,5 %. Die Spezifität ergibt 83,3 %. Der positive prädiktive Wert beträgt 95 %, der negative 71,4 %.
Auch die Unterscheidung anhand von Liquorproben von FTLD und PDD kann sinnvoll sein. Bei der statistischen Berechnung ergibt sich ein p-Wert von 0,0012. Damit zeigen die Isoformen im Liquor von FTLD- und PDD-Patienten signifikante Unterschiede. Die Vierfeldertafel des Vergleiches ist in Tabelle 33 zu sehen.

Tabelle 33: Verteilung der α1-Antitrypsin-Isoformen im Liquor bei PDD und FTLD
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
FTLD: Frontotemporale Demenz, PDD: Patient mit Morbus Parkinson assoziierter Demenz

	FTLD	**PDD**
≤5	5	2
≥6	1	19

Die Sensitivität beträgt hier 90,5 %. Die Spezifität wird mit 83,3 % berechnet. Der positive prädiktive Wert liegt bei 95 %, der negative bei 71,4 %.

3.4 2D-Blots von Serumproben

Im nächsten Schritt werden 2D-Blots mit Serumproben dieser Patientengruppen durchgeführt. Zunächst werden 26 Serumproben von NDC, 21 Serumproben von PD und 26 Proben von PDD untersucht und die Lagemaße berechnet (Tabelle 34).

Tabelle 34: Verteilung der Isoformen von α1-Antitrypsin im Serum bei NDC, PD und PDD
Serumproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
IF: Isoformen, KI: Konfidenzintervall NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz, SD: Standardabweichung

	Anzahl bei NDC	**Anzahl bei PD**	**Anzahl bei PDD**
Minimum	3,000	4,000	3,000
25 %-Perzentile	4,750	5,000	4,750
Median	6,000	5,000	6,000
75 %-Perzentile	7,000	5,500	7,000
Maximum	8,000	7,000	8,000
Mittelwert	5,654	5,143	5,654
SD	1,648	0,8536	1,648
95 %-KI	4,988-6,319	4,754-5,531	4,988-6,319

2D-Blots mit typischer Verteilung der Isoformen sind in Abbildung 14 zu sehen.

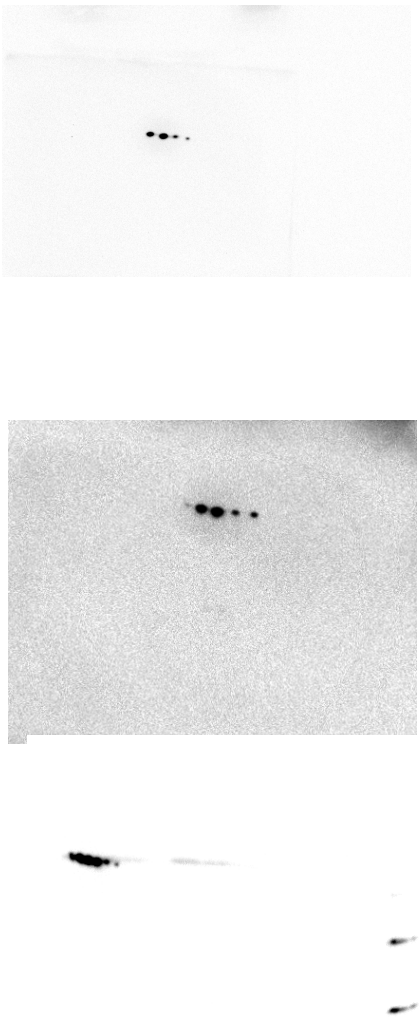

Abbildung 14: Beispiele für typische Verteilung der Isoformen von α1-Antitrypsin im Serum in der Reihenfolge NDC, PD und PDD
Serumproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

Graphisch dargestellt sehen die Mittelwerte mit der Standardabweichung folgendermaßen aus (Abbildung 15).

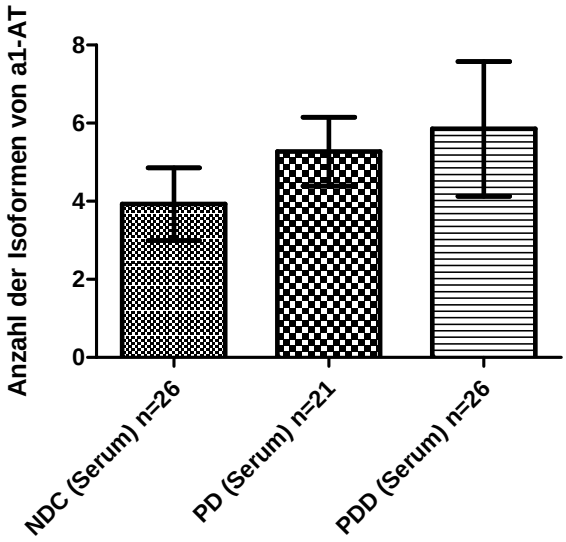

Abbildung 15: Anzahl an Isoformen von α1-Antitrypsin im Serum von NDC, PD und PDD
Mittelwerte mit Standardabweichung
Serumproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
a1-AT: a1-Antitrypsin, NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson, PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

Die Lagemaße werden mittels einer Boxplot-Darstellung präsentiert (Abbildung 16).

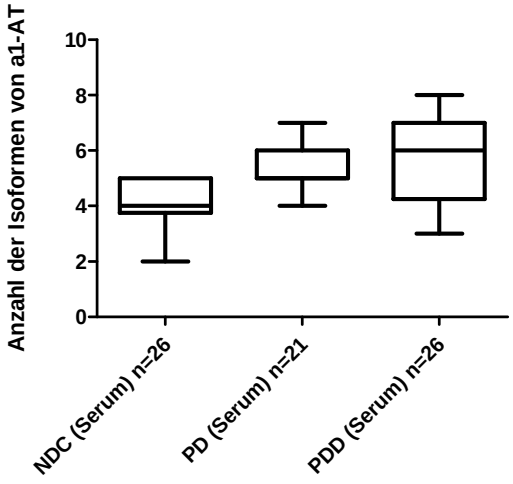

Abbildung 16: Anzahl an Isoformen von α1-Antitrypsin im Serum von NDC, PD und PDD
Angabe von 25 %-, 50 %- und 75 %-Perzentile
Serumproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
α1-AT: α1-Antitrypsin NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson, PDD: Patient mit Morbus Parkinson assoziierter Demenz

Zuerst werden die Isoformen bei den NDC und PD verglichen, um eine mögliche Nutzung des Parameters zur Diagnose von Morbus Parkinson zu überprüfen. Hier werden 26 NDC-Proben und 21 PD-Serumproben verglichen. Bei der Durchführung des Mann-Whitney-Tests wird ein p-Wert von <0,0001 berechnet. Folglich sind die Mediane der verglichenen Gruppen signifikant unterschiedlich.
Mit den ermittelten Werten werden Sensitivität, Spezifität, der positive und der negative prädiktive Wert berechnet (siehe Tabelle 35).

Tabelle 35: Verteilung der α1-Antitrypsin-Isoformen im Serum bei NDC und PD
Serumproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-dementer Patient; PD: Patient mit Morbus Parkinson

	NDC	**PD**
≤5	26	16
≥6	0	5

Die Sensitivität des Testes zur Unterscheidung von NDC und PD beträgt 23,8 %, die Spezifität 100 %. Der positiv prädiktive Wert beträgt 100 %, der negative prädiktive Wert beträgt 61,9 %.
Als nächstes werden die Serumproben von 26 NDC-Patienten mit denen von 26 PDD-Patienten verglichen.
Bei diesem Vergleich zeigen sich folgende Sensitivität, Spezifität, positiver und der negativer prädiktive Wert (siehe Tabelle 36).

Tabelle 36: Verteilung der α1-Antitrypsin-Isoformen im Serum bei NDC und PDD
Serumproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
NDC: nicht-dementer Patient; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

	NDC	**PDD**
≤5	26	12
≥6	0	14

Die Sensitivität des Testes zur Unterscheidung von PD und PDD beträgt 53,8 %, die Spezifität 100 %. Der positiv prädiktive Wert beträgt 100 %, der negative prädiktive Wert beträgt 68,20 %.

Anschließend werden 21 PD-Proben und 26 PDD-Proben untersucht, um zu überprüfen, ob man anhand von Serumproben die Entwicklung einer Demenz bei Parkinson-Patienten feststellen kann.
Die ermittelten Werten lassen sich folgendes darstellen (vergleiche Tabelle 37).

Tabelle 37: Verteilung der α1-Antitrypsin-Isoformen im Serum bei PD und PDD
Serumproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
PD: Patient mit Morbus Parkinson; PDD: Patient mit Morbus Parkinson-assoziierter Demenz

	PD	**PDD**
≤5	16	12
≥6	5	14

Die Sensitivität des Testes zur Unterscheidung von PD und PDD beträgt 53,8 %, die Spezifität 76,2 %. Der positive prädiktive Wert beträgt 73,70 %, der negative prädiktive Wert beträgt 57,10 %.
Außerdem werden die Serum-Proben von Patienten mit anderen Demenzen untersucht. Auch hier wurde die Isoformenverteilung von PDD und anderer Demenzen (AD, FTLD, CJD) im Serum verglichen. Die Lagemaße sind folgende:

Tabelle 38: Lagemaße der Isoformen im Serum von PDD-, AD-, CJD- und FTLD-Patienten
Serumproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
AD: Morbus Alzheimer, CJD: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, FTLD: Frontotemporale Demenz, 95%-KI: 95%-Konfidenzintervall, PDD: Patient mit Morbus Parkinson und Demenz, SD: Standardabweichung

	Anzahl bei AD	**Anzahl bei CJD**	**Anzahl bei FTLD**	**Anzahl bei PDD**
Minimum	2,000	1,000	2,000	3,000
25 %-Perzentile	3,000	2,000	3,000	4,750
Median	4,000	4,000	4,000	6,000
75 %-Perzentile	5,000	5,000	5,000	7,000
Maximum	7,000	6,000	7,000	8,000
Mittelwert	3,964	3,514	4,182	5,654
SD	1,453	1,502	1,181	1,648
95 %-KI	3,401-4,528	3,013-4,014	3,658-4,705	4,988-6,319

Die typischen Isofomenverteilungen bei den verschiedenen Demenzgruppen sind in den 2D-Blots in Abbildung 17 zu sehen.

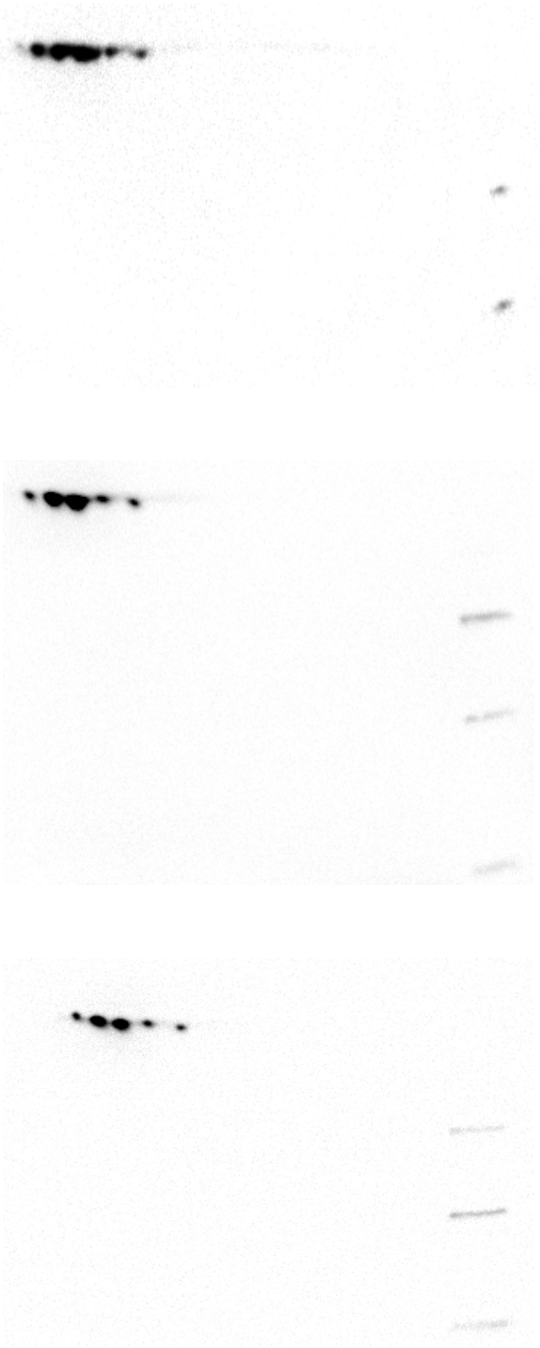

Abbildung 17: Beispiele für typische Verteilung der Isoformen von α1-Antitrypsin im Serum in der Reihenfolge AD, CJD und FTLD
Serumproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
AD: Morbus Alzheimer, CJD: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, FTLD: Frontotemporale Demenz

Bei der Durchführung des Mann-Whitney-Testes ergibt sich ein p-Wert von 0,0012. Im Serum liegt folglich eine signifikante Regulation der Isoformen bei PDD und anderen Demenzen vor. Graphisch dargestellt sieht dies folgendermaßen aus (Abbildung 18).

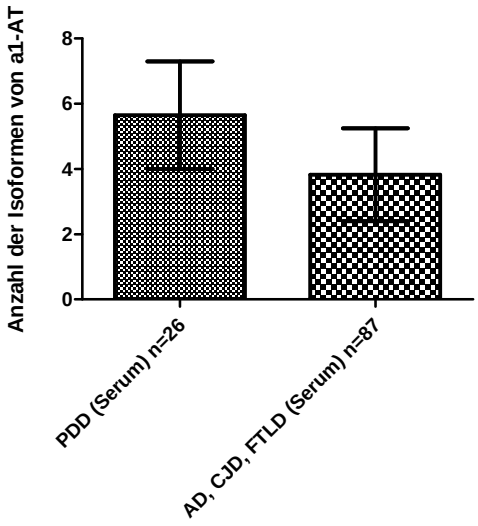

Abbildung 18: Anzahl an Isoformen von α1-Antitrypsin im Serum von PDD und AD, CJD und FTLD
Angabe von Mittelwert und Standardabweichung
Serumproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
a1-AT: a1-Antitrypsin, AD: Morbus Alzheimer, CJD: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, FTLD: Frontotemporale Demenz, PDD: Patient mit Morbus Parkinson und Demenz

Die Lagemaße werden mit Boxplots dargestellt (vergleiche Abbildung 19).

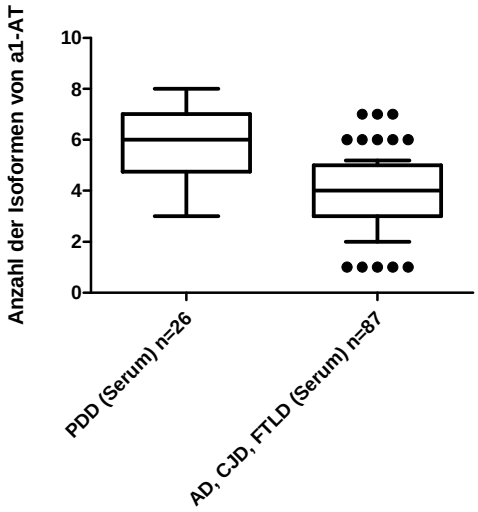

Abbildung 19: Anzahl an Isoformen von Alpha-1-Antitrypsin im Serum von PDD und AD, CJD und FTLD
Angabe von 25 %-, 50 %- und 75 %-Perzentile
Serumproben aus der Neurologie, Universitätsklinik Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
α1-AT: α1-Antitrypsin, AD: Morbus Alzheimer, CJD: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, FTLD: Frontotemporale Demenz, PDD: Patient mit Morbus Parkinson und Demenz

Die Vierfeldertafel des Vergleiches der 26 Proben von Parkinson-Demenz-Patienten und der 87 Proben von Patienten mit anderen Demenzen ist Tabelle 39 zu entnehmen.

Tabelle 39: Verteilung der α1-Antitrypsin-Isoformen im Serum bei PDD und AD, CJD und FTLD
Serumproben aus der Neurologie, Universitätsklinik Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
AD: Morbus Alzheimer, CJD: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, FTLD: Frontotemporale Demenz, PDD: Patient mit Morbus Parkinson und Demenz

	AD, CJD, FTLD	**PDD**
≤5	79	12
≥6	8	14

Die Sensitivität des Testes zur Unterscheidung von PD und PDD beträgt 53,80 %, die Spezifität 90,8 %. Der positiv prädiktive Wert beträgt 63,30 %, der negative prädiktive Wert beträgt 86,80 %.
Auch im Serum kann eine Unterscheidung von PDD und einzelnen anderen Demenzgruppen sinnvoll sein.
Die Mittelwerte und die Standardabweichung der einzelnen Gruppen sind in Abbildung 20 zu sehen.

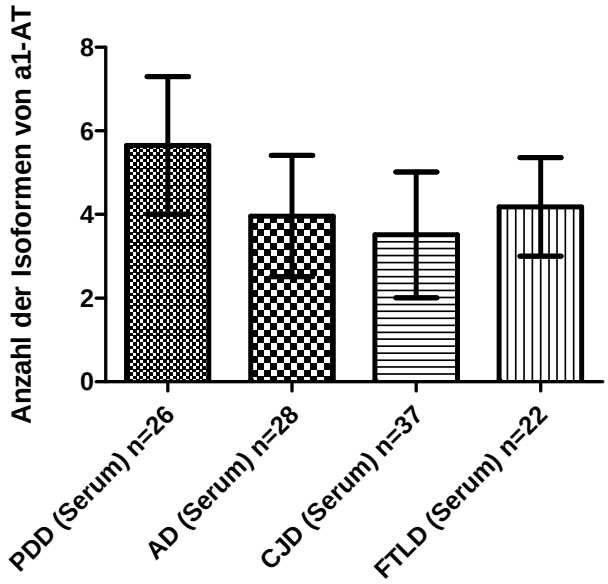

Abbildung 20: Anzahl an Isoformen von α1-Antitrypsin im Serum von PDD, AD, CJD und FTLD Angabe von Mittelwert und Standardabweichung
Serumproben aus der Neurologie, Universitätsklinik Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
α1-AT: α1-Antitrypsin, AD: Morbus Alzheimer, CJD: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, FTLD: Frontotemporale Demenz, PDD: Patient mit Morbus Parkinson und Demenz

Die Abbildung 21 zeigt die 25 %-, 50 %- und 75 %-Perzentilen der verschiedenen Demenzgruppen.

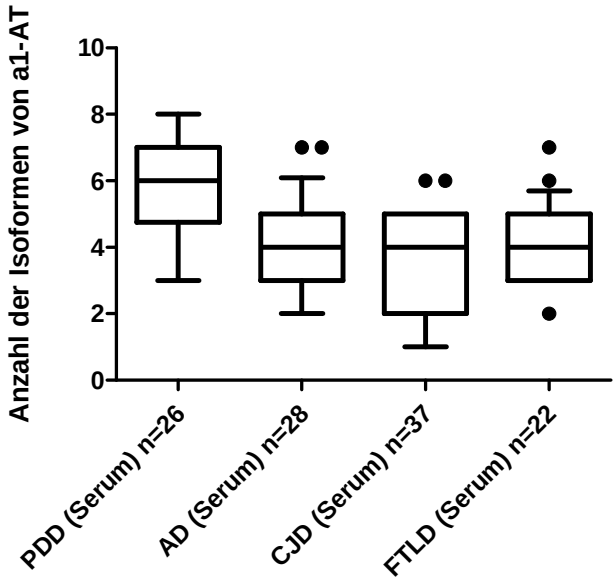

Abbildung 21: Anzahl an Isoformen von α1-Antitrypsin im Serum von PDD, AD, CJD und FTLD
Angabe von 25 %-, 50 %- und 75 %-Perzentile
Serumproben aus der Neurologie, Universitätsklinik Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
α1-AT: α1-Antitrypsin, AD: Morbus Alzheimer, CJD: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, FTLD: Frontotemporale Demenz, PDD: Patient mit Morbus Parkinson und Demenz

Der p-Wert des Mann-Whitney-Tests bei der Differenzierung von PDD und AD beträgt 0,0005. Also sind die beiden Gruppen signifikant unterschiedlich. Die Werte der Vierfeldertafel sind Abbildung 40 zu entnehmen.

