

Aus der Abteilung Neurologie  
(Prof. Dr. med. M. Bähr)  
im Zentrum Neurologische Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Liquorproteomveränderungen bei Patienten  
mit Lewy-Körperchen-Demenz**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Jana-Katharina Dieks**  
aus  
Unna

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. I. Zerr

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. H. Urlaub

3. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. O. Wirths

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Oktober 2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB) .....	1
1.1.1 Einführung .....	1
1.1.2 Historisches .....	1
1.1.3 Epidemiologie .....	2
1.1.4 Klinisches Erscheinungsbild der DLB .....	3
1.1.4.1 Kognitive Einschränkungen .....	3
1.1.4.2 Psychiatrische und neurologische Symptomatik.....	3
1.1.4.3 Autonome Symptomatik und Schlafstörungen .....	3
1.1.4.4 Neuroleptikasensitivität.....	4
1.1.4.5 Krankheitsprogression und -verlauf .....	4
1.1.5 Neuropathologie und Neurochemie .....	5
1.1.6 Aktuelle klinische Konsensuskriterien.....	7
1.1.7 Differentialdiagnosen .....	8
1.1.8 Diagnostische Möglichkeiten .....	9
1.1.8.1 Klinische und apparative Testverfahren.....	9
1.1.8.2 Bildgebende Verfahren .....	10
1.1.8.3 Labordiagnostik .....	11
1.2 Proteomik .....	12
1.2.1 Begriffe und Grundlagen der Proteomik .....	12

1.2.2 Gel-basierte Expressionsproteomik (Tannu et Hemby 2006) .....	13
1.2.3 Proteomik in der Demenzforschung .....	15
1.3. Zielsetzung der Arbeit.....	16
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
2.1 Material.....	17
2.1.1 Patientenkollektiv, Probenkollektion und -asservierung.....	17
2.1.2 Chemikalien.....	18
2.1.3 Verwendete Kits .....	20
2.1.4 SDS-PAGE-Proteinstandard.....	20
2.1.5 Antikörper .....	21
2.1.6 Geräte.....	22
2.1.7 Puffer und Lösungen .....	23
2.1.8 Sonstige Materialien .....	25
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Proteindepletion.....	26
2.2.1.1 Proteindepletion mit dem IgY-12 High Capacity Spin Column Proteome Partitioning Kit .....	27
2.2.1.2 Proteindepletion mit dem IgY-12 High LC2 Column Proteome Partitioning Kit.....	28
2.2.2 Probeneinengung nach erfolgter Proteindepletion.....	29
2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	29
2.2.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem 2-D Quant Kit .....	29
2.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem Dosascap-Nephelometer .....	30
2.2.4 Proteinpräzipitation .....	30

2.2.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese .....	31
2.2.5.1 Vorbereitung der Proben für die zweidimensionale Gelelektrophorese .....	31
2.2.5.2 Gießen der Gele .....	32
2.2.5.3 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung .....	32
2.2.5.4 Äquilibration der IPG-Gel-Streifen .....	33
2.2.5.5 Zweite Dimension: SDS-PAGE .....	33
2.2.5.6 Färbemethoden für Polyacrylamidgele .....	34
2.2.5.6.1 CyDye DIGE Fluor Minimal Dyes .....	34
2.2.5.6.2 Silberfärbung .....	35
2.2.5.6.3 Kolloidale Coomassie-Färbung .....	36
2.2.6 Tryptischer In-Gel-Verdau .....	36
2.2.7 Identifikation der durch Trypsinverdau vorbereiteten Peptidfragmente mittels Massenspektrometrie .....	37
2.2.8 Western Blots nach ein- und zweidimensionaler SDS-PAGE .....	38
2.2.8.1 Durchführung der eindimensionalen Gelelektrophorese für Western Blots .....	38
2.2.8.2 Durchführung der zweidimensionalen Gelelektrophorese für Western Blots .....	39
2.2.8.3 Western Blots nach ein- beziehungsweise zweidimensionaler Gelelektrophorese .....	40
2.2.9 Statistische Analyse .....	41
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
3.1 Charakteristika der Patientenauswahl und Liquorproben .....	42
3.2 Proteindepletion .....	45
3.3 Proteomanalyse - generelle Beobachtungen .....	46

3.4 Im Liquor von DLB-Patienten regulierte Proteine .....	51
3.4.1 Proteine mit Einfluss auf die Immunantwort .....	51
3.4.2 Proteine beteiligt am Glukosestoffwechsel .....	52
3.4.3 Proteine beteiligt am Lipidstoffwechsel.....	53
3.4.4 Proteine mit Einfluss auf die Zellstruktur.....	53
3.4.5 Proteine beteiligt an Signaltransduktionskaskaden .....	54
3.4.6 Andere bei DLB regulierte Proteine .....	54
3.5 Ergebnisse der 2D-Western Blots .....	55
3.5.1 Complement C4a.....	55
3.5.2 Transthyretin.....	56
3.5.3 Contactin-1 .....	57
3.5.4 Chromogranin A .....	58
3.6 Ergebnisse der Western Blots .....	58
3.6.1 Complement C4a.....	59
3.6.2 Transthyretin.....	60
3.6.3 Contactin-1 .....	62
3.6.4 Chromogranin A .....	62
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>65</b>
4.1 Vorteile der proteindepletierten gegenüber unfraktioniert verwendeten Proben ..	65
4.2 Ergebnisse der Western Blots .....	66
4.3 Einfluss der DLB-Pathologie auf verschiedene biologische Funktionsbereiche in einer Zelle.....	67
4.3.1 Immunantwort im Zusammenhang mit der DLB und Neurodegeneration .....	68

4.3.2 Die Bedeutung des Glukosestoffwechsels bei der DLB.....	72
4.3.3 Die Bedeutung des Lipidstoffwechsels bei der DLB .....	73
4.3.4 Modifikation der Zellstruktur und Zelladhäsion durch DLB und weitere neurodegenerative Erkrankungen .....	74
4.3.5 Einfluss der DLB-Pathologie auf Signaltransduktionskaskaden .....	76
4.3.6 Die Rolle anderer bei DLB regulierter Proteine.....	77
4.4 Gibt es ein klassisches Proteinprofil bei der DLB oder sogar Biomarker-Potential einzelner Proteine?.....	79
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>82</b>
<b>6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>84</b>
(Tabellarische Auflistung der in der Literatur beschriebenen Proteinveränderungen im menschlichen Liquor bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, die die gleichen Proteine betreffen, die auch in dieser vorliegenden Arbeit als im Liquor bei BDLB reguliert gefunden wurden.)	
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>86</b>

**Abkürzungen**

ACN	Acetonitril
AD	Alzheimer-Demenz
ADRDA	Alzheimer's Disease and related Disorders Association
AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat
AIREN	Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences
ALBU	Serum albumin
ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C
ANGT	Angiotensinogen
APLP1	Amyloid-like protein 1
APOA4	Apolipoprotein A-IV
APS	Ammoniumpersulfat
B3GN1	N-acetyllactosaminide beta-1,3-N-acetylglucosaminyl-transferase
BLOTTO	Bovine Lacto Transfer Technique Optimizer
BPB	Bromophenolblau
CAMCOG	Cambridge Assessment for Cognitive Disorders in the Elderly
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CGA	Chromogranin A
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CO3	Complement C3

CO4A	Complement C4a
CNTN1	Contactin-1
CSTN1	Calsyntenin-1
CYTC	Cystatin-C
ddH <sub>2</sub> O	doppeltdestilliertes Wasser
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DAT-Scan	Dopamintransporter-Szintigraphie
DLB	Demenz mit Lewy-Körperchen
DMF	Dimethylformamid
DSM-IV-TR	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
ENOA	Alpha-Enolase
ESI	Electrospray Ionization
ESI-Q-TOF	Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight
FTD	Frontotemporale Demenz
GELS	Gelsolin
GPX3	Glutathione peroxidase 3
HCl	Salzsäure
IAA	Iodacetamid
ICD-10	Internationale Klassifikation der Krankheiten, 10. Revision
IEF	Isoelektrische Fokussierung

IGFBP2	Insulin-like growth factor-binding protein 2
IgG	Immunglobulin G
IPG	immobilisierter pH-Gradient
ITIH4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
kDa	kiloDalton
KPYM	Pyruvate kinase isozymes M1/M2
LK	Lewy-Körperchen
LN	Lewy-Neuriten
LP	Lumbalpunktion
M	Molar
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MIBG	Metajodobenzylguanidin
Min.	Minuten
mM	milliMolar
MMSE	Mini-Mental State Examination
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Molekulargewicht
NINCDS	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke
NINDS	National Institute of Neurological Disorders and Stroke
NSE	Neuronenspezifische Enolase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung mit 20% Tween

PD	Parkinson-Erkrankung (Parkinson's Disease)
PDGDS	Prostaglandin-H2 D-isomerase
PEDF	Pigment epithelium-derived factor
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pl	Isolelektrischer Punkt
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
REM-Schlaf	Rapid Eye Movement-Schlaf
rpm	rounds per minute
SAP3	Ganglioside GM2 activator
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Sek.	Sekunden
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomographie
Std.	Stunden
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoroacetic acid
THRB	Prothrombin
TTHY	Transthyretin
UniProt	Universal Protein Resource
V	Volt
Vh	Voltstunden
Vol	Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

Vorläufige Ergebnisse dieser Arbeit wurden am 09.05.2009 auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und klinischen Neurochemie e.V. in Göttingen als Poster präsentiert. Die endgültigen Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Journal of Alzheimer's Disease publiziert.

# 1 Einleitung

## 1.1 Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB)

### 1.1.1 Einführung

Nach ICD-10 ist Demenz ein Syndrom als Folge einer meist chronischen oder fortschreitenden Krankheit des Gehirns, das mit einer Gedächtnisstörung und einem Abbau des Denkvermögens einhergeht. Sie beinhaltet ebenfalls die Veränderung der Persönlichkeit und ist so ausgeprägt, dass dadurch die berufliche und private Selbstständigkeit beeinträchtigt ist. *Per definitionem* muss die Störung seit mindestens sechs Monaten und nicht nur im Rahmen eines Delirs bestehen (ICD-10-Code F00-F03) (WHO 2010).

Bei der Demenz handelt es sich um eine Erkrankung von steigender Bedeutung und Häufigkeit, die sieben Prozent der Bevölkerung über 65 Jahren betrifft und bis zu 30 Prozent derer, die älter sind als 80 Jahre (McKeith et al. 2004). Im Jahre 2000 wurde die Anzahl weltweit Erkrankter auf 25 Millionen geschätzt, ein Anstieg auf bis zu 114 Millionen bis zum Jahr 2050 wird prognostiziert (Wimo et al. 2003).

Eine akkurate *ante mortem* Diagnose von Demenzerkrankungen ist bei dieser sehr großen Anzahl Betroffener aus unterschiedlichen Gründen relevant. Zum einen gewinnen medikamentöse Therapien für Demenzerkrankungen an Bedeutung, jedoch schwankt die Effektivität der jeweiligen Behandlungsansätze deutlich zwischen den unterschiedlichen Krankheitsentitäten (Rogers et al. 1998). Des Weiteren variieren Krankheitsprogressivität und Art der Symptomentwicklung sehr stark zwischen den Patienten mit jeweils differierenden Diagnosen (Olichney et al. 1998). Die Suche nach potentiellen Biomarkern für die DLB ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

### 1.1.2 Historisches

Die DLB ist als eigene Krankheitsentität recht spät anerkannt worden, was unter anderem mit historischen Fakten zu begründen ist. Forster und Lewy beschrieben 1912 zum ersten Mal die sogenannten Lewy-Körperchen (LK) als zytoplasmatische

Einschlüsse in Zellen der Substantia nigra bei an Parkinson erkrankten Patienten. Seit den 1960er Jahren wurde ein möglicher Zusammenhang von LK mit Demenzerkrankungen diskutiert (Kosaka 1978, Okazaki et al. 1961), jedoch wurden bis in die 1980er Jahre nur einzelne Fälle beschrieben, da die kortikalen LK mit herkömmlichen Färbemethoden wie Hämatoxylin und Eosin nur sehr schwer zu detektieren waren. Die Entwicklung immunzytochemischer Färbemethoden mit Antikörpern gegen Ubiquitin und vor allem  $\alpha$ -Synuklein ermöglichte die einfachere Visualisierung und brachte wissenschaftliche Arbeiten über die einzelnen Lewy-Körperchen-Erkrankungen voran (Lennox et al. 1989 b, Spillantini et al. 1998). Diesen Erkenntnissen folgten jedoch unterschiedliche Interpretationen bezüglich der Signifikanz und konsekutiv uneinheitliche Nomenklaturen. So wurden zum Beispiel die Begriffe „Lewy-Körperchen-Variante der Demenz vom Alzheimer-Typ“ (Hansen et al. 1990) oder „diffuse Lewy-Körperchen-Krankheit“ geprägt (Byrne et al. 1989), bis 1995 eine Konsensuskonferenz stattfand, auf der einheitliche klinische und pathologische Richtlinien definiert wurden (McKeith et al. 1996).

### **1.1.3 Epidemiologie**

Heute ist die DLB nach der Alzheimer-Demenz (AD) als die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung des älteren Menschen (Heidebrink 2002, McKeith et al. 1996, Weiner 1999) anerkannt, wobei die Erkrankungswahrscheinlichkeit mit steigendem Alter stetig zunimmt (Perez et al. 2010). Sie wird in ungefähr zehn bis 25 Prozent der Fälle einer Demenzerkrankung als zugrunde liegende Ursache diagnostiziert (Heidebrink 2002, McKeith et al. 1996, Weiner 1999). Bevölkerungsbasierte Studien zeigen dabei eine altersabhängige Prävalenz von circa einem Prozent mit 65 Jahren, die sich in Autopsie-Serien-Ergebnissen herausstellen ließ (McKeith et al. 2004), bis zu einer Auftretenshäufigkeit von etwa fünf Prozent bei über 85jährigen, wie in einer finnischen Studie gezeigt werden konnte (Rahkonen et al. 2003). Einige Autoren suggerieren, dass Männer häufiger betroffen sind als Frauen, jedoch sind diesbezüglich wenige Daten veröffentlicht worden (Zaccai et al. 2005).

Neben den sporadisch auftretenden sind auch Fälle von familiärer DLB beschrieben (Bogaerts et al. 2007, Brett et al. 2002, Tsuang et al. 2004).

## **1.1.4 Klinisches Erscheinungsbild der DLB**

### **1.1.4.1 Kognitive Einschränkungen**

Die Demenz ist ein essentielles Symptom, um die Diagnose einer DLB stellen zu dürfen (McKeith et al. 1996). Früh im Krankheitsverlauf kommt es zu Beeinträchtigungen der Aufmerksamkeit und der Exekutivfunktionen sowie zu semantischen und visuokonstruktiven Störungen (Collerton et al. 2003), womit sich ein deutlicher Unterschied zwischen DLB- und AD-Patienten ergibt (Ralph et al. 2001).

Dabei sind Fluktuationen der kognitiven Funktionen, die unterschiedlich lange andauern können, in vielen Fällen vorliegend und können in Ihrer Art bei nicht-dementen, normal gealterten Personen, DLB- und AD-Patienten unterschieden werden (Bradshaw et al. 2004, Ferman et al. 2004). Charakteristisch für die DLB sind Tagesmüdigkeit und -lethargie, Schlafen während des Tages für mehr als zwei Stunden, für eine längere Zeit in die Gegend starren sowie eine unorganisierte Sprache (Ferman et al. 2004).

### **1.1.4.2 Psychiatrische und neurologische Symptomatik**

Psychiatrische Manifestationen sind häufig und beinhalten vorwiegend visuelle Halluzinationen, Wahnvorstellungen, Apathie und Angstgefühle (McKeith et al. 2004). Sie mögen der initiale Grund für eine Vorstellung beim Arzt sein und neigen dazu, zu persistieren (Ballard et al. 2001 c).

Bis zu 70 Prozent der DLB-Patienten leiden unter Parkinsonismus, Bradykinesien, erhöhtem Muskeltonus und Gangstörungen. Obwohl bereits bei Diagnosestellung bei 25 bis 50 Prozent der Patienten extrapyramidalmotorische Symptome vorliegen bzw. die meisten sie im Krankheitsverlauf entwickeln, bleiben bis zu 25 Prozent aller Patienten davon verschont (McKeith 2002).

### **1.1.4.3 Autonome Symptomatik und Schlafstörungen**

Klinisch präsentieren sich Patienten mit DLB häufiger als bei der AD mit vegetativen Symptomen wie Schwindelgefühl, Präsynkopen, Synkopen und Stürzen, die sich durch eine autonome Dysfunktion im Sinne einer orthostatischen Dysregulation oder Karotissinus-Hypersensitivität erklären lassen (Kuzuhara et Yoshimura 1993,

McKeith et al. 1992 b). Auch die Harninkontinenz gehört zu recht frühen Symptomen der Erkrankung (Del-Ser et al. 1996).

Die REM-Schlaf-Verhaltensstörung ist eine Form der Parasomnien und häufiger mit Synukleinopathien als mit Nicht-Synukleinopathien assoziiert (Boeve et al. 2001). Ihre Therapie kann helfen, auch weitere Symptome der DLB wie Halluzination oder Störungen der Kognition zu verbessern (Boeve et al. 2004). Neuere Daten zeigen, dass REM-Schlaf-Verhaltensstörungen frühe Vorläufer beziehungsweise Manifestationen einer folgenden neurodegenerativen Erkrankung sein können, und bis zum Auftreten erster neurologischer Symptome im Rahmen einer Synukleinopathie eventuell Jahre bis Jahrzehnte liegen (Claassen et al. 2010).

#### **1.1.4.4 Neuroleptikasensitivität**

Generell sind ältere Menschen anfälliger, extrapyramidalmotorische Nebenwirkungen nach Neuroleptikagabe zu entwickeln, jedoch sind besonders Patienten mit DLB suszeptibel gegenüber sowohl typischen als auch atypischen Stoffen dieser Gruppe und reagieren in circa 30 Prozent der Fälle mit unerwünschten Folgen wie einer Zunahme extrapyramidalmotorischer Symptome, des kognitiven Abbaus und vermehrter Schläfrigkeit bis hin zur Entwicklung von Symptomen des malignen neuroleptischen Syndroms (Aarsland et al. 2005, Ballard et al. 1998, McKeith et al. 1992 a).

#### **1.1.4.5 Krankheitsprogression und -verlauf**

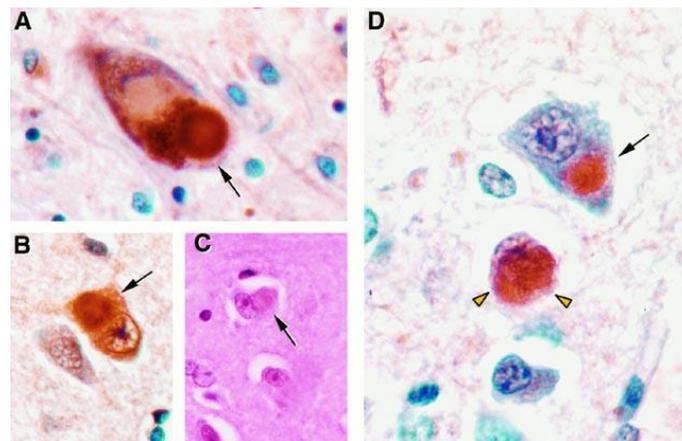
Interindividuell unterschiedlich schnell und unter anderem von der Lokalisation der Hauptpathologie abhängig verläuft die Erkrankung bei den einzelnen Patienten. Eine frühe und schwere Extrapyramidalsymptomatik ist bei Erkrankten mit vor allem nigrostriatalen Veränderungen zu erwarten, bei frühen Halluzinationen sowie kognitiven Einschränkungen sind Läsionen in kortikalen und limbischen Arealen zu finden und bei deutlicher posturaler Instabilität können Pathologien des Rückenmarks sowie der vegetativen Ganglien identifiziert werden (McKeith et al. 1996).