Tabelle 40: Verteilung der α1-Antitrypsin-Isoformen im Serum bei PDD und AD
Serumproben aus der Neurologie, Universitätsklinik Ulm, Neurologie, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
AD: Morbus Alzheimer, PDD: Patient mit Morbus Parkinson und Demenz

	AD	**PDD**
≤5	24	12
≥6	4	14

Die Sensitivität des Testes zur Unterscheidung von AD und PDD beträgt 53,8 %, die Spezifität 85,7 %. Der positive prädiktive Wert beträgt 77,80 %, der negative prädiktive Wert beträgt 66,7 %.

Auch hier wird ein Vergleich von PDD und CJD im Serum durchgeführt. Der p-Wert des Mann-Whitney-Tests ist kleiner als 0,0001 und damit signifikant. Die Verteilungen der Isoformen sind in Tabelle 41 beschrieben.

Tabelle 41: Verteilung der α1-Antitrypsin-Isoformen im Serum bei PDD und CJD
Serumproben aus der Neurologie, Universitätsklinik Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
CJD: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, PDD: Patient mit Morbus Parkinson und Demenz

	CJD	**PDD**
≤5	35	12
≥6	2	14

Die Sensitivität beträgt hier 53,8 %. die Spezifität 94,6 %. Der positive prädiktive Wert liegt bei 87,5 %, der negative bei 72,3 %.

Der Vergleich der Gruppen PDD und FTLD im Serum ergibt einen p-Wert von 0,0020. Auch dieser p-Wert ist signifikant.
Das Verhältnis der Isoformen von α1-Antitrypsin im Serum zwischen den Gruppen PDD und FTLD wird in Tabelle 42 dargestellt.

Tabelle 42: Verteilung der α1-Antitrypsin-Isoformen im Serum bei PDD und FTLD
Serumproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, Neurologie, Kuopio, Finnland, und Neurologie, Perugia, Italien, aus den Jahren 2006 und 2007
FTLD: Frontotemporale Demenz, PDD: Patient mit Morbus Parkinson und Demenz

	FTLD	**PDD**
≤5	20	12
≥6	2	14

Die Sensitivität beträgt hier 53,8%. Die Spezifität wird mit 90,9 % berechnet. Der positive prädiktive Wert liegt bei 87,5 %, der negative bei 62,5 %.

3.5 Isoformen in Kortex-Blots

Um beurteilen zu können, ob die Isoformen von α1-Antitrypsin aus dem Gehirn stammen, wird die α1-Antitrypsin-Expression im menschlichen Kortex untersucht. Dies geschieht sowohl mit 1D-Blots als auch mit 2D-Blots. Untersucht wird der Kortex von nicht-dementen Kontrollprobanden und von Patienten mit Lewy-Body-

Demenz. Diese ist pathophysiologisch von der mit Morbus Parkinson assoziierten Demenz nicht zu unterscheiden.
In den Western Blots kann eine Expression von α1-Antitrypsin im Gehirn festgestellt werden (vergleiche Abbildung 22).

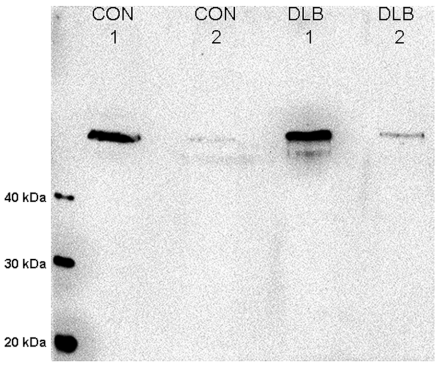

Abbildung 22: Darstellung der Expression von α1-Antitrypsin im Kortex von NDC- und DLB-Patienten
Kortexproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, aus den Jahren 2006 und 2007
CON: nicht-demente Kontrollpatienten, DLB: Lewy-Body-Demenz, kDa: kilo Dalton

Die Isoformenverteilung im 2D-Blot hingegen zeigt nicht die für den Liquor typische Verteilung in den jeweiligen Gruppen. Die zusätzlichen Isoformen sind nicht nur bei den Patienten mit Lewy-Body-Demenz nachweisbar, sondern auch im Kortex der nicht-dementen Kontrollpatienten (siehe Abbildung 23).

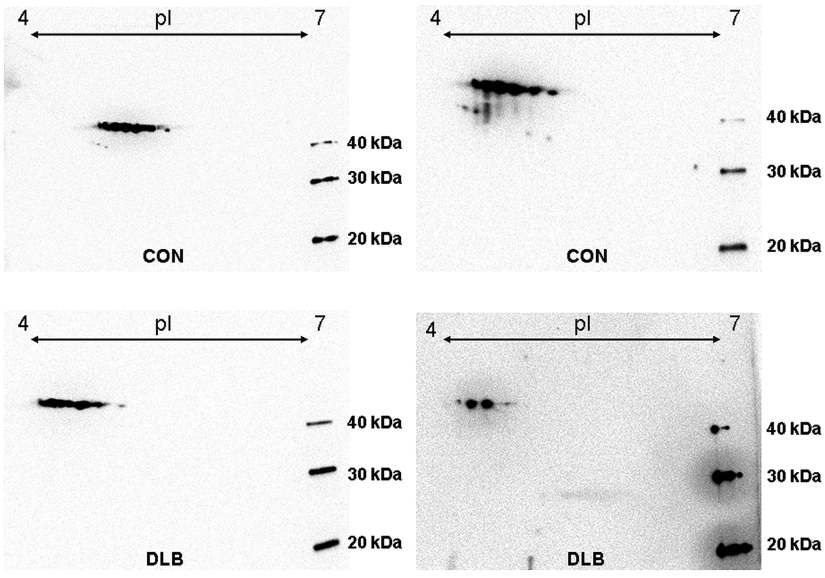

Abbildung 23: Darstellung der Expression der Isoformen von α1-Antitrypsin im Kortex von NDC- und DLB-Patienten
Kortexproben von der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, aus den Jahren 2006 und 2007
CON: nicht-demente Kontrollen, DLB: Lewy-Body-Demenz, kDa: kilo Dalton

3.6 Vorläufige Versuche: Isoformen in Leber-Blots

Außerdem werden die Isoformen in Hep-G2-Zellen, die mit Kortexproben von nicht-dementen Kontrollen und von Patienten mit Lewy-Body-Demenz inkubiert werden, untersucht. Die Anzahl der Isoformen wird mit der Anzahl der Isoformen in nicht-inkubierten Hep-G2-Zellen verglichen.

Diese Untersuchung wird sowohl mit den Leberzellen selbst, als auch mit dem Überstand der Zellkultur durchgeführt.

Hierbei zeigt sich, dass im Überstand der nicht-stimulierten Kultur fünf Isoformen zu sehen sind. Im Überstand der Kultur, die mit dem Kortex von nicht-dementen Kontrollen inkubiert wird, zeigen sich ebenfalls fünf Isoformen. In den mit Kortex von Patienten mit Lewy-Body-Demenz inkubierten Kulturen zeigen sich neun Isoformen in der Probe 358 und sieben Isoformen in der Probe 74. Dies deutet an, dass die zusätzlichen Isoformen in den Leberzellen produziert und abgegeben werden. Beispiele für 2D-Blots von Leberproben, die mit NDC und LBD inkubiert wurden, sind in Abbildung 24 zu sehen.

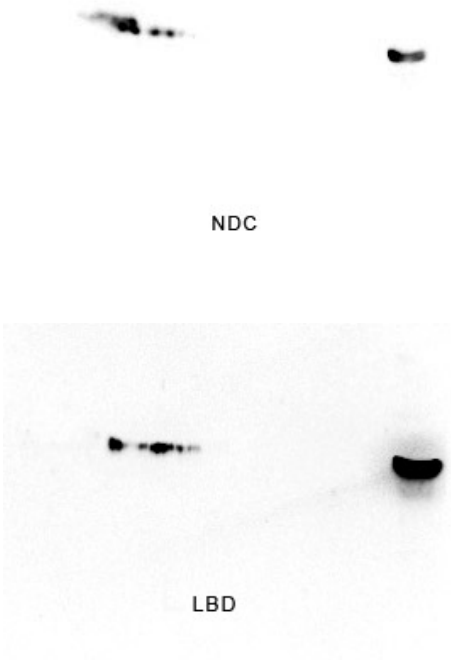

Abbildung 24: 2D-Blots der Überstände von HepG2-Zellen, die mit Kortexproben von NDC- und LBD-Patienten inkubiert wurden

NDC: nicht-demente Kontrollen, LBD: Lewy-Body-Demenz

In den Pellets der Hep-G2-Zellen lassen sich keine Isoformen nachweisen. Da die Isoformen im Überstand nachgewiesen werden können, könnte dies darauf hindeuten, dass die produzierten Isoformen direkt sezerniert werden. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Isoformen im Überstand durch das Medium, das zur Inkubation genutzt wird, hinzugefügt wird. Beispiele für 2D-Blots von Pellets, die mit NDC und LBD inkubiert wurden, sind in Abbildung 25 zu sehen.

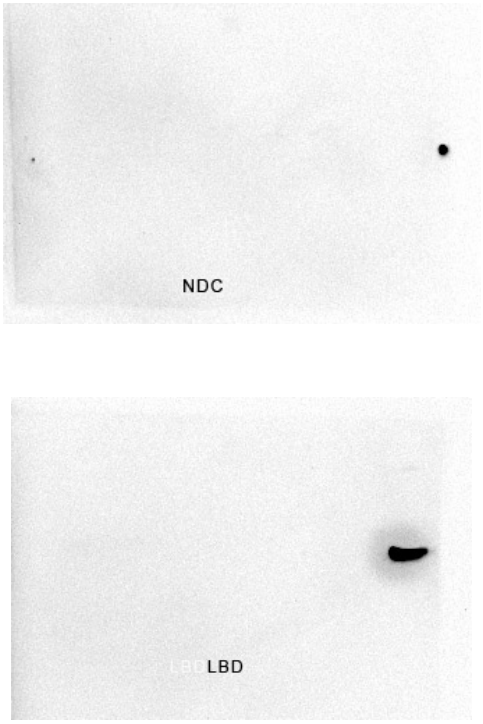

Abbildung 25: 2D-Blots der Pellets von HepG2-Zellen, die mit Kortexproben von NDC- und LBD-Patienten inkubiert wurden

NDC: nicht-demente Kontrollen, LBD: Lewy-Body-Demenz

3.7 Massenspektrometrische Analyse der α1-Antitrypsin-Isoformen

Um die α1-Antitrypsin-Isoformen, die in den 2D-Blots gefunden wurden, zu charakterisieren, wird eine massenspektrometrische Analyse der α1-Antitrypsin – Isoformen durchgeführt. Dies geschieht mittels MS/MS. Dazu wird ein MALDI-TOF genutzt. Die Spots werden aus einem repräsentativen 2D-Gel mit dem Liquor eines PDD-Patienten mit sieben Isoformen von α1-Antitrypsin gepickt. Dieses Gel wurde vor dem Ausstanzen der Proteine mit der Coomassie-Färbung angefärbt. Das Original-Gel ist in Abbildung 26 zu sehen.

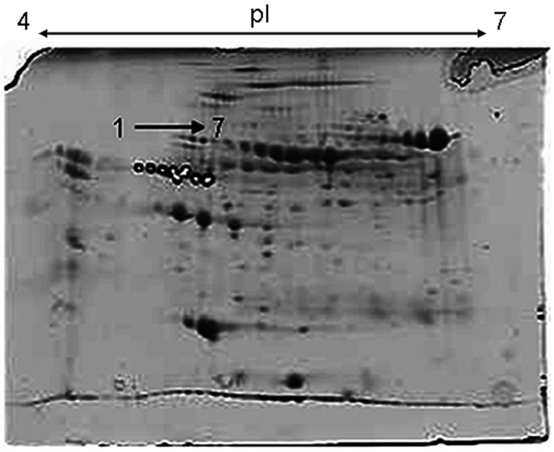

Abbildung 26: Original-DiGE-Gel für die Analyse der posttranlationalen Modifikationen von α1-Antitrypsin
Liquorproben aus der Neurologie, Universitätsklinikum Ulm, aus den Jahren 2006 und 2007
pI: isoelektrischer Punkt

α1-Antitrypsin kann in jedem der sieben Spots nachgewiesen werden. In Spot 1 bis 5 ist α1-Antitrypsin das vorherrschende Protein. In den Spots 6 und 7 wird auch α1-Antitrypsin nachgewiesen, das dominante Protein ist jedoch das GC Vitamin D-binding Vorläufer–Protein. Die nachfolgende Tabelle 43 zeigt den Mascot-Score der einzelnen Spots.

Tabelle 43:Angabe des Mascot-Scores der einzelnen Spots
kDa: kilo Dalton, MW: Molekulargewicht

accession #	MW	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 4	Spot 5	Spot 6	Spot 7
IPI00553177	47 kDa	139	201	241	248	333	180	94

Der Mascot-Score ist ein Maß für die Identifikationssicherheit. Je höher dieser ausfällt, desto sicherer ist die Identifikation Der untere Grenzwert ist auf 80 festgelegt. Erst oberhalb dieses Wertes gilt ein Protein als identifiziert. Der Mascot-Score der Proteine aus den Spots 6 und 7 ist eher niedrig, aber bereits oberhalb des Grenzwertes. Dies ist damit zu begründen, dass ein anderes Protein die Hauptmenge ausmacht. Da aber in den Western- und den 2D-Blots spezifische Antikörper gegen α1-Antitrypsin genutzt wurden, ist dies für die vorliegende Studie nicht von Bedeutung.
Im nächsten Schritt werden die verschiedenen Isoformen charakterisiert. Zu diesem Zweck werden die Isoformen daraufhin untersucht, ob sie Glykosylierungen, Phosphorylierungen oder Methylierungen aufweisen.

Glykosylierungen werden in den Spots 3 bis 7 nachgewiesen. Glykosylierungen in den Isoformen in den Spots 1 und 2 sind nicht nachweisbar. Eine detaillierte Angabe der Glykosylierungen ist Tabelle 44 zu entnehmen.

Tabelle 44: Angabe der Glykosylierungen der einzelnen Spots
Da: Dalton, HexNAc = N-acetyl-Hexosamine, Hex = Hexose (Mannose, Glucose or Galactose), NeuAc = Sialinic acid

spot #	***m/z* (*z*)**	**neutral mass (Da)**	**glycan fragments observed**
Spot 1	-	-	none observed
Spot 2	-	-	none observed
Spot 3	906.4291 (+2)	1810.8436	(HexNAc)(Hex)(NeuAc)
Spot 4	906.4286 (+2)	1810.8426	(HexNAc)(Hex)(NeuAc)
	670.9987 (+3)	2009.9746	(HexNAc)(Hex)(NeuAc)
	675.6698 (+3)	2023.9900	(HexNAc)(Hex)(NeuAc)
	913.4363 (+2)	1824.8580	(HexNAc)(Hex)(NeuAc)
Spot 5	906.4276 (+2)	1810.8406	(HexNAc)(Hex)(NeuAc)
	675.6693 (+3)	2023.9861	(HexNAc)(Hex)(NeuAc)
	670.9987 (+2)	2009.9743	(HexNAc)(Hex)(NeuAc)
	913.4363 (+3)	1824.8580	(HexNAc)(Hex)(NeuAc)
	1223.8602 (+3)	3668.5582	(HexNAc)2(Hex)2(NeuAc)2
	1227.1494 (+3)	3678.4252	(HexNAc)2(Hex)2(NeuAc)2
	1320.8926 (+3)	3959.6572	(HexNAc)2(Hex)2(NeuAc)2
Spot 6	760.8801 (+2)	1519.7456	(HexNAc)(Hex)
	778.8799 (+2)	1555.7452	(HexNAc)(Hex)
	906.4281 (+2)	1810.8380	(HexNAc)(Hex)(NeuAc)
	583.3101 (+3)	1746.9085	(HexNAc)(Hex)
	1005.9940 (+2)	2009.9734	(HexNAc)(Hex)(NeuAc)
	1013.0013 (+2)	2023.9884	(HexNAc)(Hex)(NeuAc)
	1020.0094 (+2)	2038.0034	(HexNAc)(Hex)(NeuAc)
	1133.5909 (+2)	2265.1674	(HexNAc)(Hex)(NeuAc)
Spot 7	760.8811 (+2)	1519.7476	(HexNAc)(Hex)
	860.4453 (+2)	1718.8784	(HexNAc)(Hex)
	659.0319 (+3)	1974.0739	(HexNAc)(Hex)
	906.4280 (+2)	1810.8414	(HexNAc)(Hex)(NeuAc)
	913.4352 (+2)	1824.8562	(HexNAc)(Hex)(NeuAc)
	1005.9948 (+2)	2009.9734	(HexNAc)(Hex)(NeuAc)
	1013.0012 (+2)	2023.9874	(HexNAc)(Hex)(NeuAc)
	1048.4598 (+4)	4189.8109	(HexNAc)2(Hex)2(NeuAc)2
	1003.0392 (+5)	5010.1586	Indeterminate

In allen sieben Spots können Methylierungen gezeigt werden. Außerdem werden die Isoformen auf Phosphorylierungen untersucht. Diese können jedoch nicht nachgewiesen werden.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

Der Hauptvorteil der DiGE ist die so genannte „Mehrfachausnutzung“. Darunter wird verstanden, dass auf einem Gel aufgrund einer Verwendung von Fluoreszenz-Farbstoffen mehrere Proben aufgetrennt werden können. Diese Farbstoffe ähneln sich zwar strukturell, werden aber mit unterschiedlichen Spektren gemessen [218]. Die aktuellen CyDye-Farbstoffe ermöglichen die Verwendung von bis zu drei Farbstoffen und damit die Untersuchung von bis zu drei Proben pro Gel [218]. Damit wird eine vergleichende Analyse von verschiedenen Proteinproben ermöglicht [148], indem die Spots, die sich an derselben Stelle im Gel überlagern, miteinander verglichen werden. Durch diese Methode wird zum Einen die Anzahl der benötigten Gele verringert, zum Anderen wird die Vergleichbarkeit der verschiedenen Proben erhöht [172], da somit verschiedene Fehler, wie beispielsweise Probenverlust, für alle Gele auftreten. Daher schwanken die Spotvariationen zwischen den Gelen nicht nur für einen Spot, sondern für alle Spots eines Gels.