Demenzerkrankungen wie die DLB verkürzen die individuelle Lebenserwartung deutlich. Diese Tatsache liegt unter anderem in krankheitsassoziierten Komplikationen wie einem erhöhten Risiko für Stürze und damit einhergehenden

Verletzungen, Infektionserkrankungen und mangelhafter Nutrition durch Bettlägerigkeit, einer Dysphagiesymptomatik sowie weiteren Problemen begründet. Die mittlere Erkrankungsdauer der DLB beträgt fünf bis sechs Jahre mit einer Spannweite von zwei bis 20 Jahren (Mosimann et McKeith 2003). Die Geschwindigkeit der kognitiven Verschlechterung wird mittels MMSE determiniert, pro Jahr Erkrankungsdauer wird dabei eine Reduktion von vier bis fünf MMSE-Punkten angegeben (Ballard et al. 2001 b). Die Krankheitsprogression der DLB im Vergleich mit der AD wird in der Literatur als rapider oder aber als genauso rasch progredient beschrieben (Ballard et al. 2001 b, Olichney et al. 1998, Walker Z et al. 2000).

### 1.1.5 Neuropathologie und Neurochemie

Eine neuropathologisch gesicherte Diagnose der DLB beruht auf dem Nachweis sogenannter Lewy-Körperchen (LK) (McKeith et al. 1996) (Abbildung 1.1), die sich in kortikalen und subkortikalen Hirnregionen Betroffener befinden (Dickson et al. 1991, Hansen et al. 1990, Kosaka et al. 1984, Lennox et al. 1989 a, Perry RH et al. 1990). Bei den LK handelt es sich um neuronale Einschlüsse, bestehend aus  $\alpha$ -Synuklein in Verbindung mit Intermediärfilamenten, Chaperonproteinen, Elementen des Ubiquitin-Proteasom-Systems und anderen Proteinablagerungen (Abbildung 1.1).



*Abbildung 1.1:* Lewy-Körperchen (Chu et al. 2000). A: reifes LK in einem Neuron der Substantia nigra (Ubiquitin-färbung), B: LK in einem kortikalen Neuron (Ubiquitin-färbung), C: Kortikale LK (Hämatoxylin-Eosin-Färbung), D: LK als abgrenzbare, rundliche, homogene intrazytoplasmatische Einschlüsse (Pfeil) und kugelförmige Tangles (Pfeilspitzen) (Ubiquitin-färbung) (nach Chu et al. 2000, Seite 425).

Zudem kommt es zu Ablagerungen von  $\alpha$ -Synuklein-positiven Lewy-Neuriten (LN), die genau wie die LK nicht pathognomonisch für die DLB sind, sondern sich auch bei anderen Synukleinopathien wie der Parkinson-Erkrankung (PD) oder der Multisystematrophie nachweisen lassen, was suggeriert, dass möglicherweise ein gemeinsamer Pathomechanismus für diese Erkrankungen existiert (Martí et al. 2003). Bei der DLB sind LK und LN im Neokortex, limbischen Kortex, in subkortikalen Kernen und dem Hirnstamm lokalisiert (Perry RH et al. 1990). Anhand der Anzahl der LK und LN werden vier Schweregrade unterschieden (mild, moderat, schwer, sehr schwer) (McKeith et al. 2005); nach dem Verteilungsmuster der LK lassen sich die Erkrankungsfälle pathologischen Subtypen zuordnen (Tabelle 1.1).

				Neokortikal		
Subtyp	Hirnstamm	Transentorhinal	Cingulum	Temporal	Frontal	Parietal
Hirnstamm	+	+/-	+/-	-	-	-
Limbisch	+	+	+	+	+/-	-
Neokortikal	+	+	+	+	+	+

*Tabelle 1.1:* Subtypen der Lewy-Körperchen-Pathologie (modifiziert durch Fischer et Krenn 2006, Seite 33, nach McKeith et al. 2005).

Zusätzlich zu oben genannten zeigen sich verschiedene neuropathologische Veränderungen, die teils typischen, durch das Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) (Mirra et al. 1991) beschriebenen Merkmalen bei der AD entsprechen und klinische Charakteristika deutlich beeinflussen können (Merdes et al. 2003) (*vice versa* sind auch bei der AD LK nachzuweisen (Lippa et al. 1999)). Bei diesen Erscheinungen handelt es sich um Plaques unterschiedlicher Morphologien, neurofibrilläre Tangles, regional betonten Neuronenverlust - insbesondere im Hirnstamm und Nucleus basalis Meynert -, spongiforme Veränderungen mit Vakuolenbildung und Synapsenverluste (McKeith et al. 1996). Der Nachweis einer für die AD typischen Pathologie ist kein Ausschlusskriterium für die Diagnosestellung einer DLB. Auch umgekehrt ist das Vorhandensein von LK für die Diagnose einer AD je nach dominierender Pathologie und untersuchender Klinik

nicht unbedingt ein Ausschlusskriterium, allerdings gibt es hierfür keinen schriftlichen Konsens.

Die DLB ist außerdem assoziiert mit neurochemischen Veränderungen vor allem des dopaminergen sowie acetylcholinergen Systems (McKeith et al. 1996). Striatum zeigt sich ein signifikanter, zu einer klinisch manifesten Extrapyramidalsymptomatik führender Verlust dopaminergener Neurone, wobei sich dieser bei der DLB in geringerer Ausprägung findet als bei der PD, und bei der AD nicht nachweisbar ist (Piggott et al. 1999). Bei der DLB besteht zudem ein sich von der AD unterscheidendes cholinerges Defizit, was das ungleiche Ansprechen der Krankheitsentitäten auf in dieses System eingreifende Medikamente, zum Beispiel aus der Gruppe der Acetylcholinesteraseinhibitoren, erklären könnte (Shiozaki et al. 1999, Perry EK et al. 1994). Die Entstehung visueller Halluzinationen hängt vermutlich mit der dopaminergen-cholinergen Imbalance (Perry EK et al. 1990) sowie dem Vorhandensein von temporalen LK in höherer Dichte zusammen (Harding et al. 2002).

#### **1.1.6 Aktuelle klinische Konsensuskriterien**

Die einheitlich Gültigkeit besitzenden Kriterien zur Diagnosestellung einer DLB wurden von McKeith in wiederholten Konsortien begründet, die erstmalig 1996 stattfanden und seither wiederholt aktualisiert wurden (McKeith et al. 1996, 1999 und 2005).

Das zentrale Merkmal Demenz ist essentiell für die Diagnose einer DLB, bei Vorliegen von zusätzlich einem Kernmerkmal ist eine mögliche, bei Vorliegen von zusätzlich zwei Kernmerkmalen ist eine wahrscheinliche DLB zu diagnostizieren. Daneben wurden suggestive und supportive Merkmale definiert (Tabelle 1.2), um die Sensitivität der bereits bestehenden Kriterien zu erhöhen, die deutlich geringer ist als ihre Spezifität (Holmes et al. 1999, Litvan et al. 1998, Lopez et al. 2002, Luis et al. 1999, Mega et al. 1996, Verghese et al. 1999).

Die Diagnose DLB ist weniger wahrscheinlich bei nachgewiesenem cerebrovaskulärem Schaden oder wenn eine andere Erkrankung vorliegt, die zumindest in Anteilen die klinische Symptomatik des Patienten hinreichend erklärt.

Um Patienten mit DLB von denen mit Parkinson-Demenz zu unterscheiden, wird die sogenannte „Ein-Jahres-Regel“ angewendet (beim Parkinson-Demenz-Komplex besteht die Extrapiramidalsymptomatik mehr als ein Jahr vor Beginn einer dementiellen Entwicklung (McKeith et al. 2005)).

1. Zentrales Merkmal	Demenz
2. Kernmerkmale	Fluktuationen Visuelle Halluzinationen Parkinsonismus
3. Suggestive Merkmale	REM-Schlaf-Verhaltensstörung Neuroleptikasensitivität Verminderte Dopamin-Transporter-Aufnahme in den Basalganglien (in SPECT oder PET nachgewiesen)
4. Supportive Merkmale	Stürze oder Synkopen, Bewusstseinsverluste, autonome Dysfunktion, andere als visuelle Halluzinationen, Wahnvorstellungen, Depression, Temporallappen in kranialer Bildgebung relativ unverändert, verminderte regionale Hirndurchblutung (v.a. okzipital), pathologische MIBG-Myokard-Szintigraphie, typische EEG-Veränderungen (Kapitel 1.1.8.1)

*Tabelle 1.2:* Revidierte Kriterien für die klinische Diagnose der DLB (nach McKeith et al. 2005, Seite 1864).

### 1.1.7 Differentialdiagnosen

Differentialdiagnostisch sollte je nach klinischer Präsentation ein Spektrum von Erkrankungen in Betracht gezogen werden, das sich in vier Kategorien einteilen lässt (McKeith 2002). Dazu zählen zum einen weitere Demenzerkrankungen wie die AD, die Frontotemporale Demenz oder die Vaskuläre Demenz, daneben neurologische Erkrankungen wie die PD, der Normaldruckhydrozephalus, die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK), die Multisystematrophie oder die Progressive Supranukleäre Blickparese oder auch psychiatrische Erkrankungen wie die Manie, depressive Psychosen oder Wahnerkrankungen mit spätem Beginn. Als Letztes sollten in differentialdiagnostischen Überlegungen andere Gründe für ein Delirium ausgeschlossen werden, wie zum Beispiel eine Infektion, metabolische oder

endokrinologische Ursachen, Medikamente und weitere Noxen, Substanzentzug und ein Schlaganfall oder cerebrale Durchblutungsstörungen im weitesten Sinne.

Nach wie vor ist die AD die klinisch am häufigsten gestellte Fehldiagnose bei der Beurteilung von Patienten mit DLB (McKeith et al. 1994). Diese mit circa 70 Prozent häufigste aller Demenzen (Bermejo-Pareja et al. 2008, Bickel 2000) präsentiert sich klinisch typischerweise mit einem früh im Krankheitsverlauf auftretenden, progressiven Gedächtnisverlust, der einhergeht mit einer Abnahme von kognitiven Fähigkeiten sowie von Emotion, Sozialverhalten oder Antrieb und einer deutlichen Alltagsbeeinträchtigung. Sie ist von mindestens sechsmonatiger Dauer, eine Bewusstseinsstrübung tritt dabei nicht auf (nach Alzheimer 1907, DSM-IV-TR American Psychiatric Association 2000), Dubois et al. 2007 und NINCDS–ADRDA (McKhann et al. 1984)).

Generell sollte eine erweiterte Diagnostik inklusive einer kranialen Bildgebung, laborchemischer Untersuchungen und neuropsychiatrischer Testungen in Zusammenschau mit dem anamnestisch exakt zu eruiierenden Krankheitsverlauf und der klinischen Symptome herangezogen werden, um die verschiedenen Krankheitsbilder besser voneinander unterscheiden zu können.

### **1.1.8 Diagnostische Möglichkeiten**

Erste Verdachtsdiagnosen werden meist besonders basierend auf klinischen Kriterien gestellt. So gibt es verschiedene Konsortien, die einheitliche Hilfestellungen für die verschiedenen Demenzerkrankungen beschlossen haben, die zusätzlich zu klinischen Merkmalen die Befunde laborchemischer, psychometrischer, apparativer, bildgebender und weiterer Verfahren hinzuziehen, um mögliche und wahrscheinliche Diagnosen zu stützen (z.B. Konsensuskriterien nach McKeith et. al für die DLB, NINCDS–ADRDA für die AD, UK Parkinson’s Disease Society Brain Bank für die PD, NINDS-AIREN für die Vaskuläre Demenz und weitere). Ein gesicherter Krankheitsfall ist in den meisten Fällen nur neuropathologisch zu diagnostizieren.

#### **1.1.8.1 Klinische und apparative Testverfahren**

Zur Erfassung von Störungen der Aufmerksamkeit, des räumlichen Denkens und Handelns und von Gedächtnisstörungen bedient man sich verschiedener

psychometrischer Untersuchungen wie des MMSE als eines orientierenden Testverfahrens oder des ausführlicheren CAMCOG. Zusätzlich kann der Fluktuationsgrad von Aufmerksamkeit und Kognition, der bei Patienten mit DLB signifikant höher ist als bei gesunden Menschen oder bei AD-Erkrankten, sowohl quantitativ als auch qualitativ erfasst werden (Ballard et al. 2001 a, Bradshaw et al. 2004, Ferman et al. 2004, Walker MP et al. 2000).

Die Polysomnographie als umfangreiche Untersuchung des Schlafes zeigt typische und vor allem häufig auftretende und voneinander differierende Veränderungen bei Patienten mit DLB und mit AD (Grace et. al 2000). Besonders das Vorhandensein von REM-Schlaf-Störungen bei Patienten mit einer degenerativen Demenzerkrankung ist besonders häufig mit der Diagnose DLB assoziiert (Ferman et al. 1999).

EEG-Veränderungen können in Zusammenschau mit klinischen Kriterien - vor allem auch unter Berücksichtigung der Symptome Fluktuation und REM-Schlaf-Störung - in frühen Stadien der Demenzerkrankung ergänzend zur Diagnosefindung hinzugezogen werden (Bonanni et al. 2008, Briel et al. 1999).

#### **1.1.8.2 Bildgebende Verfahren**

In der kranialen MRT finden sich eine deutliche Atrophie des Putamens bei DLB-Patienten (Goto et al. 2010) und demgegenüber eine ausgeprägtere Temporallappenatrophie bei AD (Barber et al. 2000). Zudem zeigt sich in SPECT-Untersuchungen der regionalen Hirndurchblutung, dass sich bei der DLB eine okzipitale Hypoperfusion findet (Lobotesis et al. 2001), in PET-Untersuchungen stellt sich ein verminderter Glukosemetabolismus vor allem des Okzipitallappens dar (Imamura et al. 2001). Als besonders spezifisch gilt die Darstellung des nigrostriatalen dopaminergen Systems mittels präsynaptischer dopaminergere Liganden; es zeigte sich eine sehr hohe Korrelation von pathologischen DAT-Scan-Befunden (z.B. <sup>123</sup>I-FP-CIT SPECT) mit der Schwere der Klinik einer DLB (Colloby et al. 2008, McKeith et al. 2007, O'Brien et al. 2009, Walker Z et al. 2002).

Bei der DLB kommt es zu einer frühzeitigen sympathischen Denervation, was in der I-123-MIBG-Myokardszintigraphie objektiviert werden kann (Miyamoto et al. 2008, Wada-Isoe et al. 2007, Yoshita et al. 2001)

### 1.1.8.3 Labordiagnostik

Im Liquor können mittlerweile in der Routinediagnostik sogenannte Demenzmarker untersucht werden, die bei verschiedenen Demenzerkrankungen in typischer Konstellation und Quantität verändert sein können (Tabelle 1.3). Zu diesen gehören unter anderem Gesamt-Tau-Protein, phosphoryliertes Tau-Protein (phosphoryliert an Threonin 181), NSE, TTR,  $\beta$ -Amyloid 1-40 und  $\beta$ -Amyloid 1-42 (z.B. Bian et al. 2008, Gloeckner et al. 2008, Gomez-Tortosa et al. 2003, Mollenhauer et al. 2006, Parnetti et al. 2001).

	DLB	AD	FTD	CJK
Tau	↑	↑	↑	↑↑
Phospho-Tau	-	↑	-	-
$\beta$ -Amyloid (1-40 und 1-42)	↓	↓	↓	↓
$\alpha$ -Synuklein	-/↓	-/↓	n.b.	↑

*Tabelle 1.3:* Typische, für die klinische Diagnostik relevante (Tau, Phospho-Tau,  $\beta$ -Amyloid (1-40 und 1-42)) Proteinveränderungen im Liquor bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen. Zudem die Veränderung der  $\alpha$ -Synuklein-Werte bei DLB, AD und CJK im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Mollenhauer et al. 2008, Ohrfelt et al. 2009, Reesink et al. 2010). (n.b. nicht bestimmt)

Der Versuch,  $\alpha$ -Synuklein als einen wichtigen Bestandteil der LK im Liquor nachzuweisen und dies womöglich als ein Diagnostikum oder prognostisches Kriterium verwenden zu können, war in den letzten Jahren Gegenstand vieler Untersuchungsreihen. Zur Differenzierung von DLB-, PD- und AD-Patienten sowie gesunden Kontrollen stellte sich im Liquor gemessenes  $\alpha$ -Synuklein allerdings nicht als geeigneter Marker heraus (Ohrfelt et al. 2009, Reesink et al. 2010). Lediglich die Untersuchung der  $\alpha$ -Synuklein-Werte im Liquor verschiedener Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen von Mollenhauer et al. (2008) scheint Hinweise auf ein mögliches Biomarkerpotential dieses Proteins zu geben. Studienergebnisse suggerieren außerdem, dass erniedrigte  $\alpha$ -Synuklein-Werte im Liquor von DLB- (Reesink et al. 2010) und auch AD-Patienten (Ohrfelt et al. 2009) möglicherweise mit einer schlechteren kognitiven Performance korrelieren. Zudem wurde die Hypothese

aufgestellt, dass  $\alpha$ -Synuklein eventuell als genereller Indikator für den Verlust von Synapsen eingesetzt werden könnte (Ohrfelt et al. 2009).

Neben den beschriebenen sind bereits andere Liquor-Marker als potentielle Kandidaten für die DLB vorgeschlagen worden, wie zum Beispiel das heart-type Fatty Acid-Binding Protein (Mollenhauer et al. 2007). Diese ließen sich jedoch entweder in den nachfolgenden Studien nicht reproduzieren oder bedürfen einer aufwändigen Detektionsmethode, so dass sie den Eingang in die Routinediagnostik noch nicht gefunden haben. Zudem existieren bereits groß angelegte Proteomstudien, denen unterschiedliche methodische Ansätze zugrunde liegen (Abdi et al. 2006) und durch die viele, womöglich krankheitsspezifische Veränderungen aufgezeigt wurden. Auch aus diesen Studien ergaben sich allerdings bislang noch keine klinischen Konsequenzen. Weitere, einfach zu bestimmende und überall einsetzbare Marker sollen deshalb identifiziert werden und die klinische Routinediagnostik ergänzen.

## **1.2 Proteomik**

### **1.2.1 Begriffe und Grundlagen der Proteomik**

Die Proteomik ist eine Forschungsrichtung der Proteinanalytik, die sich mit der Untersuchung von Form, Funktion und Interaktion von Proteinen in einem definierten Kompartiment beschäftigt. Das Proteom ist dabei eine Bezeichnung, die 1994 in Anlehnung an die Begriffe Genom oder Transkriptom auf einer Konferenz im italienischen Siena durch Marc R. Wilkins geprägt wurde und die Gesamtheit aller Proteine meint, die zu einem definierten Zeitpunkt unter bestimmten Bedingungen in einem Organismus vorliegt (Wilkins et al. 1996).

Strukturproteine, Enzyme, Proteine der Signaltransduktion oder -regulation spielen eine große Rolle in nahezu allen Prozessen, die das Leben eines Organismus aufrecht erhalten und sind daher für verschiedenste Bereiche der medizinischen Forschung interessant: Proteine können als Marker bei der Diagnosestellung verschiedener Krankheiten eine Rolle spielen (Adam et al. 2002, Petricoin et al. 2002) und medikamentöse Therapien können bei fundierten Kenntnissen des Proteoms optimiert und Wirkstoffe leichter entwickelt werden, wenn das Zielmolekül

gut bekannt ist. Darüber hinaus kann die Detektion neuer Stoffwechsel- und Signalwege helfen, die Entstehung der zugrunde liegenden Pathologie einer Krankheit zu verstehen und potentiell eine Modulation des Prozesses zu ermöglichen (vgl. auch Abbildung 1.2). Insbesondere die Darstellung der bei DLB veränderten Stoffwechselwege und Signalkaskaden soll in dieser Arbeit - neben der Fragestellung nach Biomarkern für diese Erkrankung - im Mittelpunkt stehen.

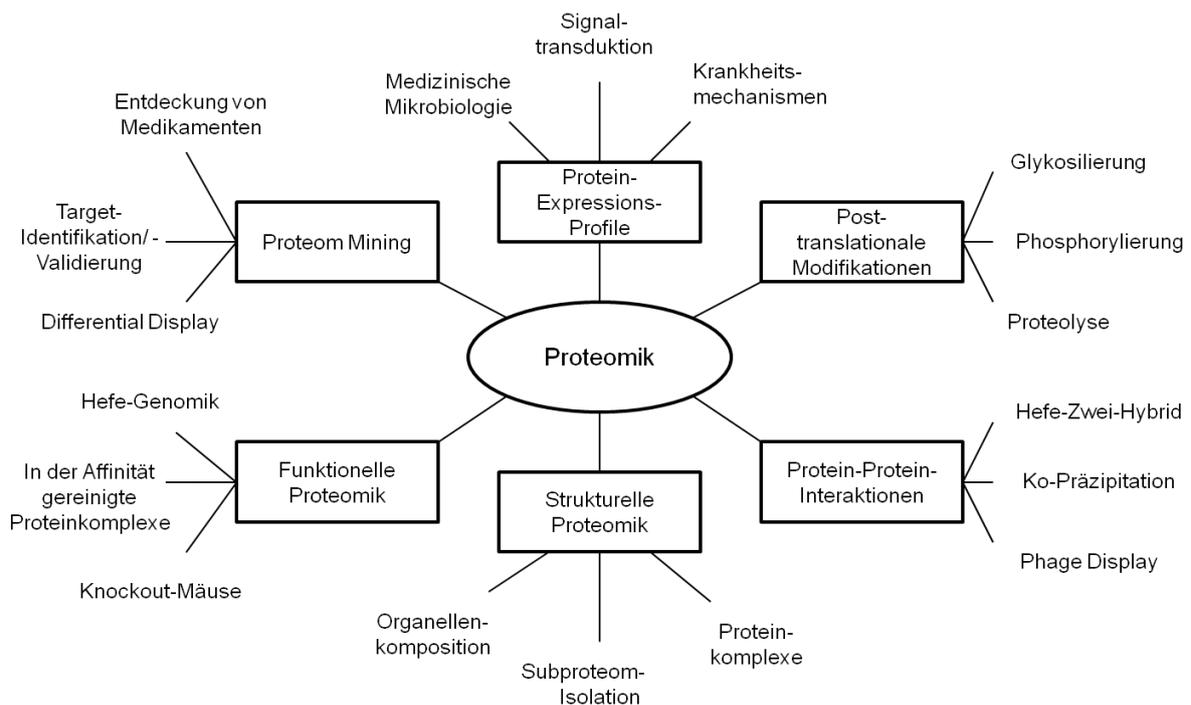


Abbildung 1.2: Typen der Proteomik und ihre Anwendung in der Biologie (nach Graves et Haystead 2002, Seite 41)

Nach dem Vorbild der Genomforschung wurde die HUPO (Human-Proteom-Organisation) gebildet, die die Öffentlichkeit auf die Bedeutung der Proteomforschung lenken soll, Forschungskapazitäten koordiniert und das Ziel hat, einen umfassenden Katalog des humanen Proteoms vorzulegen ([www.hupo.org](http://www.hupo.org)).

### 1.2.2 Gel-basierte Expressionsproteomik (Tannu et Hemby 2006)

Zur Bearbeitung verschiedener Fragestellungen in der Proteomik stehen viele Techniken zur Verfügung. Die Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese ist weit verbreitet, um Proteinexpressionen in Körperflüssigkeiten zu untersuchen; sie

wurde auch in dieser Arbeit angewendet. Proteine werden dabei zunächst mittels isoelektrischer Fokussierung nach isoelektrischem Punkt separiert und in der zweiten Dimension mittels SDS-PAGE nach Molekulargewicht aufgetrennt (z.B. Carrette et al. 2006). Um die Proteine auf dem Gel sichtbar zu machen, stehen klassische Färbemöglichkeiten, wie zum Beispiel die Silber- oder Coomassie-Färbung zur Verfügung, jedoch bietet die neueste technische Errungenschaft zur Visualisierung der Proteine - 2D-DIGE (Unlü et al. 1997) - viele Vorteile. Bei dieser Methode wird jeweils eine Lysingruppe eines jeden Proteins mit Cyanine (Cy) Dyes (Farbstoff) noch vor der isoelektrischen Fokussierung markiert. Dabei werden für die zu untersuchende und die Vergleichsprobe unterschiedliche Farbstoffe verwendet. Nach anschließender Proteinauftrennung, die in einem gemeinsamen Lauf erfolgt, können die unterschiedlich regulierten Proteine der jeweiligen Probe über die Farbkodierung erkannt werden. Bei dieser Methode ist dabei ein insgesamt geringeres Probenvolumen notwendig als bei den herkömmlichen Verfahren und die Probleme der Standardisierung der Gele werden minimiert. Mit verschiedenen Dyes können bis zu drei Proben auf ein einziges Gel aufgetragen werden, was die Variabilität der Proteinspotmuster ebenso deutlich reduziert wie die Anzahl der für ein Experiment benötigten Gele. Dies vereinfacht den abschließenden Vergleich der Proteinexpressionsmuster mittels einer Software für quantitative Image-Analysen zur Detektion unterschiedlicher Proteinregulationen und macht ihn reliabler. Proteinspots von Interesse werden entweder von Hand oder maschinell gesteuert aus dem Gel geschnitten und einem tryptischen In-Gel-Verdau zugeführt, damit die Sequenzanalyse zur Proteinidentifikation mittels Massenspektrometrie (MS) erfolgen kann. Die MS basiert auf der Auftrennung ionisierter Proteine oder Peptide nach Massen-Ladungs-Verhältnis mittels sogenannter Mass Analyzer (Time-of-Flight (TOF), Quadrupole, Ion Trap und FTICR). Als Ionenquellen stehen dafür ESI oder MALDI zur Verfügung. Bei dem Prozess der Tandem-MS (MS/MS) wird ein bei der initialen MS generiertes Ion/Protein selektiert, in kleinere Teile fragmentiert und dann die Masse der resultierenden Ionen gemessen. Diese sekundären Ionen können in Proteinsequenzen dechiffriert werden, so dass es möglich wird, mit Hilfe von Protein-Datenbanken das korrespondierende Protein zu identifizieren.

### 1.2.3 Proteomik in der Demenzforschung

Auch in der Demenzforschung hat die Proteomik steigende Bedeutung erlangt. So ist der Nachweis von spezifischen Biomarkern oder typischen Konstellationen von veränderten Proteinen in Körperflüssigkeiten - bei neurodegenerativen Erkrankungen vor allem im Liquor - ein diagnostisches Werkzeug, das im klinischen Alltag etabliert ist (Kapitel 1.1.8.3) und noch weiter erforscht wird (Gawinecka et al. 2010, Mulugeta et al. 2011, Perrin et al. 2011). In Kapitel 1.1.8.3 wurden bereits die wichtigsten Demenzmarker vorgestellt, die im Liquor nachgewiesen werden können.

Liquor ist eine für das ZNS sehr spezifische Flüssigkeit, die eine geringe totale Proteinmenge enthält und von den Plexus choroidei in den Seitenventrikeln produziert wird. Vorteilhaft ist, dass eine geringe Flüssigkeit-Organ-Ratio vorliegt, die es wahrscheinlich macht, im Liquor hohe Konzentrationen freigesetzter Proteine oder Peptide zu finden. Der Flüssigkeitstransport von Rückenmark und Gehirn in den Liquor erfolgt in großen Mengen, was bedeutet, dass Moleküle verschiedener Größen gleichwohl im Liquor detektiert werden können. Von Nachteil ist die vergleichsweise aufwändige Lumbalpunktion, die zur Gewinnung dieser Körperflüssigkeit notwendig ist, und die es recht schwierig macht, eine große Anzahl geeigneter Patientenproben und passende Proben gesunder Individuen zu akquirieren (Good et al. 2007).

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, folgende Fragen zu untersuchen:

- Gibt es ein charakteristisches Liquorproteomprofil bei Patienten mit Lewy-Körperchen-Demenz?
- Welche zellbiologischen Funktionsbereiche des ZNS scheinen bei der DLB betroffen zu sein?
- Eignen sich die detektierten Liquorproteomveränderungen zu differentialdiagnostischen Abgrenzungen gegenüber anderen neurodegenerativen Erkrankungen? Welche Überschneidungen und Unterschiede gibt es bei den detektierten regulierten Proteinen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Patientenkollektiv, Probenkollektion und -asservierung

Das in dieser Arbeit betrachtete Patientenkollektiv setzt sich zusammen aus Patienten der Abteilung Neurologie der Göttinger Universitätsmedizin und Patientenproben, die der Göttinger Prionforschungsgruppe von externen deutschen Krankenhäusern zu diagnostischen Zwecken zugesandt wurden. Alle für das initiale Proteomprofiling durch zweidimensionale Gelelektrophoresen und nachfolgende Untersuchungen herangezogenen Patienten mit DLB wurden anhand der von McKeith begründeten Konsensuskriterien als klinisch wahrscheinliche Fälle eingestuft. Für nachfolgende Bestätigungstests ausgewählter regulierter Proteine mittels Western Blots wurden des Weiteren jeweils minimal acht Patienten mit DLB, AD (Klassifizierung basierend auf den Kriterien des National Institute of Neurological Disorders and Stroke, der Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences (NINDS-AIREN), des National Institute of Neurological and Communicative Disorders and der Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA, McKhann et al. 1984)) beziehungsweise PD (als Krankheitsfall eingestuft nach den klinischen Diagnosekriterien der UK Parkinson's Disease Society Brain Bank (Hughes et al. 1992)) untersucht und mit nicht-dementen Patienten ohne ZNS-Erkrankungen verglichen. Letztere wurden zum Beispiel aufgrund von Kopfschmerzen, Polyneuropathien oder Somatisierungsstörungen zu ausschlusdiagnostischen Zwecken lumbalpunktiert.

Die verwendeten humanen Liquorproben wurden mittels Lumbalpunktion unter sterilen Bedingungen gewonnen. Sie wurden *post punctioem* aliquotiert und bei minus 80°C eingefroren. Die Untersuchungen an dem zu laborwissenschaftlichen Zwecken asservierten humanen Probenmaterial wurden von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen positiv bewertet (Antragsnummer 36/7/02).

### 2.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den üblichen Herstellern für Laborchemikalien bezogen.

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Sigma-Aldrich (München)
Ammoniumbikarbonat	Sigma-Aldrich (München)
Ammoniumperoxidsulfat	Roth (Karlsruhe)
Ampholyte	Bio-Rad (München)
Ampuwa <sup>®</sup> -Wasser	Fresenius Kabi (Bad Homburg)
Bovines Serum-Antigen	Roth (Karlsruhe)
Bromophenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich (München)
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich (München)
CHAPS	Bio-Rad (München)
Dithiothreitol	Merck (Darmstadt)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Formaldehyd-Lösung	Sigma-Aldrich (München)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Iodacetamid	Bio-Rad (München)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Luminol	Sigma-Aldrich (München)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)

---

Mineralöl	Bio-Rad (München)
Natriumazid	Sigma-Aldrich (München)
Natriumcarbonat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich (München)
PBS	Biochrom (Berlin)
p-Coumarsäure	Sigma-Aldrich (München)
Roti®-Load	Roth (Karlsruhe)
Rotiphorese® Gel 40	Roth (Karlsruhe)
Silbernitratlösung	Merck (Darmstadt)
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (München)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Thiourea	Sigma-Aldrich (München)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Tris-HCl	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (München)
Trypsin	Promega (Madison, WI, USA)
Tween-20	Merck (Darmstadt)
Urea	Roth (Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid	Merck (Darmstadt)

---

*Tabelle 2.1: Chemikalien.*

### 2.1.3 Verwendete Kits

IgY-12 High Capacity Spin Column Proteome Partitioning Kit (Beckmann Coulter, Krefeld)

IgY-12 High LC2 Column Proteome Partitioning Kit (Beckmann Coulter, Krefeld)

2-D Quant Kit (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)

CyDye DIGE Fluor, minimal labelling kit (5nmol) (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)

### 2.1.4 SDS-PAGE-Proteinstandard

- 1) Precision Plus Protein™ Unstained Standards (Bio-Rad, München)
- 2) Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad, München)

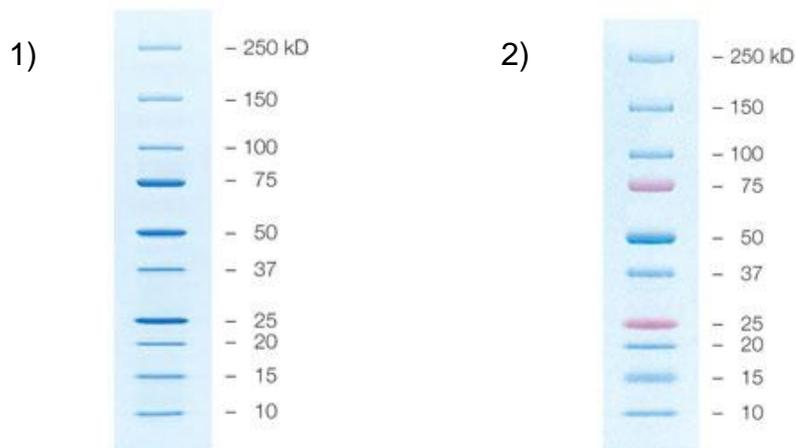


Abbildung 2.1: [www.biorad.com](http://www.biorad.com)

### 2.1.5 Antikörper

Für die Immunblots wurden die unten aufgeführten ersten und zweiten Antikörper in den beschriebenen Konzentrationen verwendet.

Beschreibung	Spezifikation	Verdünnung	Hersteller
Anti-Contactin-1	Kaninchen polyklonal	1:500	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-C4a	Kanichen monoklonal	1:500	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Chromogranin A	Kaninchen polyklonal	1:1.500	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Transthyretin	Kaninchen polyklonal	1:40.000	Abcam (Cambridge, UK)

*Tabelle 2.2:* Erste Antikörper.

Beschreibung	Spezifikation	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG	Maus, human adsorbed	1:7.500	Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)
Anti-Kaninchen IgG	Ziege	1.10.000	Jackson Immuno-Research (West Grove, PA, USA)

*Tabelle 2.3:* Zweite Antikörper.

### 2.1.6 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Automatischer Prozessierer	BioLane™ HTI	Höle und Hüttner AG (Tübingen)
Filmprozessor (med.)	Konica SRX-101A	Konica (Taiwan)
Flüssigkeitschromatograph	LC-10AS	Shimadzu (Japan)
ESI-Q-TOF	Ultima Global (coupled with CapLC System)	Micromass (Manchester)
Gelkammern	Mini Protean® II™	Bio-Rad (München)
	Protean® II xi	Bio-Rad (München)
Horizontalschwenker	HS 501	IKA Labortechnik (Straufen)
	MTS 2	IKA Labortechnik (Straufen)
IEF-Gerät	Protean® IEF Cell	Bio-Rad (München)
Inkubator	Hybridization Oven/Shaker	Amersham Biosciences (Freiburg)
Magnetrührer	RCT	IKA-Combimag (Straufen)
Nephelometer	DOSASCAT	Dosatec (Gilching)
pH-Meter	MP-220	Mettler Toledo (Steinbach)
Pipetten	Pipetus® Akku	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
	Reference®, Research®	Eppendorf (Hamburg)
Power Supply	PowerPac™ 200	Bio-Rad (München)
	PowerPac™ 3000	Bio-Rad (München)
Spectrophotometer	Ultrospec 2100 <i>pro</i>	GE Healthcare (Freiburg)
Semi-Dry Transfer System	Trans-Blot® SD	Bio-Rad (München)

Scanner	CanoScan 8400F	Canon (Krefeld)
	FLA-5100	Fujifilm (Düsseldorf)
Schweißgerät	Polystar 100 GE	Rische & Herfurth (Hamburg)
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Ultraschallwasserbad	Transsonic 310H	Elma® (Pforzheim)
Vakuumentrifuge	Speed Vac Concentrator, SVC 100	Savant Instruments (Farmingdale, NY, USA)
Vortexer	REAX 2000	Heidolph (Schwabach)
Waagen	BL 150 S	Sartorius (Göttingen)
	CP 3202 P	Sartorius (Göttingen)
Zentrifugen	5810R	Eppendorf (Hamburg)
	5415D	Eppendorf (Hamburg)

*Tabelle 2.4:* Laborgeräte.

### 2.1.7 Puffer und Lösungen

Zum Ansetzen der Puffer und Lösungen wurde destilliertes Wasser (dH<sub>2</sub>O) verwendet. Für die für zweidimensionale Gelelektrophoresen hergestellten Puffer und Lösungen wurde stets doppeltdestilliertes (ddH<sub>2</sub>O) oder Ampuwa®-Wasser benutzt.