Weiterhin ermöglicht die DiGE, dass ein interner Standard, der sich aus gleichen Teilen aller untersuchten Proben zusammensetzt und auf jedem Gel in der gleichen Menge vorhanden ist, mit untersucht werden kann. Dadurch wird erreicht, dass alle Proteine, die in den zu untersuchenden Proben vorkommen, in jedem der Gele vorhanden sind. Hierdurch wird die Vergleichbarkeit innerhalb eines Gels und von verschiedenen Gelen und damit auch der Spotvolumina verbessert und die Normalisierung der gematchten Spots ermöglicht [19, 172]. Somit wird auch die Quantifizierung der Spots erleichtert [244], da nicht das absolute Spotvolumina bestimmt wird, sondern das Größenverhältnis mittels des internen Standards berechnet werden kann. Die Reliabilität und Reproduzierbarkeit wird hierdurch erhöht [254]. Weiter ist erwähnenswert, dass durch die Einführung der CyDyes-Farbstoffe die Sensitivität für Proteine deutlich erhöht wurde [218]. Dadurch können auch spärliche Proteinproben, bereits ab einem Gewicht von 6,6 µg, analysiert werden [93, 134, 172] - Laut Larbi et al. können sogar schon Proteine ab einem Gewicht von 125 pg detektiert werden [148]. Außerdem können Regulationen bereits ab 15 % festgestellt werden [246].

Ein weiterer Vorzug ist, dass die Analyse der DiGE durch Einsatz der DeCyder-Software rasch durchgeführt werden kann.
Die Proteine können im Anschluss an die DiGE mittels massenspektrometrischen Methoden identifiziert werden [93, 134]. Dadurch scheint diese Methode für die Suche nach Biomarkern geeignet zu sein [93]. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass sogar mehrere Biomarker in einer Untersuchung gefunden werden können, wodurch oftmals eine erhöhte Sensitivität und Spezifität erreicht werden kann [268].

Die DiGE hat aber auch Nachteile: Einerseits ist die DiGE eine sehr aufwendige, zeitintensive Methode, zusätzlich ist sie sehr fehleranfällig. Auch die Kosten dieser Methode sind sehr hoch – sowohl für die Farbstoffe, als auch für die Software [172]. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, dass in einem Spot öfters mehrere Proteine nachgewiesen werden.
Eine andere Beschränkung der DiGE ist, dass bei dem in der vorliegenden Studie verwendeten „minimal-labelling“ nur 5% der Proteine mit den CyDye-Farbstoffen angefärbt werden. Der Großteil von 95%, der unangefärbt bleibt, ist dadurch um 434-464 Da leichter und legt in der SDS-Page eine weitere Laufstrecke hinter sich. Um diese Proteine trotzdem der MS zuführen zu können, ist nach der Analyse der Proteinregulation eine Anfärbung beispielsweise mit Coomassie nötig, wobei wiederum 40% der Proteine nicht angefärbt werden [218]. Trotz der Coomassie-Färbung kann es dazu kommen, dass das gewählte Protein nicht dasjenige ist, das den Spot, der analysiert wurde, verursacht hat. Dann konzentrieren sich die nachfolgenden Versuche ohne weiteren Nutzen auf dieses Protein [224]. Zu den Vorteilen des „minimal-labelling“ gehört, dass die Identifizierung der übrigen, nicht markierten Proteine mittels Massenspektrometrie erleichtert wird.
Ein weiteres Problem besteht darin, dass bei der DiGE zwei Proteine übereinander liegen können und daher von der Software als ein Protein erkannt werden [45]. Dieser Fehler kann jedoch durch den Einsatz der Massenspektrometrie meist aufgedeckt werden. Dies ist in der vorliegenden Studie daran zu erkennen, dass in dem sechsten und siebten Spot neben AAT auch ein anderes Protein, GC Vitamin D-binding Vorläufer–Protein, identifiziert werden konnte. Eine andere Ursache dafür könnte sein, dass der Durchmesser der Stanze des Spotpickers zu groß war.

Zum Teil traten Schwierigkeiten mit der Analyse der α1-Antitrypsin-Isoformen bei der Untersuchung mittels 2D-Blots auf, da sich keine Isoformen darstellen ließen. Mögliche Fehlerquellen sind beispielsweise Proteinverluste während der verschiedenen Versuchsteile. Zhou et al. berichten von einem Proteinverlust von 7-14 % während der isoelektrischen Fokussierung und 17-24 % während der Äquilibrierung [269]. Während der zweiten Dimension beträgt der Proteinverlust bis zu 10 % [269].

Generell ist jeder Arbeitsschritt der DiGE eine mögliche Fehlerquelle. Neben der Gewinnung und Aufbereitung der Proben können auch die IEF oder die SDS-Page die Ursache für eine mangelhafte Darstellung sein. Auch die Materialqualität kann der Grund für Probleme sein. Die Lagerung der Proben muss, wie hier geschehen, bei höchstens -80°C erfolgen, wobei auch wiederholtes Auftauen und Einfrieren äußerst schädlich für die Probenqualität ist [177]. Einer der Hauptfehlerquellen bei der DiGE ist jedoch die Ausfällung von Proteinen bei der Übertragung von dem IPG-Streifen auf das Gel zu Beginn der zweiten Dimension [216].

Als Verbesserungsmöglichkeit wäre es sinnvoll, die IPG-Streifen mit Coomassie anzufärben, um sicher zu gehen, dass der Transfer erfolgt ist und sich keine Proteine mehr auf den Streifen befinden. Dies wäre eine mögliche Fehlerquelle für Gele, auf denen keine Proteine nachgewiesen werden können.

Eine Beeinträchtigung der DiGE ist, dass die Qualifikation des Untersuchers sehr viel Einfluss auf die Gesamtstreuung und damit die Qualität der Ergebnisse hat. Durch Übung und Erfahrung kann eine deutliche Verbesserung der Präzision erreicht werden. Es wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen geübten und ungeübten Analytikern festgestellt [216]. Das wurde zuvor auch von Challapalli et al. beschrieben: Ungeübte Analytiker haben große Schwierigkeiten mit der Herstellung reproduzierbarer Gele [40].

Ein weiterer Nachteil der DiGE ist, dass eher wenige Proteine pro Analyse identifiziert werden. Dies liegt daran, dass nur Proteine, die in größerer Menge vorkommen, erkannt werden [267].

Ein anderes Problem bei dem vorliegenden Versuchsaufbau ist, dass die Vergleichsgruppe nicht aus gesunden Kontrollpersonen, sondern lediglich aus nicht-dementen Patienten mit einem normalen Liquorbefund besteht. Diese leiden unter verschiedenen Erkrankungen: Ischämie, Komplex-fokale Epilepsie, Polyneuropathien, Lumboischalgien, Migräne, Pseudotumor cerebri,

Autoimmunerkrankungen, Neuropathia vestibularis und dissoziative Störungen. Es ist also denkbar, dass die Proteine im Vergleich zu anderen Krankheiten reguliert sind, jedoch nicht im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Um dieses Risiko zu minimieren, setzt sich die Kontrollgruppe aus sehr unterschiedlichen Krankheiten aus dem breiten Spektrum der Neurologie zusammen. Auch sind Komorbiditäten bei den Patienten aus den verschiedenen Gruppen möglich, die zur Veränderungen des Isoformenmusters von AAT beitragen können.

Liquor eignet sich gut für die Untersuchung von Biomarkern bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems wie PD oder PDD. Der Grund hierfür ist, dass Liquor direkt mit der extrazellulären Flüssigkeit des zentralen Nervensystems kommuniziert und zum Teil aus ihr hervorgeht [118, 187, 207]. Daher zeigt er Veränderungen, wie sie bei Krankheiten vorliegen, gut an [118] und ist eine geeignete Quelle, um den Zustand des Gehirns unter verschiedenen Bedingungen einzuschätzen. Außerdem geht die Gewinnung von Liquor leicht vonstatten. Peskind et al. haben 2005 beschrieben, dass die Gewinnung von Liquor mit einer niedrigen Rate an Komplikationen einhergeht [193]. Die Herausforderung bei der Suche nach Biomarken im Liquor ist die niedrige Konzentration der hirnspezifischen Liquorproteine im Vergleich zu der hohen Konzentration der nicht-hirnspezifischen Liquorproteine [187]. Ungefähr 70 % der Proteine im lumbalen Liquor stammen aus dem Blut [126]. Dies macht die Untersuchung dieser Proteine sehr anspruchsvoll [187]. Auch ist die allgemeine Proteinkonzentration im Liquor geringer als im Plasma [22, 207], wodurch Veränderungen dieser Proteine nur erschwert wahrgenommen werden können. Ein weiteres Problem bei der Proteomuntersuchung im Liquor ist, dass die Produktion des Liquors sowohl einem zirkadianen Rhythmus [179], als auch einem Alterungsprozess unterliegt [267]. Deswegen sollte die Gewinnung des Liquors bei allen Patienten zur gleichen Tageszeit erfolgen, was in der klinischen Praxis nicht umzusetzen ist. Außerdem unterstreicht dies, dass die Gruppen altersangepasst sein sollten. Überdies wird beschrieben, dass auch die Konzentration verschiedener Proteinmarker in der Proteomanalyse abhängig vom Alter der Probanden ist [267].

Um die Sensitivität der Analyse der hirnspezifischen Proteine zu erhöhen, ist es sinnvoll, Proteine wie Albumin und IgG, die zusammen ca. 70% der Proteine im Liquor ausmachen, vor der Analyse aus den Proben zu entfernen [27, 45, 67].

Dies ist in der vorliegenden Studie erfolgt. Ein Nachteil der Entfernung von Albumin ist, dass es als Trägerprotein für viele andere Proteine dient und deswegen mit der Entfernung von Albumin auch andere Proteine aus der Probe eliminiert werden [27, 67]. Außerdem wird von manchen Studien der Nutzen dieser Methode in Frage gezogen [184]. Auch nach Depletion von Albumin und Immunglobulinen stammt noch der Großteil der Proteine aus dem Blut [27]. Ein Nachteil der DiGE ist die Schwierigkeit, niedrig-konzentrierte Proteine in Anwesenheit von hoch-konzentrierten Proteinen zu identifizieren [27].

Die Salzkonzentration im Liquor entspricht der im Blut, während der Proteingehalt deutlich geringer ist [267]. Eine zu hohe Salzkonzentration kann mit der Isoelektrischen Fokussierung interagieren. Aus diesem Grund ist die Entsalzung der Proben für die Verbesserung der IEF wichtig, wobei verschiedene Methoden der Entsalzung zur Auswahl stehen. Die in dieser Studie genutzten Säulen scheinen die besten Ergebnisse zu liefern. Nicht nur werden 90 % der Proteine bewahrt, sondern auch die Qualität des DiGE-Gels ist sehr zufrieden stellend [267].

Ein weiteres Erschwernis bei der Liquoranalyse ist die Kontamination mit Blut [38, 267]. Dies führt zu einer Verfälschung der Ergebnisse, da die Proteinkonzentration im Blut deutlich höher ist als im Liquor. Zudem ähneln sich die Proteinprofile beider Flüssigkeiten sehr. Um eine unbemerkte Auswirkung einer Blutkontamination zu verhindern, sollte die Anzahl der Erythrozyten oder die Konzentration von Apolipoprotein B im Liquor gemessen werden. Apolipoprotein B kommt unter physiologischen Bedingungen nicht im Liquor vor [267].

Eine andere Problematik stellt die Proteinverteilung im Liquor an sich dar, die sich auch bei gesunden Menschen deutlich unterscheiden kann. Deswegen kann es schwierig zuzuordnen sein, ob Unterschiede in der Menge der Proteine an interindividuellen Schwankungen liegen oder in Zusammenhang mit Krankheitszuständen auftreten.

Die Massenspektrometrie ist nützlich zur schnellen Identifikation einer großen Anzahl an Proteinen [172]. Wichtig für die erfolgreiche Identifizierung sind die Fixierung der Gele, die Lagerung und die Art, wie die Proteine aus den Gelen entnommen werden [172]. Wenn Proteine mittels DiGE und Massenspektrometrie identifiziert werden, ist es notwendig, dieses Ergebnis mit einer anderen Technik zu validieren. Für die Validation von DiGE-Ergebnissen eignen sich

antikörperbasierende Methoden wie ELISA oder Western Blots. In dieser Studie werden hierzu Western Blots gewählt. Hierbei ist zu beachten, dass in der Literatur Diskrepanzen zwischen dem Ergebnis der Massenspektrometrie und der Western Blots beschrieben wurden [172]. Außerdem ist eine zu beachten, dass nicht zu jedem in der DiGE identifizierten Protein Antikörper verfügbar sind.
Es gibt komplementäre gelfreie Methoden, um das Proteom und seine möglichen Regulationen zu untersuchen. Zu diesen Methoden gehört beispielsweise das iTRAQ. Die Proteomuntersuchung ist durch diese Methoden zum Teil einfacher durchzuführen. Die Nutzung auch dieser Methoden zur Analyse des Proteoms wäre ein sinnvoller Ansatz.
Ein weiterer Verbesserungsvorschlag wäre, für den In-Gel-Verdau zusätzlich zu Trypsin auch Chymotrypsin zu nutzen. Mit dieser Methode sind nach Mills et al. mehr Aminosäure-Sequenzen untersuchbar. [175].

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Diagnose der mit Morbus Parkinson assoziierten Demenz erfolgt anhand von klinischen Kriterien und neuropsychologischen Untersuchungen [137, 239]. Da zu Beginn die typischen Parkinson-Symptome im Vordergrund stehen, werden die kognitiven Einschränkungen und sogar Demenzen nicht wahrgenommen oder erst in späten Stadien entdeckt. Zwar gibt es klinische Parameter, wie Depression, Reaktion auf Levodopa mit Verwirrung oder psychotischen Symptomen, bei deren Auftreten die Entwicklung einer Demenz wahrscheinlich ist, [225], deren Nutzen in der klinischen Praxis aber eher gering ist [110]. Auch gibt es verschiedene Ansätze, mithilfe von Biomarkern frühzeitig die Diagnose Demenz bei Morbus Parkinson stellen zu können. Zu diesen Ansätzen gehört auch die Analyse von EEGs von Patienten mit Morbus Parkinson [78, 132].
Es wäre von großem Nutzen, einen laborchemischen Marker zu finden, der diejenigen Parkinson-Patienten identifiziert, die bereits eine leichte Demenz haben, oder sogar diejenigen, bei denen sich eine Demenz entwickeln wird. Dieses ist für die frühzeitige Behandlung wichtig und kann damit auch den Druck, der auf den Patienten und den Pflegern lastet, vermindern. Außerdem könnte die Therapie das Auftreten von Begleiterkrankungen senken [2], die Lebensqualität

wäre verbessert [214] und die Lebensdauer verlängert [181]. Dies unterstreicht die Dringlichkeit, einen geeigneten Marker zu finden.

Zu Beginn wurde der Liquor von Patienten mit Morbus Parkinson und von Patienten mit Parkinson-assoziierter Demenz untersucht. Außerdem wurde der Liquor von nicht-dementen Kontrollpatienten betrachtet. Durchgeführt wurde eine proteomische Analyse mit dem Ziel, Proteine zu finden, die bei Morbus Parkinson oder PDD reguliert sind und die so einen potentiellen Nutzen in der klinischen Diagnostik haben. Es konnten hierbei elf Proteine identifiziert werden, die signifikant reguliert waren. Dazu gehören α1-Antitrypsin, Transferrin, Haptoglobin, Serpin F1, Serpin A8, Fetuin A, Ceruloplasmin, Complement C3 precursor (C3A) , ZAG, Serin-Threonin-Kinase 32A und Leucin-rich Glycoprotein.

In der anschließenden Untersuchung mittels Western Blot zur Bestätigung der Ergebnisse der DiGE konnten Serin-threonin-kinase 32 A, Leucin-rich α 2 glycoprotein 1 und Haptoglobin Hp2 nicht dargestellt werden. Vermutlich liegt dem zugrunde, dass sie in zu geringer Konzentration vorlagen.

Im Western Blot wurde jeweils die quantitative Menge von den jeweiligen Proteinen bei den Gruppen NDC, PD und PDD verglichen. Bei jedem Vergleich wurde der p-Wert bestimmt. Keines der in der DiGE als reguliert beschriebenen Proteine war im Vergleich von NDC und PD signifikant reguliert. Der p-Wert beim Vergleich der Menge an α1-Antitrypsin zwischen NDC und PDD war 0,037, der p-Wert bei PD verglichen mit PDD betrug 0,020. Damit liegt bei beiden Differenzierungen eine signifikante Regulation vor. Die in der DiGE beschriebene Regulation der anderen Proteine ließ sich im Western Blot nicht bestätigen.

Nur α1-Antitrypsin hat sich als reguliert bestätigt, obwohl es bei den anderen zunächst als reguliert beschriebenen Proteinen ebenfalls denkbar gewesen wäre. Für Ceruloplasmin beispielsweise ist bereits beschrieben, dass es im Serum von PD-Patienten erniedrigt ist [238, 267]. Außerdem ist Ceruloplasmin für den Eisentransport im Blut zuständig. Für PD ist beschrieben, dass die Schwere der Erkrankung mit der Eisenablagerung in der Substantia nigra korreliert [86, 108]. Dies lässt auf eine wichtige Rolle von Ceruloplasmin in der Pathogenese von Morbus Parkinson schließen. Bei einer anderen neurodegenerativen Erkrankung, Morbus Alzheimer, sind ebenfalls veränderte Mengen von Ceruloplasmin beschrieben [53]. Auch Transferrin ist am Eisentransport beteiligt. Es moduliert

den Eisentransport in die Mitochondrien der dopaminergen Neurone der Substantia nigra [86].

Haptoglobin ist ein Serum-Protein, das Hämoglobin bindet und zum retikuloendothelialen System in der Leber transportiert. Es hat eine große Bedeutung beim Schutz vor oxidativen Stress [231] und ist außerdem an der Funktion des Immunsystems beteiligt [147]. Auch ist seine Rolle bei der Pathogenese verschiedener entzündlicher und autoimmun-bedingter Krankheiten bekannt. Eine Erhöhung des Haptoglobin-Spiegels, wie sie hier vorliegt, kommt auch bei Entzündungen, Infektionen und malignen Prozessen vor [231]. Die Korrelation von Haptoglobin mit Morbus Parkinson wurde ebenfalls bereits untersucht [11, 50]. Auch dies bestärkt die Auffassung, dass der Zusammenhang dieser in der DiGE identifizierten Proteine mit Morbus Parkinson und mit Morbus Parkinson assoziierter Demenz in weiterführenden Studien untersucht werden sollte.

Für weitergehende Forschung wäre es daher sinnvoll, auch die anderen in der DiGE als reguliert gefundenen Proteine mittels 2D-Blot zu untersuchen. Es ist denkbar, dass bei PD oder PDD die Menge einzelner Isoformen zunimmt und zugleich die anderer abnimmt, so dass im Western Blot keine Regulation gefunden werden kann. Aus diesem Grund ist es empfehlenswert, die Isoformenverteilung dieser Proteine ebenfalls zu untersuchen.

Trotz der signifikanten Regulation von α1-Antitrypsin sind deutliche Überschneidungen zwischen den Gruppen sichtbar. Aus diesem Grund kann die Menge an α1-Antitrypsin allein nicht als diagnostischer Marker von Morbus Parkinson oder von Demenz bei Parkinson-Patienten verwendet werden. Deswegen wurde nachfolgend das Muster der Isoformen von α1-Antitrypsin im Liquor mittels 2D-Blots untersucht, um herauszufinden, ob hier signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen vorliegen.

Dabei zeigte sich, dass bei den Liquorproben der nicht-dementen Patienten und bei denen der Parkinson-Patienten meist fünf oder weniger Isoformen vorhanden waren, während sich bei den Parkinson-Demenz-Proben vorwiegend sechs oder mehr Isoformen zeigten. Dies wurde zunächst bei einigen Proben erwiesen, die von der Neurologie des Universitätsklinikums Ulm bereitgestellt wurden. Als sich diese Tendenz abzeichnete, wurde eine größere Kohorte von Patienten mittels

2D-Blot untersucht. Diese zusätzlichen Proben stammten von Kooperationspartnern aus Perugia in Italien und aus Kuopio in Finnland.

Der Schwellenwert für die Berechnung der Sensitivität, Spezifität und des positiven und negativen prädiktiven Werts wurde mittels ROC-Analyse festgelegt. Diese wurde bei dem Vergleich von NDC und PDD im Liquor durchgeführt. Dabei ergab sich ein Schwellenwert von 5,5 Isoformen. Dieser Schwellenwert wurde für alle weiteren Vergleiche beibehalten. Als Verbesserungsvorschlag ist denkbar, den Schwellenwert für jeden Vergleich neu mittels ROC-Analyse zu bestimmen. Von einem für die klinische Diagnostik geeigneten Biomarker wird eine Sensitivität und Spezifität von mindestens 85 % erwartet [256].

Beim Vergleich von NDC und PDD im Liquor zeigt sich eine Sensitivität von 90,5 %. Je höher die Sensitivität ist, desto besser erfasst der diagnostische Test die Erkrankung. Mit einer Sensitivität von 90,5 % scheint der Test zur Diagnostik geeignet zu sein. Die Spezifität lag bei 96,9 %. Auch der positive prädiktive Wert mit 95 % und der negative prädiktive Wert mit 93,3 % sind sehr gut geeignet, um den Test zur Diagnostik einzusetzen. Folglich kann mittels der Bestimmung von α1-Antitrypsin im Liquor PDD sicher von NDC unterschieden werden. Dennoch sollten weitere Untersuchungen mit größeren Kohorten durchgeführt werden, bevor dieser Test in die klinische Praxis eingeführt werden kann.

Bei der Untersuchung der Verteilung der Isoformen zeigte sich im Liquor für die Unterscheidung zwischen PD und PDD eine Sensitivität von 90,5 %. Die Spezifität lag hier 92,9 %. Der positiv-prädiktive Wert betrug 95 %, der negative 86,7 %. Damit erscheint α1-Antitrypsin als diagnostischer Marker der Parkinson-Demenz sehr interessant. Ein Einsatz in der klinischen Praxis sollte nach Überprüfung dieser Ergebnisse in einer größeren Kohorte in Erwägung gezogen werden.

Bei der Analyse der Verteilung der Isoformen im Liquor zeigte sich für die Unterscheidung zwischen NDC und PD eine Sensitivität von lediglich 7,1 %. Die Spezifität war hier 96,9 %. Der positive prädiktive Wert betrug 50 %, der negative 70,5 %. Da anhand der Anzahl an Isoformen keine Aussage über die Diagnose möglich ist, eignet sich dieser Test nicht zur Diagnosestellung von Morbus Parkinson.

Im Anschluss wurde untersucht, ob α1-Antitrypsin nur bei mit Morbus Parkinson assoziierter Demenz erhöht ist oder auch bei anderen Demenzen. In diesem Fall wäre dieses Protein ein genereller Marker für Demenz. Ist allerdings α1-Antitrypsin

nur bei PDD erhöht, kann es eventuell als Biomarker zur Differenzierung zwischen PDD und anderen Demenzen genutzt werden. Besonders bei PDD-Fällen, bei denen die klassischen Symptome von Morbus Parkinson gering ausgeprägt sind, kann ein Hilfsmittel zur Abgrenzung zu anderen Demenzen von großem Nutzen sein.

Aus diesem Grund wurden weitere Proben von Patienten mit anderen Demenzen wie bei Morbus Alzheimer, bei der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung und bei der frontotemporalen Demenz untersucht. Diese Erkrankungen wurden zunächst als Gruppe zusammengefasst PDD gegenübergestellt und der Vergleich analysiert. Im Anschluss wurde jede der Demenzen einzeln mit PDD verglichen.

Hierbei zeigte sich, dass ca. 38,9 % der Demenzen, die nicht mit Morbus Parkinson assoziiert sind, ebenfalls sechs oder mehr Isoformen zeigen. Nur ein Drittel von anderen Demenzen zeigt also ein ähnliches Isoformenmuster wie PDD. Die Sensitivität der drei gruppierten Demenzen beträgt zwar 90,5 %, die Spezifität ist jedoch mit nur 61,6 % niedrig. Auch der positive prädiktive Wert ist mit 73,1 % für die Routinediagnostik zu niedrig.

Demzufolge ist der Test im Liquor nur bedingt zur Unterscheidung verschiedener Demenzen bei unklarem klinischem Krankheitsbild geeignet. Die Verteilung der Isoformen zeigt jedoch, dass der Anteil der zusätzlichen Isoformen bei PDD deutlich höher ist als bei den anderen Demenzen. Damit scheint die Erhöhung der Anzahl der Isoformen von α1-Antitrypsin spezifisch für die Demenz bei Morbus Parkinson und keine genereller Marker für Demenz zu sein.

Bei dem Vergleich von AD und PDD im Liquor liegt keine signifikante Regulation vor. Demzufolge ist α1-Antitrypsin nicht zur Differenzierung von AD und PDD geeignet.

Sowohl bei der Differenzierung von PDD und CJD als auch von PDD und FTLD zeigen sich eine Sensitivität von 90,5 %, eine Spezifität von 83,3 %, ein positiver prädiktiver Wert von 95 % und ein negativer prädiktiver Wert von 71,4 %. Dies bedeutet, dass man bei einer Isoformenanzahl von mindestens sechs zu 95 % sicher sein kann, dass PDD vorliegt. Die Untersuchung von α1-Antitrypsin im Liquor scheint dementsprechend zur Differenzierung von PDD auf der einen Seite und CJD oder FTLD auf der anderen Seite geeignet zu sein.

Zusammengefasst eignet sich die Bestimmung der Isoformen von α1-Antitrypsin im Liquor sehr gut für die die Differentialdiagnose zwischen PD und PDD, deren

Relevanz bereits erläutert wurde Auch die Unterscheidung zwischen NDC und PDD ist hiermit möglich. Die Differenzierung zwischen PDD und CJD oder PDD und FTLD ist ebenfalls vorstellbar. Diese Differenzierungen werden jedoch aufgrund der unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbilder sicher selten benötigt.
In weiterführenden Untersuchungen könnte man die Anzahl an α1-Antitrypsin-Isoformen auch bei anderen neurologischen Erkrankungen untersuchen. Dies kann in Hinblick auf die Frage geschehen, ob α1-Antitrypsin ein Marker für Neurodegeneration ist.

Im Anschluss an die Untersuchung des Liquors von Patienten erfolgte eine Untersuchung des Serums, da dieses im klinischen Alltag für Routineuntersuchungen leichter und schneller verfügbar als Liquor ist und bei der Gewinnung des Materials seltener Komplikationen auftreten. Außerdem ist es bei der Punktion von Liquor nötig, vorher mittels Bildgebung einen erhöhten Hirndruck auszuschließen. Diese kostspielige und nicht immer verfügbare Maßnahme entfällt bei der Untersuchung des Serums.
Hier sollte untersucht werden, ob auch die Isoformenverteilung im Serum Aufschluss darüber gibt, ob bei Parkinson-Patienten eine Demenz vorliegt. Hier zeigten sich bei dem Vergleich zwischen NDC und PDD eine Sensitivität von 53,8 % und eine Spezifität von 100%. Der positiv prädiktive Wert beträgt 100 %, der negative 68,2 %. Aufgrund der niedrigen Sensitivität eignet sich der Test nicht als Suchtest für Demenzen. Bei einer erhöhten Anzahl an Isoformen kann man hingegen davon ausgehen, dass PDD vorliegt. Bei einem negativen Befund im Serum ist die Wahrscheinlichkeit einer NDC lediglich 68,2%. Auch dieser Test wird jedoch in der Praxis selten Anwendung finden, da es selten vorkommt, dass direkt die Diagnose PDD gestellt wird. Meist liegt zuvor bereits die Diagnose von Morbus Parkinson vor.
Beim Vergleich von PD und PDD im Serum wurden eine Sensitivität von 53,8 % und eine Spezifität von 76,2 % berechnet. Der positive prädiktive Wert betrug 73,7 % und der negative prädiktive Wert 57,1 %. Aufgrund dieser Daten kann die Bestimmung von α1-Antitrypsin im Serum nicht zur Frühdiagnostik von PDD bei bekannten Parkinson-Erkrankungen empfohlen werden.

Im Serum zeigten sich bei der Untersuchung der Verteilung der Isoformen für die Unterscheidung zwischen NDC und PD eine Sensitivität von 23,8 % und eine Spezifität von 100 %. Die Spezifität entsprach der Untersuchung des Liquors, bei der Sensitivität hingegen ist ein deutlicher Unterschied erkennbar. Der positiv prädiktive Wert betrug 100 %, der negative prädiktive Wert 61,9 %. Dies bedeutet, dass man bei einer erhöhten Anzahl der Isoformen sicher von PD ausgehen kann. Ist die Anzahl der Isoformen allerdings normal, kann man nur zu 61,9 % von NDC ausgehen. Demnach liegt selbst bei einer normalen Anzahl von Isoformen bei 38,1 % der Personen ein Morbus Parkinson vor. Folglich kann bei erhöhter Anzahl der Isoformen die Diagnose Morbus Parkinson bestätigt, bei normaler Anzahl keine Aussage getroffen werden. Mit einer hohen Spezifität und einem hohen positiven prädiktiven Wert, aber einer niedrigen Sensitivität eignet sich die Bestimmung von α1-Antitrypsin nur bedingt zur Differenzierung zwischen NDC und PD.

Im Jahr 2009 konnte in einer Studie bei PD keine Regulation von α1-Antitrypsin im Serum festgestellt werden [65]. Dies stützt die Ergebnisse der vorliegenden Studie: Von 21 untersuchten Serumproben zeigten nur fünf eine erhöhte Anzahl an Isoformen.

Schließlich wurden ebenfalls die Serumproben von Patienten mit anderen Demenzen untersucht. Das Ziel war, zu zeigen, dass α1-Antitrypsin speziell bei PDD erhöht ist und dass es damit nicht ein allgemeiner Marker für Demenz bzw. Degeneration ist.

Bei dem Vergleich zwischen PDD und den drei Demenzen AD, CJD und FTLD zeigten sich eine Sensitivität von 53,8 % und eine Spezifität von 90,8 %. Der positiv prädiktive Wert betrug 63,3 % und der negative 86,8 %. Folglich ist bei einer erhöhten Anzahl an Isoformen keine sichere Aussage über die Diagnose zu treffen. Bei einer normalen Anzahl an Isoformen liegt zu über 86 % eine der drei Demenzen AD, CJD oder FTLD vor.

Bei dem Vergleich von PDD mit AD zeigte sich eine Sensitivität von lediglich 53,8 %. Dieser schlechten Sensitivität stand eine recht gute Spezifität von 85,7 % gegenüber. Der positive prädiktive Wert war mit 77,8 % noch etwas niedriger als für Routineuntersuchungen gewünscht, kann aber durch höhere Fallzahlen eventuell verbessert werden. Der negative prädiktive Wert mit 66,7 % war nicht ausreichend.

Bei dem Vergleich der Isoformenanzahl bei PDD und CJD wurde eine Sensitivität von 53,8 % berechnet. Die Spezifität betrug 94,6 %. Der positive prädiktive Wert machte 87,5 % aus, der negative prädiktive Wert 72,3 %. Dies sind zufriedenstellende Werte, die es möglich machen, α1-Antitrypsin im Serum zu testen, um zwischen AD und PDD zu unterscheiden. Dies kann bei einigen schwierigen klinischen Erscheinungsbildern nützlich sein.

Bei der Unterscheidung von PDD und FTLD mittels der Messung von α1-Antitrypsin wurden eine Sensitivität von 53,8 % und eine Spezifität von 90,9 % ermittelt. Der positive prädiktive Wert betrug 87,5 %, der negative 62,5 %. Auch hier ist es wieder der Fall, dass bei einer erhöhten Anzahl an Isoformen eine Aussage über die Diagnose gestellt werden kann und bei einer normalen Anzahl die Diagnose noch ungewiss ist.

Zusammenfassend lässt sich über die Untersuchung von α1-Antitrypsin im Serum sagen, dass sich der Test zur Bestätigung der Diagnose Morbus Parkinson eignet. Auch die Differenzierung zwischen NDC und PDD, wenn auch selten benötigt, wird dadurch vereinfacht. Das ursprüngliche Ziel, mit Hilfe von α1-Antitrypsin als Biomarker bei Parkinson-Patienten die Diagnose PDD stellen zu können, ist mit der Untersuchung des Serums jedoch noch nicht möglich. Dabei muss jedoch auch bedacht werden, dass die Proben aus unterschiedlichen Ländern stammen. Daher ist es möglich, dass präanalytische Artefakte vorliegen. Es ist sinnvoll, die Versuchsreihe an optimal gesammelten Proben zu wiederholen und zu prüfen, ob hierdurch die diagnostische Trennschärfe erhöht wird.

Als Ausblick ist es vorstellbar, α1-Antitrypsin in einer großen Kohorte von Patienten mit Morbus Parkinson im Rahmen einer Längsschnittstudie zu bestimmen. Hier wäre es interessant, festzustellen, welchen Nutzen die Bestimmung von α1-Antitrypsin für die Vorhersage einer Demenz bei bestehendem Morbus Parkinson hat.

Aufgrund der Datenlage der vorliegenden Studie kann man davon ausgehen, dass die zusätzlichen Isoformen von α1-Antitrypsin einen Diagnosewert für eine mit Morbus Parkinson assoziierte Demenz haben. Deswegen sollte dieser Marker weitererforscht werden. Es ist sinnvoll, die Isoformen von α1-Antitrypsin in einer größeren, alters- und geschlechtsgematchten Kohorte zu untersuchen. Außerdem sollte die Abgrenzung zu anderen Demenzen an einem größeren Kollektiv untersucht werden.

Auch in der Literatur sind Veränderungen von α1-Antitrypsin bereits beschrieben. Bereits 1982 wurde dargestellt, dass es bei entzündlichen Prozessen zu einer Erhöhung der Menge einzelner Isoformen von α1-Antitrypsin im Serum kommt [245]. Damit wurden bereits 1982 Veränderungen der Isoformen als Reaktion auf veränderte Zustände im Körper beschrieben.
Als Arbeitsvorschlag für zukünftige Projekte ist es empfehlenswert, die Korrelation mit Tau-Protein zu berechnen. Damit könnte ausgeschlossen werden, dass α1-Antitrypsin ein Marker für generelle Destruktion oder für Neurodestruktion ist.

Von α1-Antitrypsin ist bereits bekannt, dass es zum größten Teil in der Leber und zum kleineren Teil in Makrophagen produziert wird [91, 160]. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob α1-Antitrypsin auch im Kortex produziert wird. Zu diesem Zweck wurden Kortexproben von nicht-dementen Kontrollpatienten und von Patienten mit Lewy-Body-Demenz verglichen. Lewy-Body-Demenz ist pathophysiologisch nicht von mit Morbus Parkinson assoziierter Demenz zu unterscheiden. Auch die klinischen Symptome von PDD und LBD stimmen überein [81]. Es wurde erwartet, dass in den 2D-Blots vom Kortex der nicht-dementen Kontrollen bis zu fünf Isoformen und in den Blots von den Lewy-Body-Demenz-Proben mindestens sechs Isoformen von α1-Antitrypsin zu sehen sind. In den 2D-Blots zeigte sich jedoch bei beiden Gruppen eine ähnliche Isoformenverteilung – die Anzahl war jeweils erhöht. Da also die zusätzlichen Isoformen auch bei den nicht-dementen Kontrollen vorkommen, ist zu vermuten, dass die Produktion von Isoformen bei beiden Gruppen gleich ist. Vermutlich unterscheidet sich lediglich die Sekretion in den Liquor und in das Serum bei beiden Gruppen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass bei Schädigung der Hirnzellen – beispielsweise durch PDD - die zusätzlichen Isoformen freigesetzt werden.
Eine andere Annahme ist, dass bei PDD durch Veränderungen der Isoformen diese leichter sezerniert werden. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass bereits beschrieben ist, dass nicht-glykosiliertes α1-Antitrypsin oder auch α1-Antitrypsin mit wenig Glykosylierung von Hepatozyten nicht ins Blut sezerniert wird [96]. Es ist denkbar, dass bei PD bzw. PDD die zusätzlichen Isoformen glykosyliert werden und deswegen leichter ins Blut abgegeben werden. Dies ist eine Arbeitshypothese für die Erhöhung der Isoformen bei Morbus Parkinson und bei mit Morbus Parkinson assoziierter Demenz. Eine andere Arbeitshypothese ist,

dass die zusätzlichen Isoformen nicht-glykosyliert sind und deswegen erst durch Zellnekrose bei Morbus Parkinson ins Blut abgegeben werden.

Weiterhin führten wir erste Versuche zu der Fragestellung durch, ob womöglich eine Substanz im Cortex produziert wird, die in der Leber die Produktion von α1-Antitrypsin anregt. Bei vorläufigen Untersuchungen der Isoformen von α1-Antitrypsin in der Leber zeigte sich, dass zusätzliche Isoformen im Überstand von denjenigen Zellen vorkommen, die mit Kortexproben von Patienten mit Lewy-Body-Demenz inkubiert wurden. Die Überstände von nicht-inkubierten Zellen und von denjenigen Zellen, die mit Kortexproben von nicht-dementen Patienten inkubiert wurden, zeigten nur fünf Isoformen. Dies deutet darauf hin, dass die zusätzlichen Isoformen von den Leberzellen bei Vorliegen einer Demenz sezerniert werden.

Bei der Untersuchung der Pellets konnten keine Isoformen nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass bei der Produktion von zusätzlichen Isoformen diese direkt sezerniert werden und demzufolge nicht in den Zellen nachgewiesen werden können. Eine andere Möglichkeit ist, dass die zusätzlichen Isoformen in den Überständen aus den Kortexproben stammen, die zur Inkubation hinzugegeben wurden. In diesem Fall müssten auch die Überstände von den NDC die zusätzlichen Isoformen beinhalten. Da dies nicht der Fall ist, spricht dies dafür, dass die zusätzlichen Isoformen bei LBD von den Leberzellen gebildet und direkt sezerniert werden. Diese Theorie muss jedoch in weiteren Versuchsreihen erhärtet werden.

Da für Routineuntersuchungen der 2D-Immunoblot umständlich und langwierig ist, wurden mittels massenspektrometrischer Analyse die sieben Isoformen von α1-Antitrypsin untersucht. Diese wurden aus einem Gel, das auf der Liquorprobe eines PDD-Patienten beruht, gewonnen. Die Isoformen wurden auf posttranslationale Modifikationen untersucht. Dies ist von großem Interesse, da diese Modifikationen ein wichtige Rolle bei der Regulation der Aktivität, Funktion und Lokalisierung der meisten Proteine im Organismus haben [118, 173]. Bei allen sieben Isoformen ließen sich Methylierungen nachweisen. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die Methylierungen durch die methylhaltige Fixierung während der Coomassie-Färbung bedingte Artefakte sind.