Äquibrierungslösung I: 6M Urea, 2% SDS, 30% Glycerin, 150mM Tris pH 8,8, 2% DTT in ddH<sub>2</sub>O

Äquibrierungslösung II: 6M Urea, 2% SDS, 30% Glycerin, 150mM Tris pH 8,8, 2,5% IAA, Spuren von BPB in ddH<sub>2</sub>O

Aufbewahrungslösung für Proteindepletion: 10mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 0,02 Natriumazid in ddH<sub>2</sub>O

Aufbewahrungslösung für Silberfärbung: 5% Essigsäure in ddH<sub>2</sub>O

BLOTTO (Blockierungslösung für Immunoblots): 5% Milchpulver in PBS-T

ECL-Lösung 1: 2,5mM Luminol, 0,4mM p-Coumarsäure, 0,1M Tris-HCl pH 8,5 in dH<sub>2</sub>O

ECL-Lösung 2: 0,018% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,1M Tris-HCl pH 8,5 in dH<sub>2</sub>O

Entwicklungslösung für Silberfärbung: 6% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,0185% Formaldehyd, 16µM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in ddH<sub>2</sub>O

Fixierungslösung für Silberfärbung: 50% Methanol, 12% Essigsäure in ddH<sub>2</sub>O

Laufpuffer für Elektrophorese (nach Lämmli): 192mM Glycin, 0,1% SDS, 25mM Tris-HCl in dH<sub>2</sub>O/ddH<sub>2</sub>O

Lysepuffer pH 8,5 für CyDyes: 7M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 30mM Tris, 5mM Mg(CH<sub>3</sub>COO) in ddH<sub>2</sub>O

Neutralisierungspuffer für Proteindepletion (10fach konzentriert): 1M Tris-HCl pH 8,0 in ddH<sub>2</sub>O

OKANO: 0,1M Tris-HCl pH 8,0, 0,2M NaCl, 0,5% Triton X-100, 0,1mM EDTA, 0,002% SDS, 0,1% BSA in dH<sub>2</sub>O

PBS-T (Waschlösung für Western Blots): 9,55g PBS, 0,1% Tween-20 in dH<sub>2</sub>O

Rehydrierungspuffer für Isoelektrofokussierung (einfach konzentriert): 7M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 65mM DTT, 0,2% Ampholyte in Ampuwa<sup>®</sup>-Wasser

Rehydrierungspuffer für Isoelektrofokussierung (zweifach konzentriert) für CyDyes: 7M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 130mM DTT, 0,4% Ampholyte in Ampuwa<sup>®</sup>-Wasser

SDS-Gel für zweidimensionale Elektrophorese: 0,367M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 12,5% Acrylamid, 0,1% APS, 0,026% TEMED in Ampuwa<sup>®</sup>-Wasser

SDS-Sammelgel für eindimensionale Elektrophorese: 0,49M Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 7,4% Acrylamid, 0,1% APS, 0,04% TEMED in dH<sub>2</sub>O

SDS-Trenngel für eindimensionale Elektrophorese: 0,37M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 12% Acrylamid, 0,1% APS, 0,04% TEMED in dH<sub>2</sub>O

Sensibilisierungslösung für Silberfärbung: 0,8mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in ddH<sub>2</sub>O

Silberfärbelösung: 0.2% AgNO<sub>3</sub>, 0.026% Formaldehyd in ddH<sub>2</sub>O

Stopplösung für Silberfärbung: 50% Methanol, 12% Essigsäure in ddH<sub>2</sub>O

Strippinglösung für Proteindepletion: 0,1M Glycin-HCl pH 2,5 in ddH<sub>2</sub>O

Strippinglösung für PVDF-Membranen: 0,2M NaOH in ddH<sub>2</sub>O

Transferpuffer für Immunoblots: 192mM Glycin, 20% Methanol, 25mM Tris-HCl pH 8,3 in dH<sub>2</sub>O

Verdaupuffer mit Trypsin: 1,25% Trypsin, 0,5% 1M CaCl<sub>2</sub>, 2,5% 1M Ammoniumbikarbonat in ddH<sub>2</sub>O

Verdaupuffer ohne Trypsin: 0,5% 1M CaCl<sub>2</sub>, 2,5% 1M Ammoniumbikarbonat in ddH<sub>2</sub>O

Verdünnungspuffer für Proteindepletion: 10mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl in ddH<sub>2</sub>O

### 2.1.8 Sonstige Materialien

Art	Artikel	Hersteller
ECL-Filme	ECL-Hyperfilm	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)
Coomassie-Färbelösung	Roti®-Blue	Roth (Karlsruhe)
Filter	Filtropur S plus 0.2	Sarstedt (Nümbrecht)
	Filtropur V50 0.2, 500ml Vakuumfilter	Sarstedt (Nümbrecht)
pH-Indikatorstreifen	colorpHast® pH 0-14	EM Science (Gibbstown, NJ, USA)
IPG-Streifen	ReadyStrip IPG Strips, pH 3-10 NL, 7cm und 17cm	Bio-Rad (München)

PVDF-Transfermembran	Amersham Hybond™-P	Amersham Biosciences (Freiburg)
Zentrifugenfilter	Amicon® Ultra-15 Microcon® 0,5	Millipore (Schwalbach/Ts.) Millipore (Schwalbach/Ts.)

---

*Tabelle 2.5: Sonstige Materialien.*

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Proteindepletion

Da die in besonders hohem Vorkommen repräsentierten Liquorproteine (z.B. Albumin, Immunglobuline vor allem der Gammafraktion, Haptoglobin oder Fibrinogen) einen sehr großen und noch dazu dynamischen Anteil des Gesamteiweißes ausmachen (Ahmed et Rice 2005), können diese in der angewandten Technik der 2D-Gelelektrophorese die gering konzentrierten Proteine überdecken, die primär für das Vergleichen der humanen Proben von Interesse sind. Eine Depletion dieser sehr reichlich in den zu untersuchenden humanen Bioproben vorkommenden Proteine ermöglicht eine nachgeschaltete, überlagerungsfreie Analyse, verbesserte Detektierbarkeit und Identifikation auch der in sehr niedriger Konzentration vorhandenen Proteine. Die Methode der Proteomfraktionierung konzentriert sich dabei auf eine Bindung der Zielproteine mit hoher Affinität zu den verwendeten Antikörpern und damit der Möglichkeit einer Anreicherung und verbesserten Analysierbarkeit der durchfließenden Fraktion.

Die verwendeten Kits zur Partitionierung des Liquorproteoms basieren auf Affinitätsäulen, die durch die Interaktion zwischen polyklonalen, an Kunstharze gebundenen Hühnerantikörpern mit IgY-Antigenen und optimierten, physiologischen Puffern zur Auftragung der Proben, zum Waschen, Eluieren und Regenerieren funktionieren. So können zwölf in hoher Menge in menschlichen Körperflüssigkeiten vorkommende Proteine (Albumin, IgG,  $\alpha$ 1-Antitrypsin, IgA, IgM, Transferrin, Haptoglobin,  $\alpha$ 1-Azid Glykoprotein (Orosomukoid),  $\alpha$ 2-Makroglobulin, HDL (Apolipoproteine A-I & A-II) und Fibrinogen), die IgY-Antigene, durch Bindung an immobilisierte spezifische IgY-Antikörper entfernt werden, wenn biologische Proben die Säule passieren.

Diese Methode garantiert eine Depletion der Zielproteine von mindestens 90 bis 99 Prozent, die quantitativ vom Hersteller (Beckmann Coulter, Krefeld) mittels ELISA bestimmt wurde.

### **2.2.1.1 Proteindepletion mit dem IgY-12 High Capacity Spin Column Proteome Partitioning Kit**

Das IgY-12 High Capacity Spin Column Proteome Partitioning Kit (Beckmann Coulter, Krefeld) basiert auf Zentrifugation und hat eine Kapazität von 500µl. Die zu untersuchende Liquorprobe besitzt im Gegensatz zu anderen Körperflüssigkeiten bereits die für eine Verwendung der Säule benötigte Molarität und wurde bei Bedarf bis zum benötigten Volumen mit Verdünnungspuffer (10mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl in ddH<sub>2</sub>O) verdünnt. Vor dem Auftragen der Probe wurde die Säule bei 400 x g für 30Sek. zentrifugiert, um trockene, an Mikroperlenpolymere gebundene Antikörper zu erhalten, die vorher zur Lagerung in Verdünnungspuffer aufbewahrt waren. Die Liquorprobe wurde in die mit den Antikörpern besetzte Säule pipettiert, 15Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 400 x g für 30Sek. zentrifugiert. Die IgY-gebundenen Zielproteine verblieben dabei in der Säule und die durchgeflossene Eluatfraktion wurde gesammelt. In einem nachfolgenden Waschschrift mit Verdünnungspuffer wurden die in der Säule verbliebenen, nicht gebundenen Proteine nochmals eluiert, bei 400 x g für 30Sek. zentrifugiert und ebenfalls aufgefangen. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit Strippinglösung von der Säule gelöst, indem sie 3Min. mit dieser bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 400 x g für 30Sek. zentrifugiert wurden. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal durchgeführt, die Deplatate wurden anschließend entweder für nachgeschaltete Analysen gesammelt oder aber verworfen. Die gesammelte Depletatfraktion wurde jeweils mit 10x Neutralisierungspuffer neutralisiert. Zur Neutralisation der Säule wurde diese für 5Min. bei Raumtemperatur mit 1x Neutralisierungspuffer inkubiert und die Mikroperlenpolymere danach mit 400 x g für 30Sek. herunterzentrifugiert. Die Perlen wurden in reinem Verdünnungspuffer beziehungsweise zur Aufbewahrung von mehr als sieben Tagen in Verdünnungspuffer mit 0,02% Natriumazid resuspendiert und bei 4°C gelagert.

### 2.2.1.2 Proteindepletion mit dem IgY-12 High LC2 Column Proteome Partitioning Kit

Die 2ml-Säule des IgY-12 High Capacity LC2 Proteome Partitioning Kit nutzt die Methode der Flüssigkeitschromatografie (Liquid Chromatography, LC) zur Separation und Fraktionskollektion der depletierten und eluierten Proteine und ist vom Aufbau identisch zur IgY-12 High Capacity Spin Column (SC). Für dieses System wurden Puffer (Verdünnungs-, Stripping-, Neutralisierungs- und Aufbewahrungspuffer beziehungsweise -lösungen) der gleichen Zusammensetzung wie für das beschriebene IgY-12 High Capacity SC Proteome Partitioning Kit verwendet. Die Lösungsmittelleitung des Flüssigkeitschromatographen (Shimadzu, Japan) wurde mit Hilfe der Instruktion des verwendeten Systems festgelegt und der LC-Zeitablauf nach modifizierten Herstellerangaben konfiguriert (Tabelle 2.6). Wie bei der oben beschriebenen Durchführung der Proteindepletion mit dem IgY-12 High Capacity Spin Column Proteome Partitioning Kit wurden auch hier mit maschineller Unterstützung Proben der Säule zugeführt, die Eluatfraktion in mehreren Schritten ausgewaschen, die gebundenen Proteine von den Antikörpern gelöst und die Säule regeneriert. Der maximale Druck, dem die Säule während dieser Prozesse ausgesetzt werden sollte, betrug 6bar und der zulässige Bereich der Durchflussgeschwindigkeit lag bei 0,1-1ml/Min. Die Absorption der Peaks der Eluat- sowie der Depletatfraktion wurde bei 280nm gemessen.

Zyklus	Zeit (Min.)	Verdünnungs-puffer	Stripping-lösung	Neutralisierungs-puffer	Flussrate (ml/Min.)
Einspritzung					
Waschen	0	100	0	0	0.1
Waschen	10.01	100	0	0	0.2
Waschen	17.01	100	0	0	1.0
Stripping	22.01	0	100	0	1.0
Neutralisierung	36.01	0	0	100	1.0
Re-äquilibration	42.01	100	0	0	1.0
Stopp	60.00				

Tabelle 2.6: LC-Methode für 6,4 x 63mm LC2-Säule.

## **2.2.2 Probeneinengung nach erfolgter Proteindepletion**

Durch Zentrifugation mit 13.200rpm bei 20°C wurden die mittels IgY-12 High Capacity LC2 Proteome Partitioning Kit fraktionierten 2ml Probenmengen mit 10kDa Amicon Filtern auf ein Endvolumen von circa 200µl eingengt. Nach Verwendung des IgY-12 High Capacity Spin Column Proteome Partitioning Kits war keine weitere Volumeneinengung der Proben vor einer Proteinbestimmung und nachfolgenden Präzipitation nötig.

## **2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte jeweils nach der Fraktionierung und eventuellen Konzentration der Liquorproben und wurde mit zwei verschiedenen Methoden je nach Art der Proben ermittelt. Dabei wurde für exakte Konzentrationsbestimmungen der depletierten Proben das 2-D Quant Kit verwendet, das auch in niedrigen Proteinkonzentrationsbereichen und bei einem geringen zur Verfügung stehenden Mengenvolumen zuverlässige Ergebnisse liefert. Um die Konzentrationen der nativen Liquorproben zu bestimmen, wurde das im Neurochemischen Labor des Universitätsklinikums Göttingen für Routineuntersuchungen üblicherweise benutzte Dosascat-Nephelometer verwendet.

### **2.2.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem 2-D Quant Kit**

Die Proteinkonzentrationen der Eluat- und Depletatfraktionen der Liquorproben wurden jeweils mit dem 2-D Quant Kit (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) bestimmt. Alle Messungen wurden wie vom Hersteller beschrieben vorgenommen.

Mit dem 2-D Quant Kit ist im Bereich von 0-50µg Protein unter Verwendung von etwa 1-50µl Probenvolumen eine exakte Konzentrationsbestimmung möglich, die durch gute Kompatibilität mit Reagenzien für die Probenaufbereitung (2% SDS, 1% DTT, 8M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 2% Pharmalyte und 2% IPG-Puffer), insbesondere für hochauflösende Elektrophorese-Techniken Vorteile bietet.

Das verwendete Verfahren beruht auf einer Kombination aus Präzipitant und Co-Präzipitant zur quantitativen Proteinpräzipitation, bei der interferierende Substanzen

in Lösung bleiben. Das durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 5Min. erzeugte Pellet aus präzipitiertem Protein wurde in einer alkalischen Lösung aus Kupfer(II)-Ionen resuspendiert. Ungebundenes Kupfer wurde zur Reaktion mit kolorimetrischem Agens (Working Color Reagent besteht aus dem Verhältnis Color Reagent A:Color Reagent B = 100:1) gebracht und die Extinktion nach 15minütiger Inkubation bei Raumtemperatur bei 480nm mit dem Ultrospec 2100 *pro* Spektralphotometer gemessen. Die Proteinkonzentration verlief umgekehrt proportional zur optischen Absorption und wurde anhand einer Eichreihe mit BSA als Standardprotein ermittelt.

### **2.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit Dosascat-Nephelometer**

Schon ab einer Gesamtproteinkonzentration von 20mg/l lässt sich nach H. Reiber mit dem Dosascat-Streulichtphotometer die Eiweißbestimmung einer Flüssigkeit durchführen. Da diese Methode nicht von der Aminosäurezusammensetzung oder der Form der Proteine abhängt und unempfindlich gegenüber biochemischen Reagenzien ist, ist sie kaum störanfällig. Das Prinzip der Nephelometrie oder Streulichtphotometrie als optisches Analyseverfahren beruht dabei auf der Messung des seitlich austretenden Streulichts, das in einem Winkel von 70 bis 90 Grad zu dem in den Probenraum eintretenden Lichtstrahl gemessen wird.

Bei der Durchführung der Proteinkonzentrationsmessung erfolgte zunächst die Zugabe der Reagenzlösung aus einem Dispenser, danach das Einsetzen der Reagenzlösung in den Probenraum des Gerätes und schließlich das Zudosieren der Probe in die Küvette. In jede der Probenküvetten wurde außerdem ein kleiner Magnetrührstab eingesetzt, um eine gleichmäßige Durchmischung der Probe sowie eine schnelle Fällungsreaktion der Proteine zu erreichen. Nach automatischer Messung konnte jeweils die Gesamtproteinkonzentration abgelesen werden. Vor jeder Messreihe wurde das Gerät mit einem Proteineichstandard kalibriert (<http://www.dosatec.de/dosascatTech.htm>).

### **2.2.4 Proteinpräzipitation**

Zur maximalen Konzentration der Proteinproben und gleichzeitiger Entfernung störender Pufferlösungen und Salze wurden diese mit einem Dreifachen des Probenvolumens eines Aceton-Methanol-Gemischs (Verhältnis Aceton:Methanol =

8:1) überschichtet und bei minus 20°C über Nacht gelagert. Zur Abtrennung der Substanzen von den Proteinen wurden die Gemische 20Min. bei 4°C 13.200rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Darauf folgend wurden die Proben nochmals ultrakurz zentrifugiert und der Überstand mit Mikropipetten restlos entfernt. Nachdem das Proteinpellet 3Min. an der Luft getrocknet wurde, wurde es je nach anschließender Verwendung in Rehydrierungspuffer (für die erste Dimension der 2D-Gelelektrophorese) oder in Lysepuffer (bei Proteinmarkierung mit CyDyes) resuspendiert.

## **2.2.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese**

Bei der zweidimensionalen (2D) Gelelektrophorese werden komplexe Proteingemische, wie sie in Körperflüssigkeiten vorliegen, orthogonal zueinander mittels isoelektrischer Fokussierung nach isoelektrischem Punkt und anschließender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Molekulargewicht hochauflösend getrennt.

### **2.2.5.1 Vorbereitung der Proben für die zweidimensionale Gelelektrophorese**

Für die Durchführung der Experimente wurden ReadyStrip™ IPG strips (pH 3-10 NL, nonlinearer Gradient) mit einer Länge von 17cm von Bio-Rad verwendet. Die Menge Protein, mit der der IPG-Streifen beladen wurde, variierte nach Art der im Anschluss an die zweidimensionale Gelelektrophorese geplanten Markierungsbeziehungsweise Färbemethode (je 20,5µg Protein pro CyDye bei Verwendung von CyDye DIGE Fluor Minimal Dyes und anschließender Silberfärbung, das heißt 61,5µg Protein pro Gel, oder 200µg Protein pro Gel für eine kolloidale Coomassie-Färbung). Unabhängig davon wurde auf jeden Streifen ein Endvolumen von 330µl gegeben, das aus einfach konzentriertem Rehydrierungspuffer bestand, in dem das nach Aceton-Methanol-Präzipitation entstandene Proteinpellet resuspendiert wurde.

Nach einstündiger Inkubation des in Rehydrierungspuffer resuspendierten Proteinpellets bei Raumtemperatur wurde der Gelstreifen mit 2,5ml Mineralöl (Bio-Rad) beschichtet und anschließend die isoelektrische Fokussierung gestartet.

### 2.2.5.2 Gießen der Gele

Das Herstellen der 12,5%igen Gele erfolgte bereits am Vortag bis maximal drei Stunden vor der Verwendung. Es wurden 17cm breite Gele aus 0,367M Tris-HCl pH=8,8, 0,1% SDS, 12,5% Acrylamid, 0,1% APS, 0,026% TEMED in Ampuwa®-Wasser gegossen.

### 2.2.5.3 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

In der ersten Dimension wurden die Proteine nach ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt separiert. Der isoelektrische Punkt eines Proteins ist als der pH-Wert definiert, an dem seine Nettoladung und seine elektrophoretische Beweglichkeit gleich null sind, und wird durch seine sauren und basischen Aminosäurereste bestimmt.

Man spricht von der ersten Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese als der isoelektrischen Fokussierung der Proteine, da sie nach Anlegen von Spannung exakt bis zu dem pH-Wert im elektrischen Feld wandern, der ihrem isoelektrischen Punkt entspricht. Dazu wurden immobilisierte pH-Gradienten (IPG) benutzt, die auf einem Gelstreifen bestehend aus einer Polyacrylamidmatrix fixiert wurden. Die Puffer sind hierbei Polyacrylamidderivate mit den Eigenschaften schwacher Säuren beziehungsweise Basen, die durch kovalente Bindungen an die Polyacrylamidmatrix einen dauerhaft stabilen pH-Gradienten schaffen (Bjellqvist et al. 1982).

Die Rehydratation wurde in der Protean IEF cell von Bio-Rad durchgeführt. Zur Verbesserung des Eintritts der Proteine höheren Molekulargewichts in den IPG wurde eine aktive Rehydratation mit 50V über 12Std. bei Raumtemperatur durchgeführt. Daran anschließend wurde das in Tabelle 2.7 beschriebene Isofokussierungsprogramm befolgt.

Programmstufe	Spannung [V]	Spannungsanstieg	Dauer [Std.]	Dauer [Vh]
1	500	schnell	1	
2	1.000	schnell	1	
3	5.000	langsam	2	
4	8.000	schnell		60.000

Tabelle 2.7: Fokussierungsprogramm für IPG-Strips, 17cm Länge.

#### **2.2.5.4 Äquilibrierung der IPG-Gel-Streifen**

Nach Beendigung der isoelektrischen Fokussierung und vor der SDS-PAGE wurde eine zweischrittige Äquilibrierung der IPG-Streifen durchgeführt. Dazu wurde ein Äquilibrierungspuffer verwendet, dem jeweils verschiedene Agentien hinzugefügt wurden, um die Disulfidbrücken der Proteine zunächst zu reduzieren und dann Schwefelgruppen zu alkylieren.

In einem ersten Schritt wurde als reduzierendes Agens 2% Dithiothreitol (DTT) zu dem Äquilibrierungspuffer gegeben und die IPG-Streifen damit 20Min. auf einem Horizontalschwenker äquilibriert. Darauf folgte ein zweiter Äquilibrierungsschritt mit dem alkylierenden Reagens 2,5% Iodacetamid (IAA) zum Blocken der Schwefelgruppen. Dazu wurden die IPG-Streifen wiederum 20Min. in Äquilibrierungspuffer geschwenkt, dem zuvor IAA und Bromphenolblau (BPB) zugesetzt worden waren.

#### **2.2.5.5 Zweite Dimension: SDS-PAGE**

Mit dieser elektrophoretischen Methode wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht und keiner anderen physikalischen Eigenschaft aufgetrennt.

Die äquilibrierten IPG-Streifen (17cm) wurden auf einem vertikalen 12,5%igen Polyacrylamidgel (20cm) platziert und unter Wasserkühlung bei 90V eine Stunde und bei 120V über Nacht laufen gelassen, bis die mit BPB markierten Proteine den Unterrand des Gels erreicht hatten.

Als Proteinstandard wurde der Precision Plus Protein™ Unstained Standards (Bio-Rad) verwendet. Dieser besteht aus zehn scharfen, unveränderlichen Banden (10-250kDa), von denen drei hochintense Banden (25, 50 und 75kDa) als Bezugsbanden vorhanden sind und deren Migrationsverhalten sich in einem Laemmli SDS-PAGE Puffersystem immer identisch verhält. Für die 2D-Gele, die nur mit Coomassie gefärbt wurden, wurden pro Gel 5µl Proteinstandard (Precision Plus Protein™ Unstained Standards (Bio-Rad)) auf Filterpapier verwendet. Bei Anwendung von CyDye DIGE Fluor minimal Dyes wurden 3µl Proteinstandard pro Gel nach vorheriger Zugabe von jeweils 1µl Dy2, Dy3 und Dy5 auf 20µl Recombinant Unstained Protein Standard eingesetzt.

Nach einer Proteinmarkierung mit CyDye Fluor minimal Dyes wurden die Gele nach der SDS-PAGE unverzüglich mit dem FLA-5100 (Fujifilm) gescannt und anschließend mit Silberfärbung gefärbt. Gele, die mit 200µg Gesamtprotein beladen waren, wurden mit Coomassie gefärbt.

### 2.2.5.6 Färbemethoden für Polyacrylamidgele

Je nach beabsichtigter Art der Auswertung beziehungsweise späterer Verwendung der Gele wurden diese nach abgeschlossener zweidimensionaler Elektrophorese unterschiedlichen Färbemethoden unterzogen.

#### 2.2.5.6.1 CyDye DIGE Fluor Minimal Dyes

Eine Proteinmarkierung mittels CyDye Fluor minimal Dyes (GE Healthcare) vor der zweidimensionalen Gelelektrophorese eignet sich besonders bei der Untersuchung von Proben sehr niedriger Konzentration und vermindert darüber hinaus die Gel-zu-Gel Variationen, die bei herkömmlichen Färbetechniken Probleme bei der Datenauswertung bereiten. Alle drei CyDye Fluor minimal Dyes (Cy2, Cy3, Cy5) gleichen sich in Masse, Anwendung und Wirkweise (Tabelle 2.8) und geben eindeutige Signale, die eine hohe Präzision bei der 2D-DIGE Analyse und vor allem im Hinblick auf Protein Spot Matching und Quantifizierung ermöglichen.

Fluor	Fluorescence color	Max. absorption wavelength (nm)	Max. fluorescence wavelength (nm)	Molar extinction co-efficient (approx.)	Molecular weight added to protein (M <sub>r</sub> )
Cy2	Green	491	509	135.000	434
Cy3	Orange	553	569	133.000	466
Cy5	Red	645	664	217.000	464

*Tabelle 2.8:* Charakteristika der CyDye DIGE Fluor minimal Dyes ([www.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.com)).

Als Kern der DIGE-Technologie erlaubt die spezifische chemische Zusammensetzung der Dyes drei komplexe Proteinproben zu multiplexieren und sie auf einem einzigen Gel aufzutragen. Zwei Proteinproben werden dabei mit einem internen Standard verglichen, der üblicherweise aus einem Pool des gesamten zu

untersuchenden Materials besteht. Dies macht es gleichen Proteinen der drei Proben möglich, zu derselben Position auf einem 2D Gel zu migrieren, da sie zu gleichen Konditionen die erste und zweite Dimension der Elektrophorese durchlaufen. Zur Durchführung der Proteinmarkierung mit CyDye Fluor minimal Dyes wurde das modifizierte Protokoll des Herstellers verwendet. Da CyDyes lichtempfindlich sind, wurden alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte im Dunkeln durchgeführt.

Zunächst wurde die Gebrauchslösung hergestellt, wobei der 1mM CyDye stock (bestehend aus je 5nmol in 5µl DMF gelösten CyDyes) 1:10 mit DMF auf 100pmol verdünnt wurde. Das nach Aceton-Methanol-Präzipitation entstandene Proteinpellet (20,5µg Protein) wurde in 10µl Lysepuffer pH 8,5 resuspendiert, nach Zugabe von je 1µl CyDye der Gebrauchslösungen kurz herunterzentrifugiert und anschließend 30Min. auf Eis inkubiert. Für diese Reaktion ist ein pH von 8,5 essentiell, deshalb wurde der pH-Wert aller Proben vor der Inkubation mit pH-Streifen (EM Science) gemessen und gegebenenfalls mit HCl angepasst. Um die Reaktion zu stoppen, wurden je 1µl 10mM Lysine zugegeben, das Gemisch kurz gevortext, zentrifugiert und für 10Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proteinproben mit 10µl 10mM zweifach konzentriertem Rehydrierungspuffer ebenfalls für 10Min. auf Eis inkubiert. In einem letzten Schritt vor der Isoklassierung wurde jeder Probe 89µl einfach konzentrierter Rehydrierungspuffer hinzugefügt, alle Proben wurden zusammenpipettiert und ein Totalvolumen von 330µl, das drei verschiedene Proteinproben enthielt, auf den IPG-Streifen gegeben.

#### **2.2.5.6.2 Silberfärbung**

Mittels sensitiver Silberfärbung im Anschluss an die SDS-PAGE kann unter optimalen Bedingungen 0,5-1ng Protein pro Spot sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurden die Gele lediglich nach der Proteinmarkierung mit CyDyes mit der Silberfärbung gefärbt, wobei ein nach Blum modifiziertes Protokoll verwendet wurde (Bum et al. 1987). Zunächst wurden die Gele für 1,5Std. in Fixierungslösung fixiert und dann zweimal in 50%igem Ethanol und einmal in 30%igem Ethanol für 20Min. gewaschen. Die Sensibilisierung der Gele erfolgte für 60Sek. in Sensibilisierungslösung. Darauf folgten drei kurze Waschschrte mit ddH<sub>2</sub>O für je 20Sek., bevor die Gele für 20Min. in der Silberlösung gefärbt wurden. Nach dem Färben erfolgten wiederum drei kurze Waschschrte mit ddH<sub>2</sub>O für je 20Sek., danach konnten die Gele entwickelt werden. Dazu wurden sie bis zur Sichtbarwerdung der

Proteinspots in Entwicklungslösung inkubiert, wobei dieser Prozess mit der Stopplösung nach circa 2-3Min. gestoppt wurde (sobald die gewünschte Spotintensität erreicht war). Während des gesamten Färbevorgangs wurden die Gele konstant mit dem Horizontalschwenker HS 501 (IKA Labortechnik) bewegt.

### **2.2.5.6.3 Kolloidale Coomassie-Färbung**

Gele, die zur Identifikation der vorher mittels Delta 2D-Software detektierten und als relevant eingestuft Proteinspots verwendet wurden, wurden mit kolloidaler Coomassie-Färbung im Anschluss an die zweite Dimension der Elektrophorese blau gefärbt. Die Coomassie-Färbung macht Proteinspots ab einer Menge von 40ng sichtbar und zeichnet sich durch besondere Kompatibilität mit der massenspektrometrischen Proteinidentifikationsmethode ESI-Q-TOF aus.

Für die Kolloidale Coomassie-Färbung wurde die Roti®-Blue Färbelösung (Roth) verwendet, die vor Gebrauch mit Ethanol (400ml auf 1l) und mit ddH<sub>2</sub>O (40ml auf 1l) gemischt wurde. Nach einer Inkubation der Gele über Nacht wurde die überschüssige Färbung derselben mit 20% Ethanol, 5% Essigsäure in ddH<sub>2</sub>O ausgewaschen und die Gele bis zur weiteren Verwendung in 5%iger Essigsäure in ddH<sub>2</sub>O aufbewahrt.

### **2.2.6 Tryptischer In-Gel-Verdau**

Vor der massenspektrometrischen Analyse wurden die ungetrockneten, Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgele zunächst für 30Min. in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Im Anschluss daran wurden unter sterilen Bedingungen die zu identifizierenden Spots mit dem Skalpell ausgeschnitten, die 1-2mm<sup>2</sup> großen Gelschnitte jeweils in sterile 0,5ml Eppendorf-Röhrchen überführt und anschließend für 15Min. mit je 50µl Ampuwa®-Wasser gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Gelstücke zunächst in 40µl 100mM Ammoniumbikarbonat (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) äquilibriert, nach 20Min. wurde dann den Eppendorf-Cups nochmals je 40µl ACN zugeführt und somit eine 1:1-Lösung erzeugt. Nach 15minütiger Inkubation und Verwerfen der flüssigen Überstände wurden die Gelschnitte mit dem SpeedVac SVC100 (Savant Instruments) unter Vakuumbedingungen bei mittlerer Hitze für 15Min. zentrifugiert und auf diese Art maximal getrocknet. Die getrockneten Proteinproben wurden dann auf Eis für 45Min.

durch 10-20µl Trypsinverdau-Lösung gut bedeckt rehydriert und danach in 20-60µl Verdaupuffer ohne Trypsin über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden nun die flüssigen Überstände (Eluatfraktion) eines jeden Eppendorf-Cups in einem neuen Röhrchen gesammelt und die verbliebenen Gelstücke mit 40µl TFA bedeckt. Die derart bedeckten Gelschnitte wurden dann für 30Min. in einem schwimmenden Probenständer dem Ultraschallwasserbad Transsonic 310H (Elma®) zugeführt und der Überstand anschließend mit der zuvor separierten Eluatfraktion gepoolt. Erst dann wurden die Gelstücke verworfen.

Die so extrahierten Peptidfragmente wurden abschließend mit dem SpeedVac SVC100 unter oben beschriebenen Bedingungen vollständig getrocknet, wobei auch die Überstände des TFA entfernt wurden, und dann der massenspektrometrischen Analyse zugeführt. Konnte diese nicht direkt im Anschluss an den Trypsinverdau erfolgen, wurden die Proteinpellets bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die getrockneten Peptidfragmente wurden zur Analyse in 0,1%iger Ameisensäure gelöst.

### **2.2.7 Identifikation der durch Trypsinverdau vorbereiteten Peptidfragmente mittels Massenspektrometrie**

Die Massenspektrometrie als Analyseverfahren zur Bestimmung chemischer Elemente oder Verbindungen eignet sich insbesondere auch zur Identifikation von Proteinen, die dazu im Vorfeld einer besonderen Vorbereitung bedürfen (tryptischer In-Gel-Verdau). Bei der Durchführung der massenspektrometrischen Analyse werden Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse gemessen, nachdem die zu untersuchende Substanz jeweils in die Gasphase überführt, dann ionisiert und im elektrischen Feld beschleunigt und der Teilchenstrahl zuletzt nach dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis gemessen wird. Dabei können schon sehr kleine Substanzmengen ab circa  $10^{-15}$ g nachgewiesen werden. Im vorliegenden Fall wurde ein sogenanntes Flugzeit-Massenspektrometer verwendet, welches sich zu Nutzen macht, dass die Ionen bei Eintritt in den Analysator die gleiche Energie haben und dementsprechend unterschiedliche Fluggeschwindigkeiten je nach vorliegender Größe registriert werden können.

Die massenspektrometrische Analyse der durch Trypsinverdau vorbereiteten Peptidfragmente wurde im Labor von PD Dr. rer. nat. A. R. Asif in der Abteilung für Klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen mittels ESI-Q-TOF Ultima Global (Micromass) durchgeführt. Die Erfassung der Daten erfolgte mit der MassLynx (Version 4.0) Software auf einem Windows NT PC, die weitere Prozessierung geschah mit dem Protein-Lynx-Global-Server (Version 2.1) (Micromass, Manchester, UK). Mittels Mascot Search Engine wurden die Proteine durch MSDB und Swiss Prot 2010\_11 Datenbanken identifiziert, wobei eine Peptidmasse und eine MS/MS Fragmentmassentoleranz von 0,5Da verwendet wurden. Die Suchkriterien schlossen eine erlaubte ausgelassene Trypsinspaltung und Proteinmodifikationen im Sinne von Methioninoxidation und Carbamidomethylcystein ein.

## **2.2.8 Western Blots nach ein- und zweidimensionaler SDS-PAGE**

Im Western Blot (WB) werden Proteine zunächst mittels elektrophoretischer Auftrennung in einer Trägermatrix (Polyacrylamidgel) separiert. Danach werden die Banden beziehungsweise Proteinmuster auf Membranen übertragen, indem senkrecht zu dem Gel ein elektrisches Feld angelegt wird. In diesem wandern die Proteine, bis sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen auf der Membranoberfläche haften bleiben.

### **2.2.8.1 Durchführung der eindimensionalen Gelelektrophorese für Western Blots**

Zunächst wurden kleine (8 x 10cm) zweiphasige Gele mit einer Dicke von 1,5mm im Mini Protean® II™ System (Bio-Rad) hergestellt. Dazu wurde als Erstes 12%iges Trenngel gegossen, das mit Wasser überschichtet 1Std. bei Raumtemperatur polymerisierte. Dann wurde das 7%ige Sammelgel mit zehn Probenaschen auf das Trenngel gegossen und ebenfalls für mindestens 30Min. polymerisieren gelassen. Für die Vorbereitung der Proben wurden 60µl von den jeweils mindestens acht Proben neurologisch gesunder Kontrollen, Patienten mit DLB, AD und PD ausgewählt und mit der Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von circa 30µl reduziert. Pro Gel wurden je Tasche nacheinander 7µl Proteinstandard (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad)) und dann die im Volumen eingeeengten Liquorproben von je zwei gesunden Kontrollen beziehungsweise Patienten einer

jeden Krankheitsgruppe verwendet. Das Befüllen der Geltaschen erfolgte mit einem Verhältnis von Probe zu Probenpuffer Roti®Load von 1:4 nach vorangegangener fünfminütiger Hitzebehandlung im Thermomixer (Eppendorf) bei 95°C zur Denaturierung der Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine und anschließender kurzer Zentrifugation bei 13.200rpm.

Die Elektrophorese lief in SDS-Laufpuffer nach Lämmli ab. Dabei wurde zunächst eine Spannung von 100V für 30Min. angelegt, worauf anschließend eine Spannung von 130V folgte, bis die Lauffront aus BPB aus der Roti®Load-Lösung den Unterrand des Trenngels erreicht hatte.

### **2.2.8.2 Durchführung der zweidimensionalen Gelelektrophorese für Western Blots**

Die zweidimensionale Gelelektrophorese für Western Blots erfolgte entsprechend des Protokolls aus Kapitel 2.2.5. Hier wurden jedoch kleinere Gele (8 x 10cm), 7cm lange IPG-Streifen sowie ein abweichendes Isofokussierungsprogramm (Tabelle 2.9) benutzt. Es wurden konstant 150µl Liquorvolumen verwendet, das wie oben beschrieben präzipitiert und in Rehydrierungspuffer resuspendiert wurde. Jeder IPG-Streifen wurde mit 150µl in Rehydrierungspuffer gelöstem Proteinpellet beladen. Die Elektrophorese lief dann analog zur Durchführung der eindimensionalen Gelelektrophorese ab, es wurden 7µl Proteinstandard (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad)) auf Filterpapier als Referenz zur korrekten Zuordnung der Proteinbanden zu einem Molekulargewicht aufgetragen.

Programmstufe	Spannung [V]	Spannungsanstieg	Dauer [Std.]	Dauer [Vh]
1	200	schnell	1	
2	500	schnell	1	
3	1.000	langsam	1,5	
4	8.000	schnell		30.000

*Tabelle 2.9:* Fokussierungsprogramm für IPG-Strips, 7 cm Länge.

### 2.2.8.3 Western Blots nach ein- beziehungsweise zweidimensionaler Gelelektrophorese

Nach Durchführung der ein- beziehungsweise zweidimensionalen Gelelektrophorese durch die jeweils oben beschriebenen Vorgehensweisen wurden die Gele zunächst geblottet. Dazu wurden Polyvinylidenfluoridmembranen (PVDF)-Membranen in der Größe der Gele zugeschnitten und 1Min. in Methanol getränkt, bis die Membranen tranzluzent erschienen. Damit wurde die Hydrophobizität aufgehoben und die PVDF-Membranen dadurch für wässrige Lösungen empfänglich gemacht. Daran anschließend wurden die Membranen in Transferpuffer äquilibriert. Die Gele und eine doppelte Anzahl Filterpapiere in korrespondierender Größe wurden ebenfalls in Transferpuffer gelegt und die Gele auf den gleichgroßen Membranen zwischen zwei Filterpapieren aufgeschichtet. Mittels Semidry Blotter (Bio-Rad) erfolgte die Übertragung des Expressionsprofils auf die PVDF-Membranen bei konstanten 12V für 1Std. Darauf folgte das Blocken in BLOTTO für 1Std. bei Raumtemperatur. Über Nacht wurden die Membranen mit dem ersten Antikörper bei 4°C inkubiert, am nächsten Tag wurden sie mit einem automatischen Prozessierer (BioLane™ HTI, Hölle und Hüttner AG) weiteren Waschschritten und der Inkubation mit dem korrespondierenden zweiten Antikörper zugeführt (Tabelle 2.10).

Programmstufe	Prozess	Lösung	Dauer [Min]
1	Waschen	PBS-T	3 x 10
2	Inkubation mit 2. Antikörper	2. Antikörper in BLOTTO	60
3	Waschen	PBS-T	15
4	Waschen	PBS-T	10
5	Waschen	OKANO	5
6	Waschen	PBS-T	3 x 5

*Tabelle 2.10:* Automatische Prozessierung nach Inkubation mit dem ersten Antikörper.

Nach Abschluss oben beschriebener Schritte wurde die Immunreaktivität nach Schwenken in Chemielumineszenzlösung (Verhältnis ECL-Lösung 1:ECL-Lösung 2 = 1:1) und anschließender Exposition zu ECL-Filmen (ECL-Hyperfilm, Amersham

Biosciences) mit dem Filmprozessor Konica SRX-101A (Konica) detektiert. Die Entwicklungszeit war je nach verwendeten Antikörpern unterschiedlich und schwankte zwischen 15Sek. und 2Min.