Phosphorylierungen sind die häufigsten unter den posttranslationalen Modifikationen und dienen der Modulation der Proteinfunktion [267]. Sie konnten

in keiner der Isoformen nachgewiesen werden. Glykoproteine sind bekannt dafür, sich gut als Biomarker zu eignen [267]. Von der Norm abweichende Glykosylierungen werden bei vielen Krankheiten gefunden [173]. Aus diesem Grund ist besonders die Suche nach Glykosylierungen bei der Erforschung von Biomarkern interessant. Im Plasma von NDC wurden bereits 2001 sechs mögliche Isoformen von α1-Antitrypsin beschrieben [175]. In dieser Studie wurden auch die Glykosylierungen der einzelnen Isoformen mittels Neuraminidase-Verdau untersucht. In den Spots 3 bis 7 waren diese nachweisbar, in den ersten beiden Spots wurden jedoch keine gefunden. Dies bedeutet dennoch nicht, dass keine vorliegen, da die Analyse von Glykoproteinen mittels DiGE kompliziert ist. Da der Zuckeranteil der Glykoproteine kein SDS binden kann, ist es weniger stark mit SDS beladen und wandert in der Elektrophorese dementsprechend langsamer [216]. Zudem sind die Glykoproteine durch den Zucker selbst auch schwerer als unglykosylierte Proteine – auch dies beeinflusst die Geschwindigkeit in der Elektrophorese. In der Literatur wurde bereits 1982 beschrieben, dass den verschiedenen Isoformen von α1-Antitrypsin eine unterschiedliche Anzahl an Sialinsäureresten, Bausteinen von Glykoproteinen, zugrunde liegt [245].

Die Mehrheit der Proteine im menschlichen Körper ist mit Glykosylierungen modifiziert. Mehr als die Hälfte der Proteine sind Glykoproteine [10]. Glykosylierungen haben große Auswirkungen auf die Funktion des menschlichen Körpers [174]: Sie sind an der embryonalen Entwicklung, Zell-Zellkontakten, Rezeptoraktivierung und an der Immunantwort beteiligt [107, 182]. Auch scheint das Ausmaß an Glykosylierungen mit verschiedenen Erkrankungen zu korrelieren [267]. Dies unterstreicht die Bedeutung von Glykosylierungen [66].

Plasma-α1-Antitrypsin zeigt an den drei Stellen Asn-46, Asn-83 und Asn-247 eine N-Glykosylierung [21, 212]. Es konnte festgestellt werden, dass glykosylierte Formen eine größere Stabilität aufweisen als unglykosylierte Formen – dadurch kommt es zu einer Verlängerung der Halbwertszeit [212]. Auch die Bildung von Aggregaten ist bei Glykosylierungen reduziert [139, 212]. Bei inhibitorischen Serpinen ist eine größere Stabilität an sich für die Funktion von Nachteil. Trotzdem zeigen einige neuere Studien, dass die Funktion selbst trotz Glykosylierungen nicht beeinflusst ist [212], während andere aktuelle Studien beschreiben, dass α1-Antitrypsin durch Hyperglykosylierung inaktiviert werden kann [217, 257]. Auch wurde nachgewiesen, dass eine negative Korrelation zwischen der Dauer von

Diabetes und der inhibitorischen Kapazität von Serpinen besteht [104, 154]. Dies bestätigt die Vermutung, dass sich Hyperglykosylierungen negativ auf die Funktion von inhibitorischen Serpinen auswirken. Da fünf der sieben Isoformen bei PDD sicher Glykosylierungen aufweisen, kann auf eine veränderte Stabilität, nicht unbedingt aber auf eine veränderte Funktion geschlossen werden. Da die Isoformen durch die Glykosylierung stabiler werden, kann die Arbeitshypothese aufgestellt werden, dass die zusätzlichen Isoformen im Rahmen einer versuchten Neuroprotektion als Reaktion auf PD bzw. PDD gebildet werden.

2003 wurde bereits festgestellt, dass sich glykosylierte Proteine zur Beobachtung des Verlaufs von Morbus Alzheimer eignen [210]. Auch wurde bei Morbus Alzheimer festgestellt, dass die Glykosylierung des Tau-Proteins zu den frühen Abnormalitäten gehört [157]. Diese Glykosylierung erleichtert die Hyperphosphorylierung von Tau und ist somit ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese [89]. Bei AD wurde außerdem beschrieben, dass eine Isoform von α1-Antitrypsin im Liquor im Vergleich zu den nichtdementen Kontrollgruppen eine verminderte Glykosylierung zeigt [250].

Generell wurden Glykosylierungen bereits mit der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht [155-157]. Bisher ist jedoch bei PD und PDD nur wenig über die Rolle dieser Modifikationen bekannt. Über den Einfluss von Glykosylierung von α-Synuklein bei der Bildung von Protein-Einschlüssen und der Progression der Erkrankung wird bereits diskutiert [118, 219].

Es ist bereits in der Literatur beschrieben, dass es bei Entzündung zu einer Veränderung des Isoformenmusters und des Anteils der verschiedenen Isoformen von α1-Antitrypsin kommt [164, 245]. Dabei nimmt die Menge von der zweiten und dritten Isoform am meisten zu. α1-Antitrypsin gehört zu den Akute-Phase-Proteinen [200], daher ist die Zunahme von α1-Antitrypsin an sich nicht verwunderlich. Beachtenswert ist jedoch, dass sich der Anteil der verschiedenen Isoformen am Gesamtprotein ändert. Eine Veränderung des Isoformenmusters bei Inflammation wurde auch für Ceruloplasmin beschrieben [164]. Es ist denkbar, dass das in dieser Studie als verändert nachgewiesene Isoformenmuster aufgrund von inflammatorischen Reizen durch die Entstehung von PD oder PDD auftritt.. Weiter zeigt α1-Antitrypsin antiinflammatorische Eigenschaften [47]. Es hemmt die Leukozyten, moduliert Zytotoxizität und zeigt antiapoptotische Effekte [28, 128,

194]. Nach dem Beginn einer Entzündung steigt α1-Antitrypsin stark an. Dies deutet darauf hin, dass es als Reaktion auf die Entzündung gebildet wird, um sowohl die Dauer als auch die Stärke dieser einzudämmen [26]. Dies unterstützt die Arbeitshypothese, dass α1-Antitrypsin bei PD bzw. PDD reaktiv auf die Erkrankung gebildet wird, um die zerebralen Zellen zu schützen.

Weiter wurde 2007 beschrieben, dass die Menge von α1-Antitrypsin bei LBD wie auch bei Morbus Alzheimer signifikant höher ist als bei nicht-dementen Kontrollgruppen. Da, wie bereits dargelegt, LBD neuropathologisch nicht von Demenz bei Morbus Parkinson zu unterscheiden ist, bestätigt dies, dass α1-Antitrypsin sich zur Differenzierung von PDD und NDC eignet.

Nicht nur ist α1-Antitrypsin an der Faltung anderer Proteine beteiligt, es kann, wie auch Tau und Amyloid-Beta, polymerisieren und selbst Aggregate formen [59, 133, 258]. Diese Aggregate sind ein wichtiger Bestandteil bei manchen Erkrankungen wie bei der Entwicklung einer Leber-Zirrhose. Bei dieser können Aggregate von α1-Antitrypsin in der Leber gefunden werden. Außerdem werden bei der Entwicklung eines dementiellen Syndroms, das durch die autosomal-dominant vererbte „Familiäre Enzephalopathie mit Neuroserpin-Einschlüssen“ verursacht wird, α1-Antitrypsin-Aggregate gefunden. Beide Erkrankungen gehören zu einer möglichen Entität von Serpinopathien [51, 56, 133].

Auch eine andere Erklärung für die Aggregatbildung ist möglich: Die Synthese von α1-Antitrypsin ist während Stress und Entzündung erhöht. Die Polymerisation wird wiederum durch erhöhte Konzentration von α1-Antitrypsin begünstigt. Dadurch resultieren Entzündungen in der Ablagerung von Polymeren [51].

Außerdem scheint α1-Antitrypsin auch als Suppressor der Hämoxygenase-1 zu wirken. Eine übermäßige Ausschüttung der Hämoxygenase-1 ist für eine pathologische Mobilisation von Eisen verantwortlich. Eisen erhöht den intrazellulären oxidativen Stress und schädigt dadurch unter anderem das Mitochondrium [8]. Auf diesem Weg schützt α1-Antitrypsin die Zelle vor oxidativem Stress. Dies stützt die Hypothese, dass die zusätzlichen Isoformen reaktiv von den geschädigten Zellen gebildet werden, um diese zu schützen.

Weiter ist bei Mäusen beschrieben, dass eine Monotherapie mit α1-Antitrypsin das Überleben von Insel-Transplantaten und damit die Normoglykämie verlängert [151, 152].

α1-Antitrypsin kontrolliert eine Anzahl an neuronalen Proteasen [178]. Es ist in den β-Amyloidplaques von Alzheimer-Patienten erhöht. Sowohl die Menge von α1-Antitrypsin als auch die Isoformen sind im Liquor von diesen Patienten deutlich verändert [203, 263], wobei wird ein Teil der Isoformen vermehrt, ein anderer Teil in reduzierter Menge vorgefunden wird [53]. Eine der Isoformen von α1-Antitrypsin im Liquor von AD-Patienten zeigt eine verminderte Glykosylierung [220]. Im Plasma liegt bei Alzheimer-Patienten eine deutliche Erhöhung von α1-Antitrypsin vor [165, 263]. Allerdings wurde eine Korrelation zwischen der Konzentration von α1-Antitrypsin im Liquor und dem Liquor-Serum-Albumin-Quotienten festgestellt [178]. Dies kann zu der These führen, dass die erhöhten α1-Antitrypsin-Werte Folge einer gestörten Funktion der Blutliquorschranke sind [178]. In diesem Fall wäre α1-Antitrypsin trotzdem als Biomarker zur Diagnosestellung geeignet, es können aber anhand seiner Erhöhung keine Erkenntnisse über die Pathogenese von Morbus Parkinson gezogen werden. Jesse et al. beschrieben 2011, dass bei 20 % der Patienten mit PDD ein erhöhter Albumin-Quotient vorliegt [127]. Weiterhin stellten sie bei 20 bis 25 % der untersuchten PDD-Patienten eine Dysfunktion der Bluthirnschranke fest [127]. Dies macht eine Störung der Bluthirnschranke als Ursache der Erhöhung von α1-Antitrypsin wahrscheinlicher. Aus diesem Grund wäre ein Ausblick für zukünftige Arbeiten, die α1-Antitrypsin-Werte im Liquor der Patienten mit dem jeweiligen Liquor-Serum-Albumin-Quotienten zu vergleichen, um dies auszuschließen.

Besonders zu betonen ist, dass α1-Antitrypsin auch bei weiteren neurologischen Erkrankungen erhöht ist. Bei ALS konnte im Liquor eine veränderte Konzentration von α1-Antitrypsin nachgewiesen werden [29]. Bei rasch progredienter ALS im Vergleich zur langsam progredienten ALS ist α1-Antitrypsin ebenfalls hochreguliert [30]. Auch bei der Multiplen Sklerose wurde ein Zusammenhang mit erhöhten Mengen an α1-Antitrypsin belegt [226]. Bei einer anderen neurodegenerativen Erkrankung, Morbus Huntington, konnten verminderte Konzentrationen von α1-Antitrypsin festgestellt werden [265]. Aus der veränderten Konzentration bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen kann auf eine wichtige Rolle von α1-Antitrypsin in der Neuropathophysiologie geschlossen werden, die weiter erforscht werden sollte [31]. Es ist vorstellbar, dass mit der weiteren Erforschung dieses Proteins eventuell die Pathogenese von mehreren neurologischen Erkrankungen genauer geklärt werden kann.

Auch andere Serpine sind an der Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt. Mutationen in dem zu den Serpinen gehörenden Neuroserpin resultieren in der „Familiären Enzephalopathie mit Einschlusskörperchen“. Das Muster der intrazellulären Polymerisation und der Bildung von Einschlusskörperchen entspricht dem bei der Leberzirrhose bei α1-Antitrypsin-Mangel. Auch diese Erkrankung führt zu einem Zellverlust [51, 56]. Wie 2007 bereits beschrieben wurde, sind bei Morbus Alzheimer ebenso zwei andere Serpine, Neuroserpin und α1-Antichymotrypsin, erhöht. Die Konzentrationen dieser Proteine erleichterten sogar die Differenzierung zwischen Morbus Alzheimer und nicht-dementen Kontrollgruppen [178]. Dies ist bedeutsam, da es die vielfältige Beteiligung von Serpinen in der Pathogenese von neurologischen Erkrankungen betont, der weiter nachgegangen werden sollte.

Es ist bekannt, dass zwischen einem Mangel oder der reduzierten Aktivität von α1-Antitrypsin und Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis [95], Multipler Sklerose [226], Systemischem Lupus erythematosus [140] und Colitis ulcerosa [70] eine Korrelation besteht [217]. Zeitgleich soll der Einsatz von α1-Antitrypsin die Krankheitsparameter bei diesen Krankheiten verbessern [217]. Auch wird α1-Antitrypsin in klinischen Studien in den USA bereits zur Therapie von Diabetes mellitus angewandt [217]. Es hemmt die Insulinresistenz, die durch Entzündungen hervorgerufen wird [135] und ist es bei der Reparatur von beschädigten Inseln hilfreich [135]. Auch verschiedene maligne Erkrankungen wie Karzinome in Lunge [260], Leber [202], Gallenblase [35] und Harnblase [17] kommen bei α1-Antitrypsin-Mangel vermehrt vor [237]. Die Häufigkeit von kolorektalen Karzinomen [259] und malignen Lymphomen [228] ist bei α1-Antitrypsin-Mangel ebenfalls erhöht. Diese Hinweise unterstützen die These, dass α1-Antitrypsin protektiv wirkt und erst bei Mangel verschiedenste Krankheiten auftreten.

Ebenfalls sind Asthma [68], Wegener-Granulomatose [166] und Vaskulitis [94, 130] vermehrt mit α1-Antitrypsin-Mangel assoziiert. Bei idiopathischer pulmonaler Hypertension sind die Werte von α1-Antitrypsin ebenfalls erniedrigt [264]. Dieses breite Vorkommen von Veränderungen der Konzentration von α1-Antitrypsin unterstreicht die Bedeutung im menschlichen Organismus, der weiter nachgegangen werden sollte. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass Mangel an α1-Antitrypsin zu einem erhöhten Risiko für zerebrale und kardiale Ischämien

führt [54, 195]. Außerdem ist bei α1-Antitrypsin-Mangel ein niedriger Blutdruck bekannt [54]. Auch diese Folgeerkrankungen von α1-Antitrypsin-Mangel betonen die Bedeutung dieses Proteins im menschlichen Organismus.

Die Hauptfunktion von α1-Antitrypsin ist die Hemmung der Neutrophilen Elastase 15 [91]. Man geht davon aus, dass die intrazelluläre Akkumulation von α1-Antitrypsin zu einer verstärkten Funktion dieser und damit zu einer Toxizität führt [91]. Dies ist eine mögliche Erklärung für die Vielfalt an Erkrankungen, die mit einem Mangel an α1-Antitrypsin korrelieren.

4.3 Schlussfolgerung

Die vorliegende Doktorarbeit hatte zum Ziel, Biomarker zur Frühdiagnostizierung zum einen eines Morbus Parkinson, zum anderen einer Demenz bei Morbus Parkinson zu finden und diese weiter zu erforschen.

Die Messung von α1-Antitrypsin im Liquor scheint sich zur Unterscheidung zwischen NDC und PDD zu eignen. Auch die Differenzierung zwischen PD und PDD wird hierdurch ermöglicht. Zur Diagnosestellung eines Morbus Parkinson ist die Bestimmung von α1-Antitrypsin bisher nicht zu empfehlen.

Die bisherigen Untersuchungen von α1-Antitrypsin im Serum zusammenfassend kann man feststellen, dass die Bestimmung von α1-Antitrypsin im Serum nicht zur Diagnosestellung von PD oder PDD verwendbar ist.

Weiterhin wurde PDD mit anderen Demenzen verglichen. Die Abgrenzung zu anderen Demenzen gelingt im Liquor. Im Serum ist diese Differenzierung mittels Isoformenbestimmung nur bedingt möglich.

Des Weiteren wurde erforscht, ob die zusätzlichen Isoformen α1-Antitrypsin im Kortex produziert werden. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die zusätzlichen Isoformen von α1-Antitrypsin in beiden Gruppen produziert werden. Vermutlich unterscheidet sich nur die Sekretion in den Liquor und in das Serum. Dies könnte zum einen daran liegen, dass es bei LBD zu einer Destruktion der Zellen und so zur Freisetzung der zusätzlichen Isoformen kommt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sich die zusätzlichen Isoformen bei LBD von denen bei NDC unterscheiden und so leichter sezerniert werden können.

Ebenso wurden die Isoformen von α1-Antitrypsin in der Leber untersucht. In den mit Kortexproben von LBD-Patienten inkubierten Proben zeigten sich im Überstand einer erhöhte Anzahl an Isoformen im Vergleich zu mit Kortexproben von NDC-Patienten inkubierten Proben. Dies lässt vermuten, dass die Kortexzellen die Leberzellen bei Vorliegen einer Demenz bei Morbus Parkinson zu der Produktion von α1-Antitrypsin stimulieren.

Da die Demenz bei Morbus Parkinson zu einer Reduktion der Lebensqualität, zu Komorbiditäten und zu frühzeitiger Hospitalisierung führt und somit große ökonomische Auswirkungen auf die Gesellschaft als auch psychosoziale Auswirkungen auf die Betroffenen und die Angehörigen hat, ist eine frühe

Diagnosestellung von großer Bedeutung. Hiermit kann eine frühere Behandlung mit eventuell verbesserter Prognose erreicht werden.

Mit der Identifizierung einer Regulation von α1-Antitrypsin scheint somit ein viel versprechender Biomarker zur Diagnosestellung einer Demenz bei Morbus gefunden worden zu sein. Diese Ergebnisse sollten vor Einführung in die klinische Praxis in einer größeren, alters- und geschlechtsgematchten Kohorte überprüft werden.

Die scheinbare Beteiligung von α1-Antitrypsin bei einer Vielzahl von neurologischen und internistischen Erkrankungen betont die Bedeutung einer weiteren Untersuchung dieses Proteins.

5. Zusammenfassung

Morbus Parkinson liegt eine Degeneration dopaminerger Neurone zugrunde, die zu einer akinetisch-rigiden Bewegungsstörung mit Tremor und posturaler Instabilität führt. Es ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung und hat für den Patienten weit über die motorischen Symptome hinausgehende Konsequenzen. Neben der schwerwiegenden Beeinträchtigung der Patienten sind auch die ökonomischen Folgen dieser Erkrankung zu bedenken. Aufgrund der demographischen Entwicklung wird die Relevanz für das Gesundheitssystem voraussichtlich weiter zunehmen. Da es für Demenz bei Morbus Parkinson keine kausale Therapie gibt, ist besonders hier eine frühe Diagnosestellung wichtig, um frühzeitig symptomatisch therapieren zu können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, mittels Proteomanalyse einen Biomarker zu finden, der die Diagnose einer Demenz bei Morbus Parkinson erleichtert und Einblicke in die Pathophysiologie dieser Erkrankung bieten kann.

Zu Beginn der Studie wurden Liquorproben von nicht-dementen Kontrollen (NDC), Parkinson-Patienten (PD) und Parkinson-Patienten mit Demenz (PDD) untersucht und das Proteom mittels DiGE (Fluorescence Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis) verglichen. Die DiGE ist ein Elektrophorese-Verfahren, mit dessen Nutzung bis zu drei Proben auf einem Gel analysiert werden können. Dabei erfolgt eine Auftrennung der Proteine nach Masse und elektrischer Ladung. Anschließend wurden die Gele gescannt und mittels der Software „DeCyder“ analysiert. Im Anschluss erfolgte die Identifikation der signifikant regulierten Proteine mittels Massenspektrometrie.