### **2.2.9 Statistische Analyse**

Bei der Proteinbestimmung mit dem 2-D-Quant Kit wurde die graphische Darstellung der Standardkurve und die Berechnung der Proteinkonzentration zu untersuchender Proben mit der Microsoft Office 2003 Excel Software durchgeführt.

Für die Auswertung der zweidimensionalen Polyacrylamidgele wurde das Programm Delta2D (DECODON, Greifswald) verwendet. Dabei wurden zunächst die Gelbilder aus den DIGE-Experimenten in Delta2D importiert und zu Replikatgruppen mit je vier Patientenproben und korrespondierenden Kontrollen zusammengestellt. Laufunterschiede zwischen den Spotmustern wurden ausgeglichen und eine einheitliche und repräsentative Spottedetektion konnte für das gesamte Projekt erzielt werden. In einem abschließenden Schritt wurden die Expressionsprofile dargestellt und die Spots benannt. Die Proteinregulation wurde als signifikant angesehen, wenn sie eine Veränderung um den Faktor zwei ergab sowie ein Signifikanzniveau von  $p < 0,5$  mit dem zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben erreicht war.

Die quantitative Analyse der Western Blots erfolgte mit ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, freie Software) und Sigma Plot 11.0 (Exact Graphs and Data Analysis). Unterschiede in der Proteinexpression wurden bei  $p$ -Werten  $< 0,5$  im Kruskal-Wallis ANOVA Test als signifikant angesehen.

### **3 Ergebnisse**

In dieser Arbeit wurde das Expressionsmuster des Liquorproteoms von Patienten mit Demenz mit Lewy-Körperchen mit dem nicht-dementer Kontrollen ohne Zeichen einer neurologischen Erkrankung des zentralen Nervensystems verglichen. Zur optimierten Darstellung der in geringem Vorkommen repräsentierten Proteine wurden die humanen Proben zunächst fraktioniert, um dann konzentriert vorliegend mit CyDyes markiert und anschließend mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt zu werden. Die bei der DLB hoch- oder herunterregulierten Proteine wurden massenspektrometrisch identifiziert und in funktionelle Gruppen eingeteilt. Einzelne interessante Proteine wurden weiterführend mit Western Blots untersucht.

#### **3.1 Charakteristika der Patientenauswahl und Liquorproben**

An die Patientenproben wurden die in den folgenden Tabellen (Tabellen 3.1 bis 3.5) dargestellten Anforderungen gestellt, dabei mussten die Patienten jeweils mindestens wahrscheinliche Diagnosekriterien der zugeordneten Krankheit erfüllen. Kontrollpatienten waren zum Beispiel zum Ausschluss von chronisch entzündlichen ZNS-Erkrankungen oder einer Meningeosis carcinomatosa, bei peripherer Fazialisparese oder Pseudodemenz bei Depression lumbalpunktiert worden. Es wurden nur Patienten als Kontrollen verwendet, bei denen eine neurologische Erkrankung mit zentraler Beteiligung ausgeschlossen worden war. Kontrollpatienten waren in Alter und Geschlecht mit den DLB-Patienten korreliert. Die korrespondierenden Liquorproben mussten die für die jeweiligen Methoden dieser Arbeit festgelegten Referenzbereiche einhalten, diese waren für die Untersuchungen mittels 2D-Elektrophorese als empfindlichere Methode strenger definiert als für die Western Blots, unter anderem mussten die für zweidimensionale Gelelektrophoresen verwendeten Proben spätestens 24 Stunden nach ihrer Gewinnung durch Lumbalpunktion aliquotiert und eingefroren werden.

Nr	Fall	Alter (Jahre)	Geschlecht	Krankheitsdauer zum Zeitpunkt der LP (Monate)	Gesamt-Tau <sup>a</sup> (pg/ml)	$\beta$ -Amyloid <sub>1-42</sub> <sup>b</sup> (pg/ml)
1	Wahrscheinliche DLB	62	M	n.b.	82	714
2	Wahrscheinliche DLB	70	W	2	331	747
3	Wahrscheinliche DLB	75	M	6	272	300
4	Wahrscheinliche DLB	79	W	6	529	280
5	Ausschluss TIA	66	M	-	n.b.	n.b.
6	Chronisches Schmerzsyndrom	67	W	-	n.b.	n.b.
7	Abduzensparese bei Diabetes mellitus	70	M	-	n.b.	n.b.
8	Gesund	79	W	-	117	1.184

*Tabelle 3.1:* Charakteristika der DLB- (Nr. 1 bis 4) und Kontroll-Patienten (Nr. 5 bis 8) für 2D-Gele. Alle vier DLB-Patienten erfüllten nach McKeith die Kriterien einer klinisch wahrscheinlichen DLB. Die Patienten und korrespondierenden Kontrollen waren nach Alter und Geschlecht korreliert. Das mittlere Alter der DLB-Gruppe betrug  $72 \pm 7$  Jahre, das mittlere Alter der Kontrollgruppe entsprechend  $71 \pm 7$  Jahre. Es gab in jeder Gruppe je zwei weibliche und zwei männliche Individuen. Die mittlere Erkrankungsdauer der DLB-Patienten zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion betrug  $4,7 \pm 2,3$  Monate. Das mittlere Gesamt-Tau für DLB-Patienten war  $304 \pm 184$ pg/ml, das mittlere  $\beta$ -Amyloid<sub>1-42</sub>  $510 \pm 255$ pg/ml. Werte für Gesamt-Tau und  $\beta$ -Amyloid<sub>1-42</sub> waren in der Kontrollgruppe nur für einen Patienten bestimmt worden. (LP Lumbalpunktion, TIA Transitorisch ischämische Attacke, M männlich, W weiblich, n.b. nicht bestimmt, a Grenzwert für AD für Gesamt-Tau:  $> 450$ pg/ml und Grenzwert für CJK für Gesamt-Tau:  $1300$ pg/ml, b Grenzwert für AD für  $\beta$ -Amyloid<sub>1-42</sub>:  $< 450$ pg/ml).

Fälle	Proteinkonzentration ( $\mu$ g/ml)	Laktat (mmol/l)	QAlb $\times 10^3$	Zellen/ $\mu$ l
DLB	$395 \pm 94$	$1,6 \pm 0,2$	$7,1 \pm 2,3$	$2 \pm 1$
Kontrollen	$336 \pm 39$	$1,9 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,2$	$1 \pm 1$

*Tabelle 3.2:* Allgemeine Liquorparameter der DLB- und Kontroll-Proben für 2D-Gele (für Referenzbereiche siehe Tabelle 3.3). Als Ausschlusskriterien zur Verwendung der Probe für 2D-Gelelektrophoresen wurden eine Zellzahl  $> 4$  und eine Gesamtproteinkonzentration  $> 550$  $\mu$ g/ml festgelegt. (QAlb Albuminquotient)

Referenzwerte	Proteinkonzentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Laktat ( $\text{mmol/l}$ )	QAIB $\times 10^3$	Zellen/ $\mu\text{l}$
	150-450	< 2,1	4+Alter/15	$\leq 4$

*Tabelle 3.3:* Referenzbereiche für allgemeine Liquorparameter (Laktat, QAIB und Zellen nach H. Reiber et al „Liquordiagnostik für Neurologen“ (www.horeiber.de)). (QAIB Albuminquotient)

Anzahl	Fälle	Mittleres Alter (Jahre)	Geschlecht	Krankheitsdauer	Gesamt-Tau <sup>a</sup> (pg/ml)	$\beta$ -Amyloid <sub>1-42</sub> <sup>b</sup> (pg/ml)
9 x	DLB	69 $\pm$ 6,5	1 x W, 8 x M	12,8 $\pm$ 9 Monate	330 $\pm$ 431	390 $\pm$ 222
8 x	AD	63,4 $\pm$ 8,9	6 x W, 2 x M	27 $\pm$ 19 Monate	1.013 $\pm$ 566	542 $\pm$ 170
8 x	PD	61,8 $\pm$ 6,6	4 x M, 4 x W	13,6 $\pm$ 7,9 Jahre	243 $\pm$ 159	681 $\pm$ 245
10 x	Kontrollen	69,5 $\pm$ 11,2	6 x W, 4 x M	-	n.b.	n.b.

*Tabelle 3.4:* Charakteristika der DLB-, AD-, PD- und Kontroll-Patienten für Western Blots. Aufgrund des zum Teil limitierten Probenvolumens wurden mehr als acht Liquorproben für jede Patientengruppe ausgewählt, jedoch wurden für die Western Blots zum individuellen Nachweis der Regulation einzelner Proteine jeweils genau acht Proben einer Gruppe verwendet. (M männlich, W weiblich, n.b. nicht bestimmt, a Grenzwert für AD für Gesamt-Tau: > 450pg/ml und Grenzwert für CJK für Gesamt-Tau: 1300pg/ml, b Grenzwert für AD für  $\beta$ -Amyloid<sub>1-42</sub>: < 450pg/ml).

Fälle	Proteinkonzentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Laktat ( $\text{mmol/l}$ )	QAIB $\times 10^3$	Zellen/ $\mu\text{l}$
DLB	512 $\pm$ 98	1,5 $\pm$ 0,2	6,6 $\pm$ 5,2	1 $\pm$ 1
AD	464 $\pm$ 159	n.b.	n.b.	0 $\pm$ 0
PD	414 $\pm$ 174	n.b.	n.b.	n.b.
Kontrollen	384 $\pm$ 108	1,7 $\pm$ 0,2	5,3 $\pm$ 1,8	1 $\pm$ 1

*Tabelle 3.5:* Allgemeine Liquorparameter der DLB-, AD-, PD- und Kontroll-Proben für Western Blots. Es gab keine Ausschlusskriterien bezüglich oben genannter Liquorparameter, da stets ein definiertes Probenvolumen zur Durchführung der Western Blots verwendet wurde und diese weiterführenden Versuche nahezu unter den Bedingungen erfolgen sollten, wie sie im Klinikalltag vorliegen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden nur für solche Parameter bestimmt, wenn in einer Gruppe die Werte von mindestens drei Patienten zuverlässig vorlagen oder bestimmbar waren. (n.b. nicht bestimmt, QAIB Albuminquotient).

### 3.2 Proteindepletion

Um eine bessere Beurteilbarkeit derjenigen Proteine im Liquor zu erzielen, die physiologisch in nur geringer Konzentration darin vorhanden sind, wurde zunächst eine Immundepletion der zwölf Proteine durchgeführt, die in hoher Konzentration im Liquor vorliegen. Zu diesen Proteinen gehören Albumin, IgG, IgA, IgM,  $\alpha$ 1-Antitrypsin, Transferrin, Haptoglobin,  $\alpha$ 1-Azid Glykoprotein (Orosomukoid),  $\alpha$ 2-Makroglobulin, HDL, Apolipoproteine A-I & A-II und Fibrinogen (Abbildung 3.1).

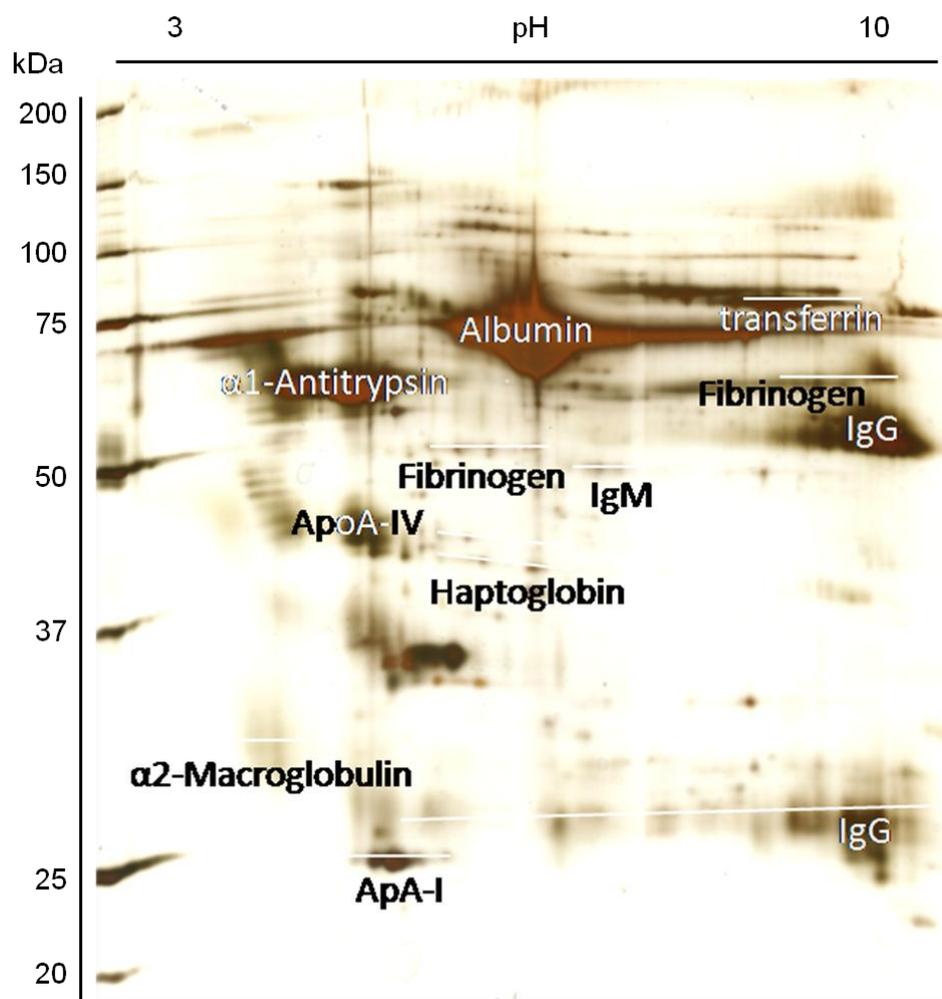
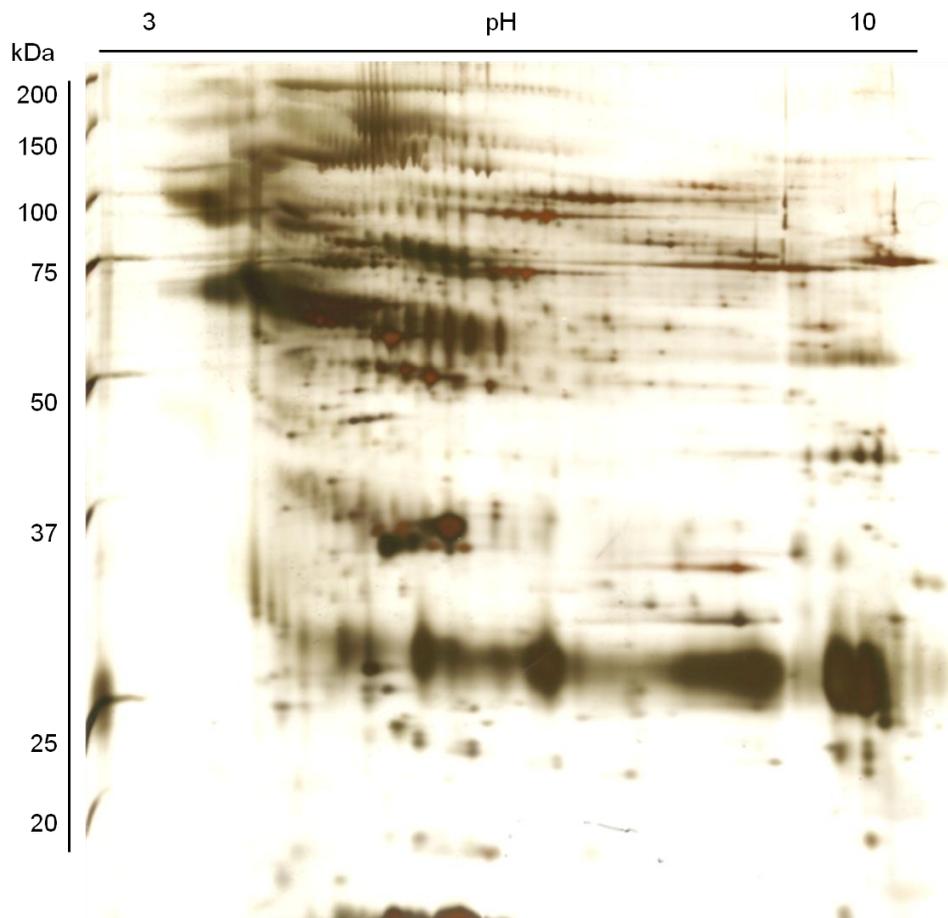


Abbildung 3.1: Proteinexpressionsmuster der Proteine, die in hoher Konzentration im Liquor vorkommen und mittels Immundepletion von dem restlichen Liquorproteom getrennt wurden (Silberfärbung). Die hier dargestellte Proteinfraktion wurde nicht für weiterführende Analysen verwendet.

Die mit dieser Methode gewonnene Fraktion der übrigen Proteine wurde im Volumen eingengt und mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese weitergehend untersucht (Abbildung 3.2).

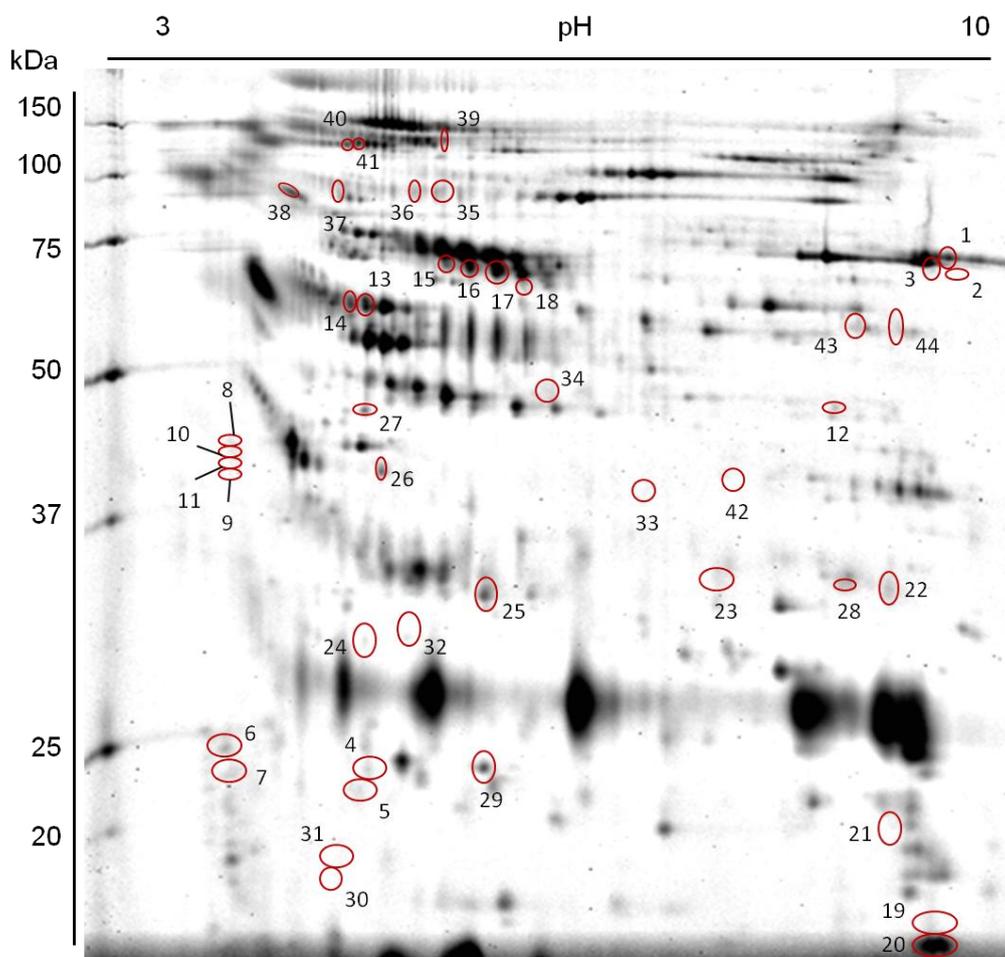


*Abbildung 3.2:* Proteinexpressionsmuster der Proteine, die in nur geringer Konzentration im Liquor vorkommen und durch Immundepletion von zwölf häufigen Proteinen isoliert wurden (Silberfärbung). Die hier dargestellte Proteinfraction wurde nach Volumeneinengung für weiterführende Analysen mittels 2D-Gelelektrophorese verwendet.