Elf signifikant regulierte Proteine konnten identifiziert werden. Anschließend wurde versucht, per Western Blots die zuvor festgestellte Regulation zu bestätigen. Diese Bestätigung gelang nur bei α1-Antitrypsin. Die Isoformen dieses Proteins wurden anschließend mittels 2D-Blots bei NDC, PD, PDD und weiteren Demenzen untersucht. Die vorliegende Studie zeigt, dass sich die Bestimmung von α1-Antitrypsin mittels 2D-Blot im Liquor sowohl zur Differenzierung zwischen PD und PDD als auch zwischen PDD und NDC eignet. Die Bestimmung im Serum eignet sich nicht zur Differenzierung zwischen PD und PDD. Für die Diagnosestellung des Morbus Parkinson ist die Analyse nur bedingt hilfreich. Die Abgrenzung zu

anderen Demenzen gelingt im Liquor. Im Serum ist diese Differenzierung mittels Isoformenbestimmung nicht möglich.

Bei der Analyse der Isoformenexpression im Kortex wurden die zusätzlichen Isoformen sowohl bei Lewy-Body-Demenz (LBD) als auch bei den NDC nachgewiesen. Die Analyse der Kortexproben von NDC und LBD legt nahe, dass sich nicht die Produktion der Isoformen, sondern die Freisetzung bei beiden Gruppen unterscheidet.

In Pilotexperimenten wurde gezeigt, dass Leberzellen, die mit Kortexproben von Patienten mit Lewy-Body-Demenz inkubiert wurden, zusätzliche Isoformen im Überstand beinhalten. Zellen, die nicht inkubiert oder mit Kortexproben von nicht-dementen Patienten inkubiert wurden, zeigten lediglich fünf Isoformen. In dieser ersten Analyse von 2D-Blots von Leberzellen zeigt sich, dass bei mit LBD-Proben inkubierten Zellen im Gegensatz zu den mit NDC-Proben inkubierten Zellen zusätzliche Isoformen im Überstand vorkommen. Dies lässt darauf schließen, dass diese Isoformen von den Leberzellen bei Vorliegen einer Demenz sezerniert werden.

Schließlich wurden die posttranslationalen Modifikationen der einzelnen Isoformen analysiert. Hierbei zeigten sich Unterschiede im Glykosylierungsverhalten.

Die veränderte Konzentration von α1-Antitrypsin bei verschiedenen Erkrankungen, unter diesen auch eine Anzahl an neurodegenerativen Erkrankungen, legt nahe, dass die weitere Erforschung notwendig ist.

Eine Hypothese kann sein, dass es bei PDD durch aggregiertes alpha-Synuclein zu einer posttranslationalen Modifikation von α1-Antitrypsin kommt. Es ist möglich, dass hierdurch wieder die Bildung von Aggregaten begünstigt wird. Um diese Theorie bestätigen zu können, sind noch weitere biochemische, pathophysiologische und histologische Untersuchungen nötig.

Das in der vorliegenden Doktorarbeit untersuchte Proteinprofil kann in Zukunft zum besseren Verständnis der Erkrankung beitragen. Außerdem bietet es potentielle Ansätze für diagnostische und therapeutische Maßnahmen. Weiter kann es, nach Analyse einer großen, alters- und geschlechtsangepassten Kohorte, zur Differenzierung zwischen PD und PDD dienen oder die Diagnose Morbus Parkinson erleichtern.

6. Literaturverzeichnis

1. Dementia in parkinsonism. Ann Indian Acad Neurol 14: S21-24 (2011)
2. Aarsland D, Tandberg E, Larsen JP,Cummings JL: Frequency of dementia in Parkinson disease. Arch Neurol 53: 538-542 (1996)
3. Aarsland D, Larsen JP, Karlsen K, Lim NG,Tandberg E: Mental symptoms in Parkinson's disease are important contributors to caregiver distress. Int J Geriatr Psychiatry 14: 866-874 (1999)
4. Aarsland D, Larsen JP, Lim NG, Janvin C, Karlsen K, Tandberg E,Cummings JL: Range of neuropsychiatric disturbances in patients with Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry 67: 492-496 (1999)
5. Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, Lolk A, Nielsen H,Kragh-Sorensen P: Risk of dementia in Parkinson's disease: a community-based, prospective study. Neurology 56: 730-736 (2001)
6. Aarsland D, Ballard C, Larsen JP,McKeith I: A comparative study of psychiatric symptoms in dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with and without dementia. Int J Geriatr Psychiatry 16: 528-536 (2001)
7. Aarsland D,Kurz MW: The epidemiology of dementia associated with Parkinson disease. J Neurol Sci 289: 18-22 (2010)
8. Almeida AM, Bertoncini CR, Borecky J, Souza-Pinto NC,Vercesi AE: Mitochondrial DNA damage associated with lipid peroxidation of the mitochondrial membrane induced by Fe2+-citrate. An Acad Bras Cienc 78: 505-514 (2006)
9. Anthony JC, LeResche L, Niaz U, von Korff MR,Folstein MF: Limits of the 'Mini-Mental State' as a screening test for dementia and delirium among hospital patients. Psychol Med 12: 397-408 (1982)
10. Apweiler R, Hermjakob H,Sharon N: On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. Biochim Biophys Acta 1473: 4-8 (1999)
11. Arguelles S, Venero JL, Garcia-Rodriguez S, Tomas-Camardiel M, Ayala A, Cano J,Machado A: Use of haptoglobin and transthyretin as potential biomarkers for the preclinical diagnosis of Parkinson's disease. Neurochem Int 57: 227-234 (2010)

12. Atkinson A, Colburn W, DeGruttola V,DeMets D: Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther 69: 89-95 (2001)

13. Auluck PK, Chan HY, Trojanowski JQ, Lee VM,Bonini NM: Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. Science 295: 865-868 (2002)

14. Avila J, Lucas JJ, Perez M,Hernandez F: Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. Physiol Rev 84: 361-384 (2004)

15. Axelsson U,Laurell CB: Hereditary variants of serum alpha-1-antitrypsin. Am J Hum Genet 17: 466-472 (1965)

16. Bassetti CL: Nonmotor disturbances in Parkinson's disease. Neurodegener Dis 8: 95-108 (2011)

17. Benkmann HG, Hanssen HP, Ovenbeck R,Goedde HW: Distribution of alpha-1-antitrypsin and haptoglobin phenotypes in bladder cancer patients. Hum Hered 37: 290-293 (1987)

18. Bennett DA, Beckett LA, Murray AM, Shannon KM, Goetz CG, Pilgrim DM,Evans DA: Prevalence of parkinsonian signs and associated mortality in a community population of older people. N Engl J Med 334: 71-76 (1996)

19. Bergh GV: Two-dimensional difference gel electrophoresis. Methods Mol Biol 519: 439-454 (2009)

20. Betarbet R, Sherer TB,Greenamyre JT: Animal models of Parkinson's disease. Bioessays 24: 308-318 (2002)

21. Blanchard V, Liu X, Eigel S, Kaup M, Rieck S, Janciauskiene S, Sandig V, Marx U, Walden P, Tauber R,Berger M: N-glycosylation and biological activity of recombinant human alpha1-antitrypsin expressed in a novel human neuronal cell line. Biotechnol Bioeng 108: 2118-2128 (2011)

22. Blennow K, Fredman P, Wallin A, Gottfries CG, Karlsson I, Langstrom G, Skoog I, Svennerholm L,Wikkelso C: Protein analysis in cerebrospinal fluid. II. Reference values derived from healthy individuals 18-88 years of age. Eur Neurol 33: 129-133 (1993)

23. Bothe MR, Uttner I,Otto M: Sharpening the boundaries of Parkinson-associated dementia: recommendation for a neuropsychological diagnostic procedure. J Neural Transm 117: 353-367 (2010)

24. 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 24: 197-211 (2003)

25. Brantly M, Nukiwa T,Crystal RG: Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency. Am J Med 84: 13-31 (1988)

26. Brantly M: Alpha1-antitrypsin: not just an antiprotease: extending the half-life of a natural anti-inflammatory molecule by conjugation with polyethylene glycol. Am J Respir Cell Mol Biol 27: 652-654 (2002)

27. Brechlin P, Jahn O, Steinacker P, Cepek L, Kratzin H, Lehnert S, Jesse S, Mollenhauer B, Kretzschmar HA, Wiltfang J,Otto M: Cerebrospinal fluid-optimized two-dimensional difference gel electrophoresis (2-D DIGE) facilitates the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Proteomics 8: 4357-4366 (2008)

28. Breit SN, Wakefield D, Robinson JP, Luckhurst E, Clark P,Penny R: The role of alpha 1-antitrypsin deficiency in the pathogenesis of immune disorders. Clin Immunol Immunopathol 35: 363-380 (1985)

29. Brettschneider J, Mogel H, Lehmensiek V, Ahlert T, Sussmuth S, Ludolph AC,Tumani H: Proteome analysis of cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Neurochem Res 33: 2358-2363 (2008)

30. Brettschneider J, Lehmensiek V, Mogel H, Pfeifle M, Dorst J, Hendrich C, Ludolph AC,Tumani H: Proteome analysis reveals candidate markers of disease progression in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Neurosci Lett 468: 23-27 (2010)

31. Brooks BR, Miller RG, Swash M,Munsat TL: El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 1: 293-299 (2000)

32. Bühner MZ, Matthias: Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon für abhängige Sichproben. Statistik für Pschychologen und Sozialwissenschaftler: 267-277 (2009)

33. Buhling F, Groneberg D,Welte T: Proteases and their role in chronic inflammatory lung diseases. Curr Drug Targets 7: 751-759 (2006)

34. Caballol N, Marti MJ,Tolosa E: Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson disease. Mov Disord 22 Suppl 17: S358-366 (2007)

35. Callea F, Stuyck JM, Massi G, Huyghe JD, Van Gijsegem DF, Jadoul DH,Desmet VJ: Alpha-1-antitrypsin (AAT) deposits in gall bladder adenocarcinoma and liver in partial AAT deficiency (Pi SZ phenotype). Am J Clin Pathol 78: 878-883 (1982)

36. Camicioli R, Rajput A, Rajput M, Reece C, Payami H,Hao C: Apolipoprotein E epsilon4 and catechol-O-methyltransferase alleles in autopsy-proven Parkinson's disease: relationship to dementia and hallucinations. Mov Disord 20: 989-994 (2005)

37. Carrette O, Burkhard PR, Sanchez JC,Hochstrasser DF: State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis: a key tool of proteomics research. Nat Protoc 1: 812-823 (2006)

38. Caudle WM, Bammler TK, Lin Y, Pan S,Zhang J: Using 'omics' to define pathogenesis and biomarkers of Parkinson's disease. Expert Rev Neurother 10: 925-942 (2010)

39. Caviness JN, Lue L, Adler CH,Walker DG: Parkinson's disease dementia and potential therapeutic strategies. CNS Neurosci Ther 17: 32-44 (2011)

40. Challapalli KK, Zabel C, Schuchhardt J, Kaindl AM, Klose J,Herzel H: High reproducibility of large-gel two-dimensional electrophoresis. Electrophoresis 25: 3040-3047 (2004)

41. Chandra S, Gallardo G, Fernandez-Chacon R, Schluter OM,Sudhof TC: Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. Cell 123: 383-396 (2005)

42. Chaudhuri KR, Martinez-Martin P, Schapira AH, Stocchi F, Sethi K, Odin P, Brown RG, Koller W, Barone P, MacPhee G, Kelly L, Rabey M, MacMahon D, Thomas S, Ondo W, Rye D, Forbes A, Tluk S, Dhawan V, Bowron A, Williams AJ,Olanow CW: International multicenter pilot study of the first comprehensive self-completed nonmotor symptoms questionnaire for Parkinson's disease: the NMSQuest study. Mov Disord 21: 916-923 (2006)

43. Chaudhuri KR,Schapira AH: Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. Lancet Neurol 8: 464-474 (2009)

44. Chaves RS, Melo TQ, Martins SA,Ferrari MF: Protein aggregation containing beta-amyloid, alpha-synuclein and hyperphosphorylated tau in cultured cells of hippocampus, substantia nigra and locus coeruleus after rotenone exposure. BMC Neurosci 11: 144 (2010)

45. Chromy BA, Gonzales AD, Perkins J, Choi MW, Corzett MH, Chang BC, Corzett CH,McCutchen-Maloney SL: Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant proteins. J Proteome Res 3: 1120-1127 (2004)

46. Churchyard A,Lees AJ: The relationship between dementia and direct involvement of the hippocampus and amygdala in Parkinson's disease. Neurology 49: 1570-1576 (1997)

47. Churg A, Dai J, Zay K, Karsan A, Hendricks R, Yee C, Martin R, MacKenzie R, Xie C, Zhang L, Shapiro S,Wright JL: Alpha-1-antitrypsin and a broad spectrum metalloprotease inhibitor, RS113456, have similar acute anti-inflammatory effects. Lab Invest 81: 1119-1131 (2001)

48. Clarke CE,Moore AP: Parkinson's disease. Clin Evid (Online) 2007 (2007)

49. Compta Y, Parkkinen L, O'Sullivan SS, Vandrovcova J, Holton JL, Collins C, Lashley T, Kallis C, Williams DR, de Silva R, Lees AJ,Revesz T: Lewy- and Alzheimer-type pathologies in Parkinson's disease dementia: which is more important? Brain 134: 1493-1505 (2011)

50. Costa-Mallen P, Checkoway H, Zabeti A, Edenfield MJ, Swanson PD, Longstreth WT, Jr., Franklin GM, Smith-Weller T,Sadrzadeh SM: The functional polymorphism of the hemoglobin-binding protein haptoglobin influences susceptibility to idiopathic Parkinson's disease. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 147B: 216-222 (2008)

51. Crowther DC: Familial conformational diseases and dementias. Hum Mutat 20: 1-14 (2002)

52. Crowther DC, Belorgey D, Miranda E, Kinghorn KJ, Sharp LK,Lomas DA: Practical genetics: alpha-1-antitrypsin deficiency and the serpinopathies. Eur J Hum Genet 12: 167-172 (2004)

53. Cutler P, Akuffo EL, Bodnar WM, Briggs DM, Davis JB, Debouck CM, Fox SM, Gibson RA, Gormley DA, Holbrook JD, Hunter AJ, Kinsey EE, Prinjha R, Richardson JC, Roses AD, Smith MA, Tsokanas N, Wille DR, Wu W, Yates JW,Gloger IS: Proteomic identification and early validation of complement 1 inhibitor and pigment epithelium-derived factor: Two novel biomarkers of Alzheimer's disease in human plasma. Proteomics Clin Appl 2: 467-477 (2008)

54. Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Sillesen H, Jensen G, Steffensen R,Nordestgaard BG: Blood pressure, risk of ischemic cerebrovascular and

ischemic heart disease, and longevity in alpha(1)-antitrypsin deficiency: the Copenhagen City Heart Study. Circulation 107: 747-752 (2003)

55. Das G, Misra AK, Das SK, Ray K,Ray J: Microtubule-associated protein tau (MAPT) influences the risk of Parkinson's disease among Indians. Neurosci Lett 460: 16-20 (2009)

56. Davis RL, Holohan PD, Shrimpton AE, Tatum AH, Daucher J, Collins GH, Todd R, Bradshaw C, Kent P, Feiglin D, Rosenbaum A, Yerby MS, Shaw CM, Lacbawan F,Lawrence DA: Familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies. Am J Pathol 155: 1901-1913 (1999)

57. de Lau LM, Schipper CM, Hofman A, Koudstaal PJ,Breteler MM: Prognosis of Parkinson disease: risk of dementia and mortality: the Rotterdam Study. Arch Neurol 62: 1265-1269 (2005)

58. den HJW,Bethlem J: The distribution of Lewy bodies in the central and autonomic nervous systems in idiopathic paralysis agitans. J Neurol Neurosurg Psychiatry 23: 283-290 (1960)

59. Devlin GL, Chow MK, Howlett GJ,Bottomley SP: Acid Denaturation of alpha1-antitrypsin: characterization of a novel mechanism of serpin polymerization. J Mol Biol 324: 859-870 (2002)

60. Di Napoli M, Shah IM,Stewart DA: Molecular pathways and genetic aspects of Parkinson's disease: from bench to bedside. Expert Rev Neurother 7: 1693-1729 (2007)

61. Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A,Tanner CM: Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. Neurology 68: 384-386 (2007)

62. Du Prel J-P HG: Konfidenzintervall oder p-Wert? Deutsches Ärzteblatt international 106: 335-339 (2009)

63. Dubois B,Pillon B: Cognitive deficits in Parkinson's disease. J Neurol 244: 2-8 (1997)

64. Dubois B, Burn D, Goetz C, Aarsland D, Brown RG, Broe GA, Dickson D, Duyckaerts C, Cummings J, Gauthier S, Korczyn A, Lees A, Levy R, Litvan I, Mizuno Y, McKeith IG, Olanow CW, Poewe W, Sampaio C, Tolosa E,Emre M: Diagnostic procedures for Parkinson's disease dementia: recommendations from the movement disorder society task force. Mov Disord 22: 2314-2324 (2007)

65. Dufek M, Hamanova M, Lokaj J, Goldemund D, Rektorova I, Michalkova Z, Sheardova K,Rektor I: Serum inflammatory biomarkers in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord 15: 318-320 (2009)

66. Durand G,Seta N: Protein glycosylation and diseases: blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring. Clin Chem 46: 795-805 (2000)

67. Echan LA, Tang HY, Ali-Khan N, Lee K,Speicher DW: Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. Proteomics 5: 3292-3303 (2005)

68. Eden E, Mitchell D, Mehlman B, Khouli H, Nejat M, Grieco MH,Turino GM: Atopy, asthma, and emphysema in patients with severe alpha-1-antitrypysin deficiency. Am J Respir Crit Care Med 156: 68-74 (1997)

69. El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, Curran MD, Court JA, Mann DM, Ikeda S, Cookson MR, Hardy J,Allsop D: Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. FASEB J 17: 1945-1947 (2003)

70. Elzouki AN, Eriksson S, Lofberg R, Nassberger L, Wieslander J,Lindgren S: The prevalence and clinical significance of alpha 1-antitrypsin deficiency (PiZ) and ANCA specificities (proteinase 3, BPI) in patients with ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis 5: 246-252 (1999)

71. Emre M: What causes mental dysfunction in Parkinson's disease? Mov Disord 18 Suppl 6: S63-71 (2003)

72. Emre M: Dementia in Parkinson's disease: cause and treatment. Curr Opin Neurol 17: 399-404 (2004)

73. Emre M, Aarsland D, Brown R, Burn DJ, Duyckaerts C, Mizuno Y, Broe GA, Cummings J, Dickson DW, Gauthier S, Goldman J, Goetz C, Korczyn A, Lees A, Levy R, Litvan I, McKeith I, Olanow W, Poewe W, Quinn N, Sampaio C, Tolosa E,Dubois B: Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease. Mov Disord 22: 1689-1707; quiz 1837 (2007)

74. Fearnley JM,Lees AJ: Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. Brain 114 (Pt 5): 2283-2301 (1991)

75. Fimm B, Bartl G, Zimmermann P,Wallesch CW: Different mechanisms underly shifting set on external and internal cues in Parkinson's disease. Brain Cogn 25: 287-304 (1994)

76. Findley L, Aujla M, Bain PG, Baker M, Beech C, Bowman C, Holmes J, Kingdom WK, MacMahon DG, Peto V,Playfer JR: Direct economic impact of Parkinson's disease: a research survey in the United Kingdom. Mov Disord 18: 1139-1145 (2003)