### 3.3 Proteomanalyse – generelle Beobachtungen

Das Proteinexpressionmuster des depletierten Liquors von vier Patienten mit DLB wurde mit dem von vier zentralneurologisch gesunden Kontrollpatienten verglichen. Insgesamt wurden mittels Delta2D's 100%igem Spotmatching (Decodon, Greifswald) 1978 Proteinspots im Expressionsprofil des Liquors von DLB-Patienten detektiert. Davon waren 44 Spots (2,2%) signifikant reguliert (mit einer jeweiligen Änderung der Expression um mindestens den Faktor zwei und einem Signifikanzniveau von  $p <$

0,5), 35 davon hochreguliert (79,5%) und 9 (20,5%) herunterreguliert. Abbildung 3.3 zeigt die Lokalisationen der 44 regulierten Proteinspots im 2D-Gel. Massenspektrometrisch konnten 37 dieser Spots (84,1%) identifiziert werden, korrespondierend zu 23 verschiedenen Proteinen. Von diesen waren 20 (87%) nur hoch- und zwei (8,7%) nur herunterreguliert, bei einem Protein (4,3%) waren je eine Isoform hoch- und eine herunterreguliert. Aufgrund zu geringer Konzentration war bei sieben Proteinspots keine Identifikation möglich.



*Abbildung 3.3:* Beispielhaftes 2D-Proteinexpressionsmuster der Eluatfraktion des depletierten Liquors eines DLB-Patienten (Proteinmarkierung mittels CyDye Fluor minimal Dyes (GE Healthcare)). Die densitometrische und statistische Analyse der zweidimensionalen Gele ergab 44 signifikant regulierte Proteinspots bei der DLB im Vergleich zu gesunden Kontrollen. 37 MS-identifizierte Spots waren korrespondierend zu 23 verschiedenen Proteinen. Die Nummerierung der Proteinspots entspricht der aus Tabelle 3.6.

Eine Übersicht der bei DLB regulierten Proteine gibt die Tabelle 3.6, in der die Nummerierung der Spots analog zu Abbildung 3.3 erfolgte. Proteine wurden nach Regulierungsgrad geordnet, zunächst wurden dabei hoch- dann herunterregulierte Proteine aufgeführt. Am Ende der Tabelle finden sich das eine sowohl hoch- als auch herunterregulierte Protein und schließlich die nicht identifizierten Proteinspots.

Nr.	Protein	Regulation		p-Wert	Datenbank- eintrag (UniProt)	MW (kDa)	pI	Score	Peptid- anzahl
40a	<i>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4*</i>	87,9	↑	0,025	Q14624	103	6,5	246	19
41a		60,1	↑	0,034					
40b	<i>Calsyntenin-1*</i>	87,9	↑	0,025	P094985	110	4,8	186	9
41b		60,1	↑	0,034					
1	Complement C4a	6,6	↑	0,020	P0C0L4	193	8,7	452	30
39	Complement C3	6,1	↑	0,042	P01024	187	6	156	20
11	Chromogranin A	4,9	↑	0,009	P10645	56	4,6	100	6
10		3,4	↑	0,028					
9		3,1	↑	0,026					
8		3	↑	0,018					
7		3,8	↑	0,003					
6		2,1	↑	0,029					
24	Prostaglandin-H2 D-isomerase	4,9	↑	0,004	P41222	21	7,7	56	2
21		2,5	↑	0,020				74	2
22		2,2	↑	0,008				118	3
23		2,1	↑	0,029				120	4
29	Glutathione peroxidase 3	4,4	↑	0,027	P22352	26	8,3	88	3
37	Prothrombin	4,1	↑	0,027	P00734	70	5,6	338	20
36	Contactin-1	3,6	↑	0,002	Q12860	113	5,6	63	6
25	Transthyretin	3,3	↑	0,012	P02766	16	5,3	649	8
12	Alpha-Enolase	3,1	↑	0,001	P06733	37	5,9	65	8
26	Apolipoprotein A-IV	3	↑	0,017	P06727	45	5,3	37	2
42	Fructose-bisphosphate aldolase C	2,7	↑	0,043	P09972	39	6,5	39	3
28	Insulin-like growth factor- binding protein 2	2,5	↑	0,041	P18065	35	7,5	209	7
38	Amyloid-like protein 1	2,4	↑	0,005	P51693	72	5,5	112	12
35	Gelsolin	2,3	↑	0,011	P06396	86	5,9	75	4
43	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	2,2	↑	0,047	P14618	58	7,8	265	17
5	Ganglioside GM2 activator	2,1	↑	0,025	P17900	21	4,8	65	1
4		2	↑	0,001				43	1
27	Pigment epithelium-derived factor	2,1	↑	0,024	P36955	46	6	241	11
34	N-acetyllactosaminide beta-1,3-N- acetylglucosaminyl- transferase	2	↑	0,039	Q43505	47	6,8	115	6
18	Serum albumin	0,43	↓	0,006	P02768	66	5,7	203	15
15		0,45	↓	0,007				610	35
16		0,46	↓	0,003				614	29
17		0,5	↓	0,005				426	19
13	Angiotensinogen	0,44	↓	0,002	P01019	53	5,6	60	3
14		0,5	↓	0,004					

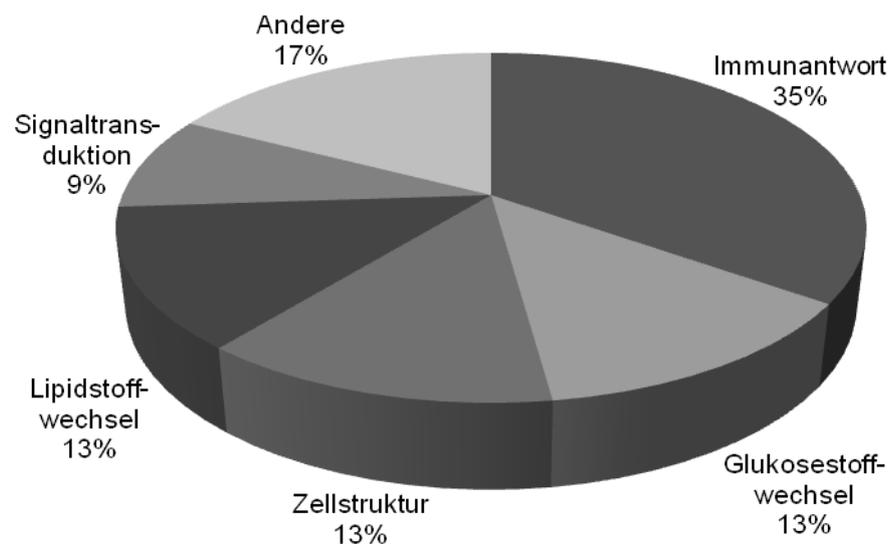
Nr.	Protein	Regulation		p-Wert	Datenbank- eintrag (UniProt)	MW (kDa)	pI	Score	Peptid- anzahl
20	Cystatin-C	2,6	↑	0,012	P01034	13	8,8	177	3
19		0,27	↓	0,025					
32	Keine Identifikation möglich	7,8	↑	0,011	-	-	-	-	-
30		3,8	↑	0,036	-	-	-	-	-
33		2,4	↑	0,036	-	-	-	-	-
31		2,3	↑	0,024	-	-	-	-	-
44		2	↑	0,039	-	-	-	-	-
2		0,2	↓	0,002	-	-	-	-	-
3		0,4	↓	0,007	-	-	-	-	-

*Tabelle 3.6:* Liste der bei DLB regulierten Proteine. Die Tabelle enthält die genauen Proteinbezeichnungen, Informationen zu Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt und die zugehörigen Zugangsdaten der Proteine zur UniProt-Proteindatenbank. Zudem ist der Faktor der Regulation der Proteinspots nach oben (↑) oder unten (↓) und das zugehörige Signifikanzniveau angegeben (Proteinspots wurden dann als typisch für DLB reguliert betrachtet, wenn die densitometrische Analyse eine Veränderung um mindestens den Faktor zwei ergab und ein Signifikanzniveau von  $p < 0,5$  mit dem zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben erreicht war). Die Peptidanzahl gibt die Anzahl der resultierenden Peptide an, die sich aus der Sequenzierung ergaben. Der Score repräsentiert, wie gut die massenspektrometrisch gemessenen Daten mit dem ihnen zugeordneten Protein in Übereinstimmung gebracht werden konnten. \* Bei den Proteinspots mit den Nummern 40a und 41a sowie 40b und 41b war nicht eindeutig determinierbar, welches Protein (Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 oder Calsyntenin-1) mit welchem Spot korrespondierte. Bei einem hohen MW ist die Trennung der Proteine im 2D-Gel nicht so effizient wie bei solchen mit niedrigerem MW, so dass eine zweifelsfreie Zuordnung der Spots 40 und 41 zu einem eindeutigen Protein in diesem vorliegenden Fall nicht möglich war. Beide Proteine erzielten jedoch hohe Scores bei der massenspektrometrischen Identifikation und hatten ähnlich hohe Molekulargewichte, so dass bei den vorliegenden massenspektrometrischen Daten davon auszugehen ist, dass beide Proteine jeweils zu einem dieser zwei stark hochregulierten Spots korrespondieren. (Nr Nummer, MW Molekulargewicht, pI isoelektrischer Punkt).

Die Tabelle 3.6 enthält Informationen zu den regulierten Proteinspots, den Bezeichnungen der korrespondierenden Proteine, der jeweiligen Regulation nach oben (↑) oder unten (↓) und ihres Signifikanzniveaus im zweiseitigen t-Test für unverbundene Stichproben ( $p$ -Wert). Aufgelistet sind außerdem die Zugangsdaten der einzelnen Proteine zur UniProt-Proteindatenbank ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) sowie die zugehörigen Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte. Die Angabe von

Peptidanzahl und Score bezieht sich auf die massenspektrometrische Identifikation der Proteine. Der Score, der den Grad der Übereinstimmung der gemessenen Daten mit dem zugeordneten Protein wiedergibt, lag bei allen Proteinen bei minimal 37. Je höher der Score, umso sicherer war dabei davon auszugehen, dass das identifizierte Protein korrekt bestimmt worden war.

19 der bei DLB regulierten Proteine ließen sich in fünf verschiedene funktionelle Gruppen einteilen (Abbildungen 3.4 und 3.5): Acht Proteine beteiligt an der Immunantwort (35%), drei Proteine beteiligt am Glukosestoffwechsel (13%), drei Proteine beteiligt am Fettstoffwechsel (13%), drei Proteine beteiligt an Prozessen die Zellstruktur betreffend (13%) und zwei Proteine mit Einfluss auf Signaltransduktionskaskaden (9%). Vier Proteine (17%) ließen sich diesen Gruppen nicht zuordnen und wurden unter „Andere“ zusammengefasst.



*Abbildung 3.4:* Biologische Funktionen der bei DLB regulierten Proteine. Insgesamt wurden diese fünf verschiedenen Gruppen zugeordnet: Proteine beteiligt an Immunantwort, Lipidstoffwechsel, Glukosestoffwechsel, Signaltransduktion und Zellstruktur. Proteine, die sich diesen funktionellen Gruppen nicht zuordnen ließen, wurden unter „Andere“ zusammengefasst.

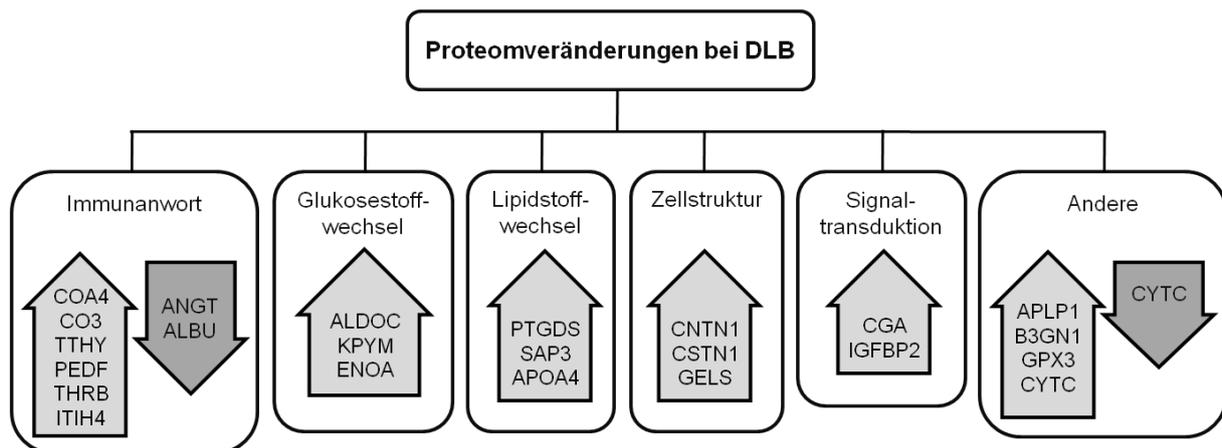


Abbildung 3.5: Proteomveränderungen bei DLB. Übersicht über funktionelle Gruppen und Regulationen (hoch und herunter) der zugehörigen Proteine.

Für vier der im Liquor von DLB-Patienten regulierten Proteine wurden Western Blots durchgeführt, um ihre Regulation zusätzlich mit einer auch im klinischen Alltag unkompliziert anwendbaren Methode nachzuweisen. Die Auswahl dieser vier Proteine wurde unter anderem anhand ihrer bereits beschriebenen Assoziationen mit neurodegenerativen Erkrankungen und ihres Regulationsgrades getroffen. Western Blots wurden angefertigt für Complement C4a (CO4A), Transthyretin (TTHY), Contactin-1 (CNTN1) und Chromogranin A (CGA).

### 3.4 Im Liquor von DLB-Patienten regulierte Proteine

#### 3.4.1 Proteine mit Einfluss auf die Immunantwort

Zu der Gruppe der acht Proteine involviert in die Immunantwort und Akute-Phase-Reaktion gehörten CO4A, Complement C3 (CO3), TTHY, Pigment epithelium-derived factor (PEDF), Prothrombin (THRB), Angiotensinogen (ANGT), Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 (ITIH4) und Serum albumin (ALBU). Ein um den Faktor 6,6 hochregulierter Proteinspot war korrespondierend zu CO4A, einem Aktivator des klassischen Weges des Komplement-Systems. CO3 ist ebenfalls ein Aktivator des Komplementsystems und war in dieser Arbeit 6,1fach bei DLB hochreguliert. Das Protein TTHY, das als Transportprotein des Thyroxins fungiert, wurde ebenfalls aus einem einzelnen Proteinspot identifiziert und war im 2D-Gel bei DLB um den Faktor 3,3 hochreguliert. PEDF ist ein neurotrophisches Protein und ein potenter Inhibitor

der Angiogenese, der sich bei DLB 2,1fach hochreguliert darstellte. Das Protein THRB wurde aus einem bei DLB 4,1fach hochregulierten Proteinspot identifiziert. THRB ist insbesondere beteiligt an Prozessen der Akuten-Phase-Reaktion und der Blutgerinnung. ANGT war im 2D-Gel korrespondierend zu zwei um die Faktoren 0,44 und 0,5 herunterregulierte Proteinspots. Als Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ist ANGT an der Regulation des Blutdrucks beteiligt und hat zudem viele weitere Funktionen in unterschiedlichsten biologischen Prozessen. Einer der zwei am höchsten (über 60fach) regulierten Proteinspots war korrespondierend zu ITIH4, wobei nicht eindeutig zu determinieren war, welcher Spot (Nummer 40 oder 41) als ITIH4 und welcher als Calsyntenin-1 zu identifizieren ist. Beide Spots waren aufgrund ihrer Nähe zueinander gemeinsam aus dem Gel geschnitten und der massenspektrometrischen Identifikation zugeführt worden. Das Protein ITIH4 ist ebenfalls an Reaktionen der Akuten-Phase beteiligt. Aus vier herunterregulierten Proteinspots (0,43, 0,45-, 0,46-, und 0,5fach) wurde ALBU identifiziert. ALBU ist das Hauptplasma protein und hält den Kolloidosmotischen Druck aufrecht. Es bindet unter anderem Elektrolyte, Hormone, Fette, Bilirubin und Medikamente.

### **3.4.2 Proteine beteiligt am Glukosestoffwechsel**

Am Glukosestoffwechsel beteiligt sind Fructose-bisphosphate aldolase C (ALDOC), Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (KPYM) und Alpha-Enolase (ENOA). ALDOC war im Liquor der DLB-Patienten 2,7fach hochreguliert. Dieses Protein katalysiert folgende Reaktion: D-fructose 1,6-bisphosphate = glycerone phosphate + D-glyceraldehyde 3-phosphate (Arakaki et al. 2004). KPYM ist ein glykolytisches Enzym, das den Transfer einer Phosphorylgruppe von Phosphenolpyruvat auf ADP katalysiert, um so ATP zu erzeugen. Dieses Protein war korrespondierend zu einem Spot im 2D-Gel und bei DLB um den Faktor 2,2 hochreguliert. ENOA war bei DLB höchst-signifikant 3,3fach hochreguliert. Dieses multifunktionelle Enzym spielt vor allem eine Rolle in der Glykolyse und daneben in weiteren Prozessen wie der Wachstumskontrolle, Hypoxietoleranz und allergischen Reaktionen. Als Plasminogenaktivator nimmt es an Prozessen des intravaskulären und perizellulären fibrinolytischen Systems teil (Pancholi 2001).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in den Glukosestoffwechsel involvierten Proteine allesamt eine signifikante Hochregulation zeigten.

### **3.4.3 Proteine beteiligt am Lipidstoffwechsel**

Die Proteine Prostaglandin-H2 D-isomerase (PTGDS), Ganglioside GM2 activator (SAP3) und Apolipoprotein A-IV (APOA4) wurden der Gruppe von Proteinen zugeordnet, die in den Fettstoffwechsel involviert sind. PTGDS katalysiert die Konversion von Prostaglandin H2 zu Prostaglandin D2. Vier Proteinspots korrespondierend zu PTGDS waren bei DLB jeweils um die Faktoren 4,9, 2,5, 2,2, und 2,1 hochreguliert. SAP3 findet sich in Lysosomen, bindet Ganglioside und stimuliert den Abbau von Ganglioside GM2. In dieser Arbeit fanden sich zwei Proteinspots, die als SAP3 identifiziert wurden und im Liquor bei DLB 2,1-beziehungsweise 2fach hochreguliert waren. APOA4 ist im 2D-Gel des Liquors von DLB-Patienten 3fach hochreguliert. Dieses Protein bindet und transportiert Fette, hat zudem unter anderem antioxidative Fähigkeiten und ist auch in den Hirnmetabolismus involviert.