77. Foltynie T, Brayne CE, Robbins TW,Barker RA: The cognitive ability of an incident cohort of Parkinson's patients in the UK. The CamPaIGN study. Brain 127: 550-560 (2004)

78. Frank S: Seize the day: Quantitative EEG as a biomarker for dementia in Parkinson disease. Neurology 77: 94-95 (2011)

79. Gai WP, Blessing WW,Blumbergs PC: Ubiquitin-positive degenerating neurites in the brainstem in Parkinson's disease. Brain 118 (Pt 6): 1447-1459 (1995)

80. Galvin JE, Lee VM, Baba M, Mann DM, Dickson DW, Yamaguchi H, Schmidt ML, Iwatsubo T,Trojanowski JQ: Monoclonal antibodies to purified cortical Lewy bodies recognize the mid-size neurofilament subunit. Ann Neurol 42: 595-603 (1997)

81. Galvin JE, Pollack J,Morris JC: Clinical phenotype of Parkinson disease dementia. Neurology 67: 1605-1611 (2006)

82. Ge YW,Lahiri DK: Regulation of promoter activity of the APP gene by cytokines and growth factors: implications in Alzheimer's disease. Ann N Y Acad Sci 973: 463-467 (2002)

83. George JL, Mok S, Moses D, Wilkins S, Bush AI, Cherny RA,Finkelstein DI: Targeting the progression of Parkinson's disease. Curr Neuropharmacol 7: 9-36 (2009)

84. Gibb WR,Lees AJ: Prevalence of Lewy bodies in Alzheimer's disease. Ann Neurol 26: 691-693 (1989)

85. Gibb WR,Lees AJ: Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry 54: 388-396 (1991)

86. Gille G,Reichmann H: Iron-dependent functions of mitochondria--relation to neurodegeneration. J Neural Transm 118: 349-359 (2011)

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

88. Goetz CG, Emre M,Dubois B: Parkinson's disease dementia: definitions, guidelines, and research perspectives in diagnosis. Ann Neurol 64 Suppl 2: S81-92 (2008)

89. Gong CX, Liu F, Grundke-Iqbal I,Iqbal K: Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. J Neural Transm 112: 813-838 (2005)

90. Gooptu B,Lomas DA: Polymers and inflammation: disease mechanisms of the serpinopathies. J Exp Med 205: 1529-1534 (2008)

91. Gooptu B, Ekeowa UI,Lomas DA: Mechanisms of emphysema in alpha1-antitrypsin deficiency: molecular and cellular insights. Eur Respir J 34: 475-488 (2009)

92. Greene CM, Miller SD, Carroll T, McLean C, O'Mahony M, Lawless MW, O'Neill SJ, Taggart CC,McElvaney NG: Alpha-1 antitrypsin deficiency: a conformational disease associated with lung and liver manifestations. J Inherit Metab Dis 31: 21-34 (2008)

93. Greengauz-Roberts O, Stoppler H, Nomura S, Yamaguchi H, Goldenring JR, Podolsky RH, Lee JR,Dynan WS: Saturation labeling with cysteine-reactive cyanine fluorescent dyes provides increased sensitivity for protein expression profiling of laser-microdissected clinical specimens. Proteomics 5: 1746-1757 (2005)

94. Griffith ME, Lovegrove JU, Gaskin G, Whitehouse DB,Pusey CD: C-antineutrophil cytoplasmic antibody positivity in vasculitis patients is associated with the Z allele of alpha-1-antitrypsin, and P-antineutrophil cytoplasmic antibody positivity with the S allele. Nephrol Dial Transplant 11: 438-443 (1996)

95. Grimstein C, Choi YK, Wasserfall CH, Satoh M, Atkinson MA, Brantly ML, Campbell-Thompson M,Song S: Alpha-1 antitrypsin protein and gene therapies decrease autoimmunity and delay arthritis development in mouse model. J Transl Med 9: 21 (2011)

96. Gross V, Geiger T, Tran-Thi TA, Gauthier F,Heinrich PC: Biosynthesis and secretion of alpha 1-antitrypsin in primary cultures of rat hepatocytes. Characterization of differently glycosylated intracellular and extracellular forms. Eur J Biochem 129: 317-323 (1982)

97. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS,Wisniewski HM: Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. J Biol Chem 261: 6084-6089 (1986)

98. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM,Binder LI: Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. Proc Natl Acad Sci U S A 83: 4913-4917 (1986)

99. Grzeskowiak J: 2-D DIGE to facilitate downstream process development for recombinant therapeutic antibodies. Naturwissenschaftliche Dissertation, Universität Wien (2008)

100. Halliday GM,McCann H: The progression of pathology in Parkinson's disease. Ann N Y Acad Sci 1184: 188-195 (2010)

101. Halvorsen O,Tysnes OB: [Dementia in Parkinson's disease]. Tidsskr Nor Laegeforen 127: 2517-2520 (2007)

102. Hamilton RL: Lewy bodies in Alzheimer's disease: a neuropathological review of 145 cases using alpha-synuclein immunohistochemistry. Brain Pathol 10: 378-384 (2000)

103. Harhangi BS, de Rijk MC, van Duijn CM, Van Broeckhoven C, Hofman A,Breteler MM: APOE and the risk of PD with or without dementia in a population-based study. Neurology 54: 1272-1276 (2000)

104. Hashemi M, Naderi M, Rashidi H,Ghavami S: Impaired activity of serum alpha-1-antitrypsin in diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract 75: 246-248 (2007)

105. Hattori N: [Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease: from mitochondrial dysfunctions to familial Parkinson's disease]. Rinsho Shinkeigaku 44: 241-262 (2004)

106. Heinecke AH, Ekhard; Repges, Rudolf: Nichtparametrisch: Mann-Whitney-Wolcoxon-Test. Medizinische Biometrie: 182-185 (1992)

107. Helenius A,Aebi M: Intracellular functions of N-linked glycans. Science 291: 2364-2369 (2001)

108. Hochstrasser H, Bauer P, Walter U, Behnke S, Spiegel J, Csoti I, Zeiler B, Bornemann A, Pahnke J, Becker G, Riess O,Berg D: Ceruloplasmin gene variations and substantia nigra hyperechogenicity in Parkinson disease. Neurology 63: 1912-1917 (2004)

109. Hornykiewicz O: Basic research on dopamine in Parkinson's disease and the discovery of the nigrostriatal dopamine pathway: the view of an eyewitness. Neurodegener Dis 5: 114-117 (2008)

110. Hu WT, Chen-Plotkin A, Arnold SE, Grossman M, Clark CM, Shaw LM, McCluskey L, Elman L, Karlawish J, Hurtig HI, Siderowf A, Lee VM, Soares H,Trojanowski JQ: Biomarker discovery for Alzheimer's disease, frontotemporal lobar degeneration, and Parkinson's disease. Acta Neuropathol 120: 385-399 (2010)

111. Huang T, Long M,Huo B: Competitive Binding to Cuprous Ions of Protein and BCA in the Bicinchoninic Acid Protein Assay. Open Biomed Eng J 4: 271-278 (2010)

112. Hufschmidt A. LC, Rauer S.: Neurologie compact. Thieme: 270-271 (2009)

113. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L,Lees AJ: Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. J Neurol Neurosurg Psychiatry 55: 181-184 (1992)

114. Hughes AJ, Daniel SE, Blankson S,Lees AJ: A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. Arch Neurol 50: 140-148 (1993)

115. Hughes AJ: Clinicopathological aspects of Parkinson's disease. Eur Neurol 38 Suppl 2: 13-20 (1997)

116. Hughes TA, Ross HF, Mindham RH,Spokes EG: Mortality in Parkinson's disease and its association with dementia and depression. Acta Neurol Scand 110: 118-123 (2004)

117. Hurtig HI, Trojanowski JQ, Galvin J, Ewbank D, Schmidt ML, Lee VM, Clark CM, Glosser G, Stern MB, Gollomp SM,Arnold SE: Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease. Neurology 54: 1916-1921 (2000)

118. Hwang H, Zhang J, Chung KA, Leverenz JB, Zabetian CP, Peskind ER, Jankovic J, Su Z, Hancock AM, Pan C, Montine TJ, Pan S, Nutt J, Albin R, Gearing M, Beyer RP,Shi M: Glycoproteomics in neurodegenerative diseases. Mass Spectrom Rev 29: 79-125 (2010)

119. Ii K, Ito H, Tanaka K,Hirano A: Immunocytochemical co-localization of the proteasome in ubiquitinated structures in neurodegenerative diseases and the elderly. J Neuropathol Exp Neurol 56: 125-131 (1997)

120. Inzelberg R,Polyniki A: Are genetic and sporadic Parkinson's disease patients equally susceptible to develop dementia? J Neurol Sci (2009)

121. Irving JA, Ekeowa UI, Belorgey D, Haq I, Gooptu B, Miranda E, Perez J, Roussel BD, Ordonez A, Dalton LE, Thomas SE, Marciniak SJ, Parfrey H, Chilvers

ER, Teckman JH, Alam S, Mahadeva R, Rashid ST, Vallier L,Lomas DA: The serpinopathies studying serpin polymerization in vivo. Methods Enzymol 501: 421-466 (2011)

122. Jahn O, Hesse D, Reinelt M,Kratzin HD: Technical innovations for the automated identification of gel-separated proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 386: 92-103 (2006)

123. Jellinger K: New developments in the pathology of Parkinson's disease. Adv Neurol 53: 1-16 (1990)

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

125. Jesse S, Steinacker P, Lehnert S, Gillardon F, Hengerer B,Otto M: Neurochemical approaches in the laboratory diagnosis of Parkinson and Parkinson dementia syndromes: a review. CNS Neurosci Ther 15: 157-182 (2009)

126. Jesse S, Steinacker P, Lehnert S, Sdzuj M, Cepek L, Tumani H, Jahn O, Schmidt H,Otto M: A proteomic approach for the diagnosis of bacterial meningitis. PLoS One 5: e10079 (2010)

127. Jesse S, Brettschneider J, Sussmuth SD, Landwehrmeyer BG, von Arnim CA, Ludolph AC, Tumani H,Otto M: Summary of cerebrospinal fluid routine parameters in neurodegenerative diseases. J Neurol 258: 1034-1041 (2011)

128. Jie Z, Cai Y, Yang W, Jin M, Zhu W,Zhu C: Protective effects of alpha 1-antitrypsin on acute lung injury in rabbits induced by endotoxin. Chin Med J (Engl) 116: 1678-1682 (2003)

129. Kalbe E, Calabrese P, Kohn N, Hilker R, Riedel O, Wittchen HU, Dodel R, Otto J, Ebersbach G,Kessler J: Screening for cognitive deficits in Parkinson's disease with the Parkinson neuropsychometric dementia assessment (PANDA) instrument. Parkinsonism Relat Disord 14: 93-101 (2008)

130. King MA, Stone JA, Diaz PT, Mueller CF, Becker WJ,Gadek JE: Alpha 1-antitrypsin deficiency: evaluation of bronchiectasis with CT. Radiology 199: 137-141 (1996)

131. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y,Shimizu N: Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. Nature 392: 605-608 (1998)

132. Klassen BT, Hentz JG, Shill HA, Driver-Dunckley E, Evidente VG, Sabbagh MN, Adler CH,Caviness JN: Quantitative EEG as a predictive biomarker for Parkinson disease dementia. Neurology 77: 118-124 (2011)

133. Kok KF, Wahab PJ, Houwen RH, Drenth JP, de Man RA, van Hoek B, Meijer JW, Willekens FL,de Vries RA: Heterozygous alpha-I antitrypsin deficiency as a co-factor in the development of chronic liver disease: a review. Neth J Med 65: 160-166 (2007)

134. Kondo T, Seike M, Mori Y, Fujii K, Yamada T,Hirohashi S: Application of sensitive fluorescent dyes in linkage of laser microdissection and two-dimensional gel electrophoresis as a cancer proteomic study tool. Proteomics 3: 1758-1766 (2003)

135. Koulmanda M, Bhasin M, Hoffman L, Fan Z, Qipo A, Shi H, Bonner-Weir S, Putheti P, Degauque N, Libermann TA, Auchincloss H, Jr., Flier JS,Strom TB: Curative and beta cell regenerative effects of alpha1-antitrypsin treatment in autoimmune diabetic NOD mice. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 16242-16247 (2008)

136. Kuiperij HB, van Pel M, de Rooij KE, Hoeben RC,Fibbe WE: Serpina1 (alpha1-AT) is synthesized in the osteoblastic stem cell niche. Exp Hematol 37: 641-647 (2009)

137. Kulisevsky J, Pagonabarraga J, Llebaria G, Hernandez B,Arranz J: Evaluation of doctor/patient satisfaction with the use of the Parkinson's Disease Dementia-Short-Screen (PDD-SS): a screening test for dementia in Parkinson's disease (DIFFUSION study). Neurologia 26: 461-467 (2011)

138. Kuzuhara S, Mori H, Izumiyama N, Yoshimura M,Ihara Y: Lewy bodies are ubiquitinated. A light and electron microscopic immunocytochemical study. Acta Neuropathol 75: 345-353 (1988)

139. Kwon KS,Yu MH: Effect of glycosylation on the stability of alpha1-antitrypsin toward urea denaturation and thermal deactivation. Biochim Biophys Acta 1335: 265-272 (1997)

140. Lacki JK, Schochat T, Leszczynski P, Mackiewicz SH,Muller W: IgA-alpha-1-antitrypsin complex in systemic lupus erythematosus: preliminary report. Lupus 4: 221-224 (1995)

141. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685 (1970)

142. Lang AE,Lozano AM: Parkinson's disease. First of two parts. N Engl J Med 339: 1044-1053 (1998)

143. Lange S. BR: Die Vierfeldertafel. Deutsche Medizinische Wochenschrift 126: T 36-38 (2001)

144. Lange S. BR: Quantile, empirische Verteilungsfunktion und Box Plot. Deutsche Medizinische Wochenschrift 126: T27-28 (2001)

145. Lange S. BR: Was ist ein Konfidenzintervall? Deutsche Medizinische Wochenschrift 126: T41-T41 (2001)

146. Lange S. BR: Variabilitätsmaße. Deutsche Medizinische Wochenschrift 132 Suppl 1: e5-e6 (2007)

147. Langlois MR,Delanghe JR: Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. Clin Chem 42: 1589-1600 (1996)

148. Larbi NB,Jefferies C: 2D-DIGE: comparative proteomics of cellular signalling pathways. Methods Mol Biol 517: 105-132 (2009)

149. Lei P, Ayton S, Finkelstein DI, Adlard PA, Masters CL,Bush AI: Tau protein: relevance to Parkinson's disease. Int J Biochem Cell Biol 42: 1775-1778 (2010)

150. Leverenz JB, Quinn JF, Zabetian C, Zhang J, Montine KS,Montine TJ: Cognitive impairment and dementia in patients with Parkinson disease. Curr Top Med Chem 9: 903-912 (2009)

151. Lewis EC, Shapiro L, Bowers OJ,Dinarello CA: Alpha1-antitrypsin monotherapy prolongs islet allograft survival in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 12153-12158 (2005)

152. Lewis EC, Mizrahi M, Toledano M, Defelice N, Wright JL, Churg A, Shapiro L,Dinarello CA: alpha1-Antitrypsin monotherapy induces immune tolerance during islet allograft transplantation in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 16236-16241 (2008)

153. Licker V, Kovari E, Hochstrasser DF,Burkhard PR: Proteomics in human Parkinson's disease research. J Proteomics (2009)

154. Lisowska-Myjak B,Pachecka J: Antigenic and functional levels of alpha-1-antitrypsin in serum during normal and diabetic pregnancy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 106: 31-35 (2003)

155. Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I,Gong CX: Involvement of aberrant glycosylation in phosphorylation of tau by cdk5 and GSK-3beta. FEBS Lett 530: 209-214 (2002)

156. Liu F, Zaidi T, Iqbal K, Grundke-Iqbal I,Gong CX: Aberrant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase A and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 5. Neuroscience 115: 829-837 (2002)

157. Liu F, Zaidi T, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Merkle RK,Gong CX: Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. FEBS Lett 512: 101-106 (2002)

158. Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z,Lansbury PT, Jr.: The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. Cell 111: 209-218 (2002)

159. Lomas DA,Carrell RW: Serpinopathies and the conformational dementias. Nat Rev Genet 3: 759-768 (2002)

160. Lomas DA, Belorgey D, Mallya M, Miranda E, Kinghorn KJ, Sharp LK, Phillips RL, Page R, Robertson AS,Crowther DC: Molecular mousetraps and the serpinopathies. Biochem Soc Trans 33: 321-330 (2005)

161. Louis ED, Marder K, Cote L, Tang M,Mayeux R: Mortality from Parkinson disease. Arch Neurol 54: 260-264 (1997)

162. Ludolph AC, Kassubek J, Landwehrmeyer BG, Mandelkow E, Mandelkow EM, Burn DJ, Caparros-Lefebvre D, Frey KA, de Yebenes JG, Gasser T, Heutink P, Hoglinger G, Jamrozik Z, Jellinger KA, Kazantsev A, Kretzschmar H, Lang AE, Litvan I, Lucas JJ, McGeer PL, Melquist S, Oertel W, Otto M, Paviour D, Reum T, Saint-Raymond A, Steele JC, Tolnay M, Tumani H, van Swieten JC, Vanier MT, Vonsattel JP, Wagner S,Wszolek ZK: Tauopathies with parkinsonism: clinical spectrum, neuropathologic basis, biological markers, and treatment options. Eur J Neurol 16: 297-309 (2009)

163. Luisetti M,Seersholm N: Alpha1-antitrypsin deficiency. 1: epidemiology of alpha1-antitrypsin deficiency. Thorax 59: 164-169 (2004)

164. Mackiewicz A, Ganapathi MK, Schultz D,Kushner I: Monokines regulate glycosylation of acute-phase proteins. J Exp Med 166: 253-258 (1987)

165. Maes OC, Kravitz S, Mawal Y, Su H, Liberman A, Mehindate K, Berlin D, Sahlas DJ, Chertkow HM, Bergman H, Melmed C,Schipper HM: Characterization of alpha1-antitrypsin as a heme oxygenase-1 suppressor in Alzheimer plasma. Neurobiol Dis 24: 89-100 (2006)

166. Mahr AD, Edberg JC, Stone JH, Hoffman GS, St Clair EW, Specks U, Dellaripa PF, Seo P, Spiera RF, Rouhani FN, Brantly ML,Merkel PA: Alpha-

antitrypsin deficiency-related alleles Z and S and the risk of Wegener's granulomatosis. Arthritis Rheum 62: 3760-3767 (2010)

167. Mandel S, Grunblatt E, Riederer P, Gerlach M, Levites Y,Youdim MB: Neuroprotective strategies in Parkinson's disease : an update on progress. CNS Drugs 17: 729-762 (2003)

168. Marder K, Tang MX, Alfaro B, Mejia H, Cote L, Louis E, Stern Y,Mayeux R: Risk of Alzheimer's disease in relatives of Parkinson's disease patients with and without dementia. Neurology 52: 719-724 (1999)

169. Mattson MP: Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. Physiol Rev 77: 1081-1132 (1997)

170. Mayeux R, Chen J, Mirabello E, Marder K, Bell K, Dooneief G, Cote L,Stern Y: An estimate of the incidence of dementia in idiopathic Parkinson's disease. Neurology 40: 1513-1517 (1990)

171. McKeith IG, Galasko D, Kosaka K, Perry EK, Dickson DW, Hansen LA, Salmon DP, Lowe J, Mirra SS, Byrne EJ, Lennox G, Quinn NP, Edwardson JA, Ince PG, Bergeron C, Burns A, Miller BL, Lovestone S, Collerton D, Jansen EN, Ballard C, de Vos RA, Wilcock GK, Jellinger KA,Perry RH: Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. Neurology 47: 1113-1124 (1996)

172. McNamara LE, Dalby MJ, Riehle MO,Burchmore R: Fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis for biomaterial applications. J R Soc Interface 7 Suppl 1: S107-118 (2009)

173. Mechref Y, Madera M,Novotny MV: Glycoprotein enrichment through lectin affinity techniques. Methods Mol Biol 424: 373-396 (2008)

174. Meng Z,Veenstra TD: Proteomic analysis of serum, plasma, and lymph for the identification of biomarkers. Proteomics Clin Appl 1: 747-757 (2007)

175. Mills K, Mills PB, Clayton PT, Johnson AW, Whitehouse DB,Winchester BG: Identification of alpha(1)-antitrypsin variants in plasma with the use of proteomic technology. Clin Chem 47: 2012-2022 (2001)

176. Mohs RC, Rosen WG,Davis KL: The Alzheimer's disease assessment scale: an instrument for assessing treatment efficacy. Psychopharmacol Bull 19: 448-450 (1983)

177. Mollenhauer B,Trenkwalder C: Neurochemical biomarkers in the differential diagnosis of movement disorders. Mov Disord 24: 1411-1426 (2009)

178. Nielsen HM, Minthon L, Londos E, Blennow K, Miranda E, Perez J, Crowther DC, Lomas DA,Janciauskiene SM: Plasma and CSF serpins in Alzheimer disease and dementia with Lewy bodies. Neurology 69: 1569-1579 (2007)

179. Nilsson C, Stahlberg F, Thomsen C, Henriksen O, Herning M,Owman C: Circadian variation in human cerebrospinal fluid production measured by magnetic resonance imaging. Am J Physiol 262: R20-24 (1992)

180. Nishizuka S, Charboneau L, Young L, Major S, Reinhold WC, Waltham M, Kouros-Mehr H, Bussey KJ, Lee JK, Espina V, Munson PJ, Petricoin E, 3rd, Liotta LA,Weinstein JN: Proteomic profiling of the NCI-60 cancer cell lines using new high-density reverse-phase lysate microarrays. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 14229-14234 (2003)

181. Nussbaum M, Treves TA, Inzelberg R, Rabey JM,Korczyn AD: Survival in Parkinson's disease: the effect of dementia. Parkinsonism Relat Disord 4: 179-181 (1998)

182. Ohtsubo K,Marth JD: Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. Cell 126: 855-867 (2006)

183. Olanow CW,McNaught KS: Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease. Mov Disord 21: 1806-1823 (2006)

184. Omenn GS, States DJ, Adamski M, Blackwell TW, Menon R, Hermjakob H, Apweiler R, Haab BB, Simpson RJ, Eddes JS, Kapp EA, Moritz RL, Chan DW, Rai AJ, Admon A, Aebersold R, Eng J, Hancock WS, Hefta SA, Meyer H, Paik YK, Yoo JS, Ping P, Pounds J, Adkins J, Qian X, Wang R, Wasinger V, Wu CY, Zhao X, Zeng R, Archakov A, Tsugita A, Beer I, Pandey A, Pisano M, Andrews P, Tammen H, Speicher DW,Hanash SM: Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. Proteomics 5: 3226-3245 (2005)

185. Orme JE: The Coloured Progressive Matrices as a measure of intellectual subnormality. Br J Med Psychol 34: 291-292 (1961)

186. Padovani A, Costanzi C, Gilberti N,Borroni B: Parkinson's disease and dementia. Neurol Sci 27 Suppl 1: S40-43 (2006)

187. Pan S, Zhu D, Quinn JF, Peskind ER, Montine TJ, Lin B, Goodlett DR, Taylor G, Eng J,Zhang J: A combined dataset of human cerebrospinal fluid proteins identified by multi-dimensional chromatography and tandem mass spectrometry. Proteomics 7: 469-473 (2007)

188. Pankratz ND, Wojcieszek J,Foroud T: Parkinson Disease Overview. (1993)

189. Parkinson J: An Essay on the Shaking Palsy. Sherwood, Neely, and Jones (1817)

190. Parkkinen L, Kauppinen T, Pirttila T, Autere JM,Alafuzoff I: Alpha-synuclein pathology does not predict extrapyramidal symptoms or dementia. Ann Neurol 57: 82-91 (2005)

191. Parkkinen L, Pirttila T, Tervahauta M,Alafuzoff I: Widespread and abundant alpha-synuclein pathology in a neurologically unimpaired subject. Neuropathology 25: 304-314 (2005)

192. Parsian A, Racette B, Goldsmith LJ,Perlmutter JS: Parkinson's disease and apolipoprotein E: possible association with dementia but not age at onset. Genomics 79: 458-461 (2002)

193. Peskind ER, Riekse R, Quinn JF, Kaye J, Clark CM, Farlow MR, Decarli C, Chabal C, Vavrek D, Raskind MA,Galasko D: Safety and acceptability of the research lumbar puncture. Alzheimer Dis Assoc Disord 19: 220-225 (2005)

194. Petrache I, Fijalkowska I, Zhen L, Medler TR, Brown E, Cruz P, Choe KH, Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Shapiro L, Zhang B, Song S, Hicklin D, Voelkel NF, Flotte T,Tuder RM: A novel antiapoptotic role for alpha1-antitrypsin in the prevention of pulmonary emphysema. Am J Respir Crit Care Med 173: 1222-1228 (2006)

195. Pezzini A, Vignolo LA,Padovani A: Risk of ischemic cerebrovascular disease in alpha1-antitrypsin deficiency. Circulation 108: e62-63; author reply e62-63 (2003)

196. Poewe W,Wenning G: The differential diagnosis of Parkinson's disease. Eur J Neurol 9 Suppl 3: 23-30 (2002)

197. Poewe W, Gauthier S, Aarsland D, Leverenz JB, Barone P, Weintraub D, Tolosa E,Dubois B: Diagnosis and management of Parkinson's disease dementia. Int J Clin Pract 62: 1581-1587 (2008)

198. Poewe WH,Wenning GK: The natural history of Parkinson's disease. Neurology 47: S146-152 (1996)

199. Pollanen MS, Dickson DW,Bergeron C: Pathology and biology of the Lewy body. J Neuropathol Exp Neurol 52: 183-191 (1993)

200. Potempa J, Korzus E,Travis J: The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. J Biol Chem 269: 15957-15960 (1994)

201. Pott GB, Chan ED, Dinarello CA,Shapiro L: Alpha-1-antitrypsin is an endogenous inhibitor of proinflammatory cytokine production in whole blood. J Leukoc Biol 85: 886-895 (2009)

202. Propst T, Propst A, Dietze O, Judmaier G, Braunsteiner H,Vogel W: Prevalence of hepatocellular carcinoma in alpha-1-antitrypsin deficiency. J Hepatol 21: 1006-1011 (1994)

203. Puchades M, Hansson SF, Nilsson CL, Andreasen N, Blennow K,Davidsson P: Proteomic studies of potential cerebrospinal fluid protein markers for Alzheimer's disease. Brain Res Mol Brain Res 118: 140-146 (2003)

204. Rajput AH, Rozdilsky B,Rajput A: Accuracy of clinical diagnosis in parkinsonism--a prospective study. Can J Neurol Sci 18: 275-278 (1991)

205. Ramstrom M, Hagman C, Mitchell JK, Derrick PJ, Hakansson P,Bergquist J: Depletion of high-abundant proteins in body fluids prior to liquid chromatography fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. J Proteome Res 4: 410-416 (2005)

206. Rapport LJ, Millis SR,Bonello PJ: Validation of the Warrington theory of visual processing and the Visual Object and Space Perception Battery. J Clin Exp Neuropsychol 20: 211-220 (1998)

207. Reiber H: Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. Restor Neurol Neurosci 21: 79-96 (2003)

208. Reingold JL, Morgan JC,Sethi KD: Rivastigmine for the treatment of dementia associated with Parkinson's disease. Neuropsychiatr Dis Treat 3: 775-783 (2007)

209. Rongve A,Aarsland D: Management of Parkinson's disease dementia : practical considerations. Drugs Aging 23: 807-822 (2006)

210. Saez-Valero J, Fodero LR, Sjogren M, Andreasen N, Amici S, Gallai V, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Parnetti L, Blennow K,Small DH: Glycosylation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase changes as a function of the duration of Alzheimer's disease. J Neurosci Res 72: 520-526 (2003)

211. Salahuddin P: Genetic variants of alpha1-antitrypsin. Curr Protein Pept Sci 11: 101-117 (2009)

212. Sarkar A,Wintrode PL: Effects of glycosylation on the stability and flexibility of a metastable protein: the human serpin alpha(1)-antitrypsin. Int J Mass Spectrom 302: 69-75 (2011)

213. Schmitt FA, Aarsland D, Bronnick KS, Meng X, Tekin S,Olin JT: Evaluating rivastigmine in mild-to-moderate Parkinson's disease dementia using ADAS-cog items. Am J Alzheimers Dis Other Demen 25: 407-413 (2010)

214. Schrag A, Jahanshahi M,Quinn N: How does Parkinson's disease affect quality of life? A comparison with quality of life in the general population. Mov Disord 15: 1112-1118 (2000)

215. Schroder S, Zhang H, Yeung ES, Jansch L, Zabel C,Watzig H: Quantitative gel electrophoresis: sources of variation. J Proteome Res 7: 1226-1234 (2008)

216. Schröder S: Präzision in der Gelelektrophorese für die Pharmazeutische Qualitätskontrolle. Naturwissenschaftliche Dissertation, Universität Braunschweig (2009)

217. Shahaf G, Moser H, Ozeri E, Mizrahi M, Abecassis A,Lewis EC: alpha-1-antitrypsin gene delivery reduces inflammation, increases T-regulatory cell population size and prevents islet allograft rejection. Mol Med 17: 1000-1011 (2011)

218. Shaw J, Rowlinson R, Nickson J, Stone T, Sweet A, Williams K,Tonge R: Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. Proteomics 3: 1181-1195 (2003)

219. Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS,Selkoe DJ: Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. Science 293: 263-269 (2001)

220. Sihlbom C, Davidsson P, Sjogren M, Wahlund LO,Nilsson CL: Structural and quantitative comparison of cerebrospinal fluid glycoproteins in Alzheimer's disease patients and healthy individuals. Neurochem Res 33: 1332-1340 (2008)

221. Singh B,O'Brien JT: When should drug treatment be started for people with dementia? Maturitas 62: 230-234 (2009)

222. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R,Goedert M: Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature 388: 839-840 (1997)

223. Srivastava R, Murphy MJ,Jeffery J: Cerebrospinal fluid: the role of biochemical analysis. Br J Hosp Med (Lond) 69: 218-221 (2008)

224. Steen H,Mann M: The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. Nat Rev Mol Cell Biol 5: 699-711 (2004)

225. Stern Y, Marder K, Tang MX,Mayeux R: Antecedent clinical features associated with dementia in Parkinson's disease. Neurology 43: 1690-1692 (1993)

226. Subramanian S, Shahaf G, Ozeri E, Miller LM, Vandenbark AA, Lewis EC,Offner H: Sustained expression of circulating human alpha-1 antitrypsin reduces inflammation, increases CD4+FoxP3+ Treg cell population and prevents signs of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. Metab Brain Dis 26: 107-113 (2011)

227. Sullivan K: Estimates of interrater reliability for the Logical Memory subtest of the Wechsler Memory Scale-Revised. J Clin Exp Neuropsychol 18: 707-712 (1996)

228. Sun Z,Yang P: Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression. Lancet Oncol 5: 182-190 (2004)

229. Sunderland A, Watts K, Baddeley AD,Harris JE: Subjective memory assessment and test performance in elderly adults. J Gerontol 41: 376-384 (1986)

230. Suzuki T,Nakaya T: Regulation of amyloid beta-protein precursor by phosphorylation and protein interactions. J Biol Chem 283: 29633-29637 (2008)

231. Terry DE,Desiderio DM: Between-gel reproducibility of the human cerebrospinal fluid proteome. Proteomics 3: 1962-1979 (2003)

232. Thinakaran G,Koo EH: Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. J Biol Chem 283: 29615-29619 (2008)

233. Thomas B,Beal MF: Parkinson's disease. Hum Mol Genet 16 Spec No. 2: R183-194 (2007)

234. Tilg H, Vannier E, Vachino G, Dinarello CA,Mier JW: Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 beta synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. J Exp Med 178: 1629-1636 (1993)

235. Timms JF,Cramer R: Difference gel electrophoresis. Proteomics 8: 4886-4897 (2008)

236. Tompkins MM,Hill WD: Contribution of somal Lewy bodies to neuronal death. Brain Res 775: 24-29 (1997)

237. Topic A, Juranic Z, Jelic S,Magazinovic IG: Polymorphism of alpha-1-antitrypsin in hematological malignancies. Genet Mol Biol 32: 716-719 (2009)

238. Torsdottir G, Kristinsson J, Sveinbjornsdottir S, Snaedal J,Johannesson T: Copper, ceruloplasmin, superoxide dismutase and iron parameters in Parkinson's disease. Pharmacol Toxicol 85: 239-243 (1999)

239. Truong DD,Wolters EC: Recognition and management of Parkinson's disease during the premotor (prodromal) phase. Expert Rev Neurother 9: 847-857 (2009)

240. Tucha O, Aschenbrenner S,Lange KW: Mirror writing and handedness. Brain Lang 73: 432-441 (2000)

241. Tuokko H, Hadjistavropoulos T, Rae S,O'Rourke N: A comparison of alternative approaches to the scoring of clock drawing. Arch Clin Neuropsychol 15: 137-148 (2000)

242. Uc EY, McDermott MP, Marder KS, Anderson SW, Litvan I, Como PG, Auinger P, Chou KL,Growdon JC: Incidence of and risk factors for cognitive impairment in an early Parkinson disease clinical trial cohort. Neurology 73: 1469-1477 (2009)

243. Uhl GR, Walther D, Mash D, Faucheux B,Javoy-Agid F: Dopamine transporter messenger RNA in Parkinson's disease and control substantia nigra neurons. Ann Neurol 35: 494-498 (1994)

244. Van den Bergh G,Arckens L: Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics. Curr Opin Biotechnol 15: 38-43 (2004)

245. Vaughan L, Lorier MA,Carrell RW: alpha 1-Antitrypsin microheterogeneity. Isolation and physiological significance of isoforms. Biochim Biophys Acta 701: 339-345 (1982)

246. Viswanathan S, Unlu M,Minden JS: Two-dimensional difference gel electrophoresis. Nat Protoc 1: 1351-1358 (2006)

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

248. Wakabayashi K,Takahashi H: [Pathology of familial Parkinson's disease]. Brain Nerve 59: 851-864 (2007)

249. Wang Y, Luo W,Reiser G: Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: proteolysis and cellular functions. Cell Mol Life Sci 65: 237-252 (2008)

250. Wei X,Li L: Comparative glycoproteomics: approaches and applications. Brief Funct Genomic Proteomic 8: 104-113 (2009)

251. Weintraub D, Comella CL,Horn S: Parkinson's disease--Part 3: Neuropsychiatric symptoms. Am J Manag Care 14: S59-69 (2008)

252. Weintraub D, Comella CL,Horn S: Parkinson's disease--Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. Am J Manag Care 14: S40-48 (2008)

253. Weintraub D, Somogyi M,Meng X: Rivastigmine in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease Dementia: An ADAS-Cog Factor Analysis. Am J Alzheimers Dis Other Demen (2011)

254. Westermeier R,Scheibe B: Difference gel electrophoresis based on lys/cys tagging. Methods Mol Biol 424: 73-85 (2008)

255. Williams-Gray CH, Foltynie T, Lewis SJ,Barker RA: Cognitive deficits and psychosis in Parkinson's disease: a review of pathophysiology and therapeutic options. CNS Drugs 20: 477-505 (2006)

256. Wiltfang J, Lewczuk P, Riederer P, Grunblatt E, Hock C, Scheltens P, Hampel H, Vanderstichele H, Iqbal K, Galasko D, Lannfelt L, Otto M, Esselmann H, Henkel AW, Kornhuber J,Blennow K: Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers of Dementia: the role of CSF and blood analysis in the early and differential diagnosis of dementia. World J Biol Psychiatry 6: 69-84 (2005)

257. Yaghmaei M, Hashemi M, Shikhzadeh A, Mokhtari M, Niazi A,Ghavami S: Serum trypsin inhibitory capacity in normal pregnancy and gestational diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract 84: 201-204 (2009)

258. Yamasaki M, Li W, Johnson DJ,Huntington JA: Crystal structure of a stable dimer reveals the molecular basis of serpin polymerization. Nature 455: 1255-1258 (2008)

259. Yang P, Cunningham JM, Halling KC, Lesnick TG, Burgart LJ, Wiegert EM, Christensen ER, Lindor NM, Katzmann JA,Thibodeau SN: Higher risk of mismatch repair-deficient colorectal cancer in alpha(1)-antitrypsin deficiency carriers and cigarette smokers. Mol Genet Metab 71: 639-645 (2000)

260. Yang P, Sun Z, Krowka MJ, Aubry MC, Bamlet WR, Wampfler JA, Thibodeau SN, Katzmann JA, Allen MS, Midthun DE, Marks RS,de Andrade M: Alpha1-antitrypsin deficiency carriers, tobacco smoke, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer risk. Arch Intern Med 168: 1097-1103 (2008)

261. Yavich L, Tanila H, Vepsalainen S,Jakala P: Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. J Neurosci 24: 11165-11170 (2004)

262. Yesavage JA, Brink TL, Rose TL, Lum O, Huang V, Adey M,Leirer VO: Development and validation of a geriatric depression screening scale: a preliminary report. J Psychiatr Res 17: 37-49 (1982)

263. Yu HL, Chertkow HM, Bergman H,Schipper HM: Aberrant profiles of native and oxidized glycoproteins in Alzheimer plasma. Proteomics 3: 2240-2248 (2003)

264. Yu M, Wang XX, Zhang FR, Shang YP, Du YX, Chen HJ,Chen JZ: Proteomic analysis of the serum in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. J Zhejiang Univ Sci B 8: 221-227 (2007)

265. Zabel C, Chamrad DC, Priller J, Woodman B, Meyer HE, Bates GP,Klose J: Alterations in the mouse and human proteome caused by Huntington's disease. Mol Cell Proteomics 1: 366-375 (2002)

266. Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Munoz DG,de Yebenes JG: The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. Ann Neurol 55: 164-173 (2004)

267. Zhang J: Proteomics of human cerebrospinal fluid - the good, the bad, and the ugly. Proteomics Clin Appl 1: 805-819 (2007)

268. Zhang J, Sokal I, Peskind ER, Quinn JF, Jankovic J, Kenney C, Chung KA, Millard SP, Nutt JG,Montine TJ: CSF multianalyte profile distinguishes Alzheimer and Parkinson diseases. Am J Clin Pathol 129: 526-529 (2008)

269. Zhou S, Bailey MJ, Dunn MJ, Preedy VR,Emery PW: A quantitative investigation into the losses of proteins at different stages of a two-dimensional gel electrophoresis procedure. Proteomics 5: 2739-2747 (2005)

Danksagung

Inhalte der Seite wurden aus Gründen des Datenschutzes entfernt.
.

Lebenslauf von Saskia Tawfik

Inhalte der Seite wurden aus Gründen des Datenschutzes entfernt.