Auch in dieser Gruppe fand sich stets eine Hochregulation bei allen identifizierten Proteinen.

### **3.4.4 Proteine mit Einfluss auf die Zellstruktur**

CNTN1, Calsyntenin-1 (CSTN1) und Gelsolin (GELS) ließen sich in die Gruppe der Proteine beteiligt an der Organisation der Zellstruktur einteilen. Ein im 2D-Gel um den Faktor 3,6 hochregulierter Proteinspot wurde als CNTN1 identifiziert. Dieses Protein spielt eine Rolle beim Wachstum von Neuriten, neuronaler Differenzierung und beeinflusst Oligodendrozyten. Der zweite um mehr als 60fach hochregulierte Proteinspot wurde als CSTN1 identifiziert, eine genaue Determinierung des tatsächlich korrespondierenden Spots war jedoch nicht möglich (vergleiche hierzu auch Kapitel 3.4.1). CSTN1 ist als neuronales Transmembranprotein am anterograden axonalen Transport beteiligt. Das Protein GELS ist Calcium-reguliert und moduliert die Bildung von Aktin-Filamenten aus Monomeren sowie auch die

Auflösung bestehender Aktin-Filamente. In dieser Arbeit war GELS im Liquor von DLB-Patienten im 2D-Gel signifikant um den Faktor 2,3 hochreguliert.

### **3.4.5 Proteine beteiligt an Signaltransduktionskaskaden**

Zur Gruppe der Proteine, die in Prozesse der Signaltransduktion involviert sind, wurden CGA und Insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP2) zugeordnet. Die massenspektrometrische Analyse von sechs 4,9- bis 2,1fach signifikant hochregulierten Spots ergab CGA. CGA gehört zur Proteinfamilie der Sekretogranine und ist der Vorläufer verschiedener funktioneller Peptide wie Vasostatin-1 und -2 oder Pankreastatin. IGFBP2 bindet IGF und inhibiert so die durch diesen Faktor erzeugten Wachstums- und Entwicklungsraten. In dieser Arbeit zeigte sich IGFBP2 in den 2D-Gelen des Liquors von DLB-Patienten 2,5fach im Vergleich zu gesunden Kontrollen hochreguliert.

### **3.4.6 Andere bei DLB regulierte Proteine**

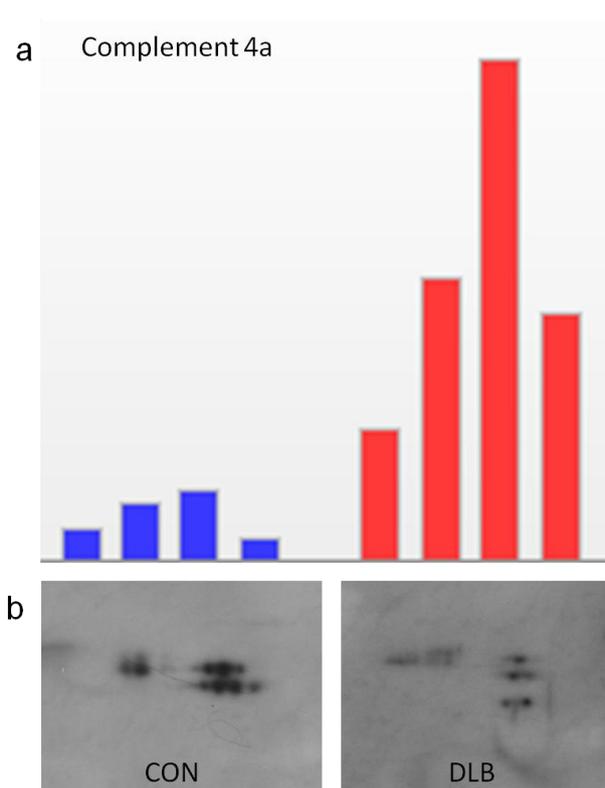
Die vier Proteine Amyloid-like protein 1 (APLP1), N-acetyllactosaminide beta-1,3-N-acetylglucosaminyl-transferase (B3GN1), Glutathione peroxidase 3 (GPX3) und Cystatin-C (CYTC) gehören zu den Proteinen, die sich nicht den oben dargestellten funktionellen Gruppen zuordnen ließen. APLP1 war im 2D-Gel bei DLB 2,4fach hochreguliert. Dieses vor allem im cerebralen Kortex exprimierte Protein gehört zu einer Gruppe von Proteinen (APP-Familie), die zum Beispiel in der Entwicklung der AD eine Rolle spielen. Das Protein B3GN1 war bei DLB 2fach hochreguliert. Es kann die Synthese oder Verlängerung des linearen poly-N-acetyllactosaminoglycans initiieren und ist relevant bei Prozessen der Entwicklung und der Onkogenese (Sasaki et al. 1997). GPX3 war korrespondierend zu einem 4,4fach hochregulierten Proteinspot im 2D-Gel. GPX3 gehört zur Glutathion-Peroxidase-Familie, schützt Zellen und Enzyme vor oxidativem Stress und hat damit auch eine neuroprotektive Funktion. Zwei Proteinspots wurden massenspektrometrisch als CYTC identifiziert, von diesen war einer signifikant hoch- (um den Faktor 2,6) und der andere herunterreguliert (um den Faktor 0,27). CYTC ist ein Protein, das Cysteinproteinasen inhibiert und so die Enzymaktivität reguliert.

### 3.5 Ergebnisse der 2D-Western Blots

Für ausgewählte Proteine mit Biomarkerpotential wurden exemplarisch jeweils ein 2D-Western Blot eines DLB-Patienten und ein 2D-Western Blot eines alters- und geschlechtskorrelierten Kontrollpatienten hergestellt, um die Lokalisation des Proteins in der zweidimensionalen Darstellung antikörpergestützt zu zeigen. Diese 2D-Western Blots wurden nicht statistisch ausgewertet.

#### 3.5.1 Complement C4a

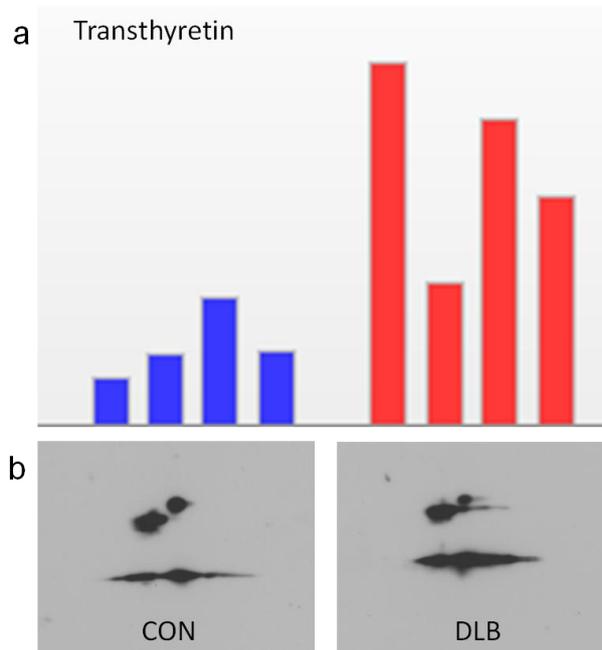
In der Abbildung 3.6 wird exemplarisch die densitometrische Analyse des 6,6fach hochregulierten Spots, der zu CO4A korrespondiert, dargestellt. Zur Veranschaulichung ist zusätzlich der 2D-Western Blot abgebildet.



*Abbildung 3.6:* a Densitometrische Analyse des 6,6fach hochregulierten Proteinspots korrelierend zu CO4A im 2D-Gel (Spot Nr. 1 aus Tabelle 3.6, blau Kontrollpatienten, rot DLB-Patienten). b Exemplarische Darstellung von CO4A im 2D-Western Blot (CON Kontrolle, DLB Demenz mit Lewy-Körperchen-Patient).

### 3.5.2 Transthyretin

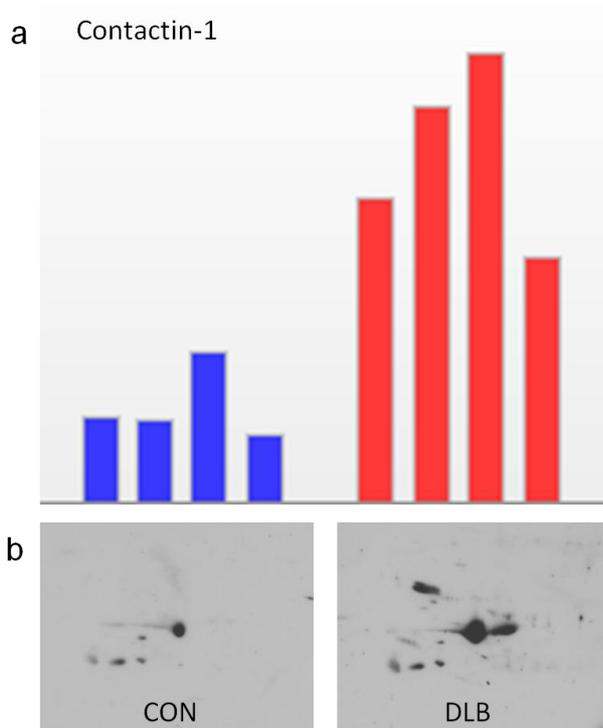
TTHY war korrespondierend zu einem Proteinspot und im 2D-Gel bei DLB um den Faktor 3,3 hochreguliert (Abbildung 3.7).



*Abbildung 3.7:* a Densitometrische Analyse des 3,3fach hochregulierten Proteinspots korrelierend zu TTHY im 2D-Gel (Spot Nr. 25 aus Tabelle 3.6, blau Kontrollpatienten, rot DLB-Patienten). b Exemplarische Darstellung von TTHY im 2D-Western Blot (CON Kontrolle, DLB Demenz mit Lewy-Körperchen-Patient).

### 3.5.3 Contactin-1

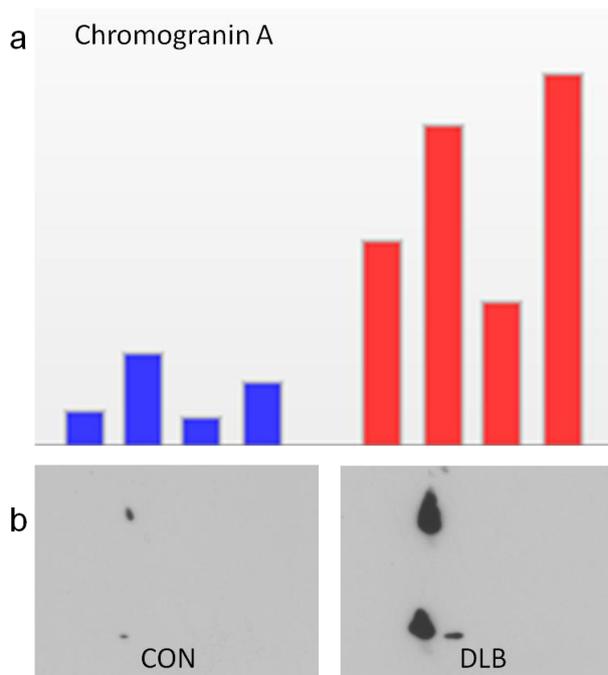
Ein im 2D-Gel um den Faktor 3,6 hochregulierter Proteinspot wurde als CNTN1 identifiziert (Abbildung 3.8).



*Abbildung 3.8:* a Densitometrische Analyse des 3,6fach hochregulierten Proteinspots korrelierend zu CNTN1 im 2D-Gel (Spot Nr. 36 aus Tabelle 3.6, blau Kontrollpatienten, rot DLB-Patienten). b Exemplarische Darstellung von CNTN1 im 2D-Western Blot (CON Kontrolle, DLB Patient mit Demenz mit Lewy-Körperchen).

### 3.5.4 Chromogranin A

Die massenspektrometrische Analyse von sechs 4,9 bis 2,1fach signifikant hochregulierten Spots ergab CGA. Abbildung 3.9 zeigt exemplarisch den am stärksten hochregulierten Proteinspot, der als CGA identifiziert wurde.



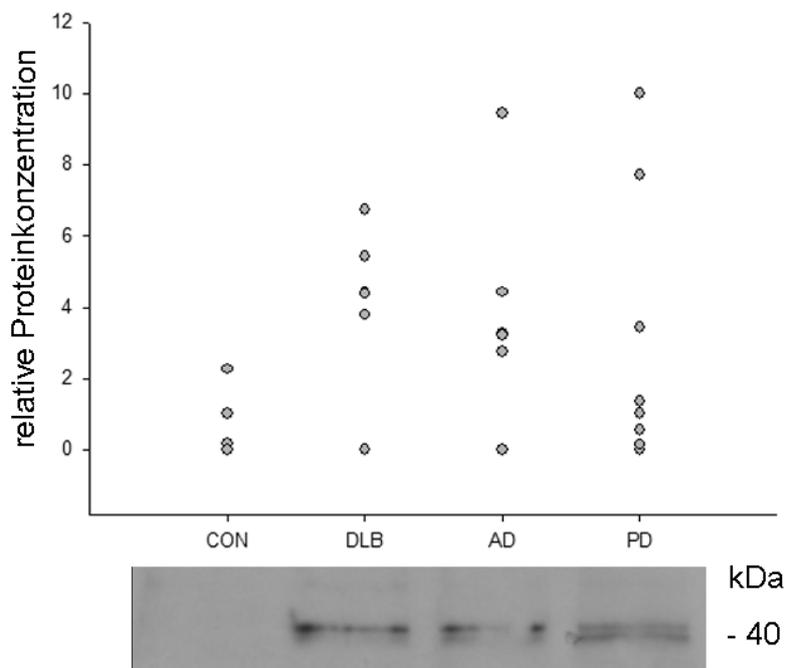
*Abbildung 3.9:* a Densitometrische Analyse des 4,9fach hochregulierten Proteinspots korrelierend zu CGA im 2D-Gel (Spot Nr. 11 aus Tabelle 3.6, blau Kontrollpatienten, rot DLB-Patienten). b Exemplarische Darstellung von CGA im 2D-Western Blot (CON Kontrolle, DLB Demenz mit Lewy-Körperchen-Patient).

### 3.6 Ergebnisse der Western Blots

Für weiterführende Bestätigungstests wurden vier Gruppen, bestehend aus jeweils acht zentralneurologisch gesunden Kontrollen, acht DLB-Patienten, acht AD-Patienten und acht PD-Patienten, im klassischen Western Blot untersucht und Proteinbanden densitometrisch analysiert.

### 3.6.1 Complement C4a

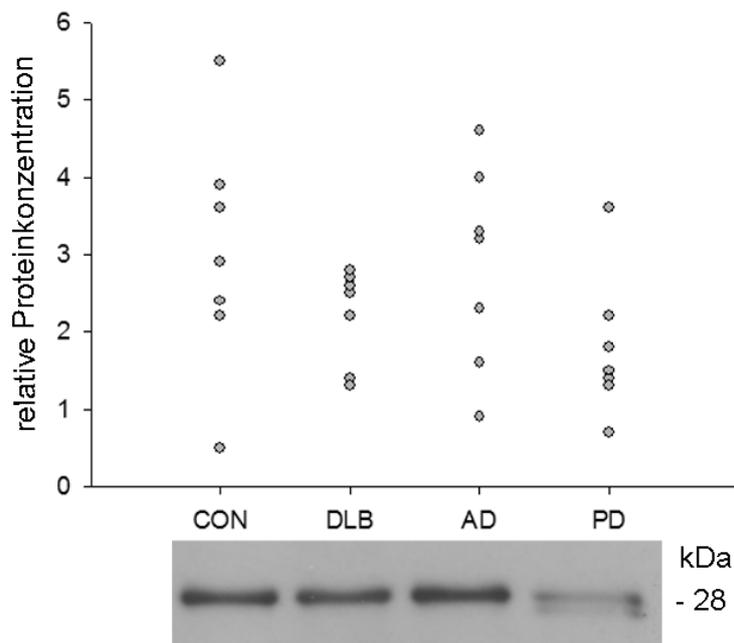
Im Western Blot von CO4A zeigte sich zwischen den vier Gruppen, bestehend aus zentralneurologisch gesunden Kontrollen, DLB-Patienten, AD-Patienten und PD-Patienten, keine statistisch signifikante Regulation. Es waren jedoch unterschiedliche Tendenzen erkennbar, die sich in der densitometrischen Analyse als eine Hochregulation bei DLB-Patienten um den Faktor 7,1 gegenüber gesunden Kontrollen berechnen ließ, nahezu gleiche densitometrische Verhältnisse ergaben sich im Vergleich zu AD-Patienten (1,1) und PD-Patienten (1,0). Im Vergleich zu gesunden Kontrollen war CO4A bei AD-Patienten um den Faktor 6,7 und bei den PD-Patienten um den Faktor 7,0 hochreguliert (Abbildung 3.10).



*Abbildung 3.10:* Densitometrische Auswertung der Western Blots von CO4A mit je acht Liquorproben der vier Gruppen, bestehend aus Kontrollen (CON), Patienten mit Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB), Alzheimer-Patienten (AD) und Parkinson-Patienten (PD). Im unteren Teil der Abbildung ist exemplarisch ein Western Blot dargestellt, der alle vier Gruppen zeigt. Es fand sich keine signifikante Regulation zwischen den unterschiedlichen Gruppen, jedoch lässt sich die Tendenz der Hochregulation bei DLB gegenüber gesunden Kontrollen erkennen. Auch bei AD- und PD-Patienten zeigte sich eine Tendenz der Hochregulation im Vergleich zu der zentralneurologisch gesunden Kontrollgruppe.

### 3.6.2 Transthyretin

In den Western Blots von TTHY kamen zwei separate Proteinbanden zur Darstellung, die jeweils den Dimeren (obere Bande, 28kDa) und Monomeren (untere Bande, 14kDa) von TTHY entsprachen. Bei der oberen Proteinbande zeigte sich keine signifikante Regulation zwischen den einzelnen Gruppen, jedoch kam es bei drei der acht Parkinson-Patienten zu einem Auftreten von Doppelbanden, die sich bei keinem Patienten der anderen Gruppen nachweisen ließen (Abbildung 3.11).



*Abbildung 3.11:* Densitometrische Auswertung der Western Blots der oberen Proteinbande von TTHY (entsprechend der Dimere von TTHY) mit je acht Liquorproben der vier Gruppen, bestehend aus Kontrollen (CON), Patienten mit Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB), Alzheimer-Patienten (AD) und Parkinson-Patienten (PD). Im unteren Teil der Abbildung ist exemplarisch ein Western Blot dargestellt, der alle vier Gruppen zeigt. Signifikante Unterschiede für die TTHY-Dimere zwischen den unterschiedlichen Gruppen zeigten sich nicht, bei DLB war das mittlere densitometrische Volumen 2,3, bei gesunden Kontrollen 3,1, bei AD 2,9 und bei PD 1,8. Bei drei der acht PD-Patienten zeigten sich Doppelbanden der oberen Proteinbande von TTHY, wie auch im exemplarischen Western Blot dieser Abbildung erkennbar ist. Diese Doppelbanden waren bei keinem anderen Fall einer anderen Patientengruppe erkennbar.

Bei der densitometrischen Auswertung der Western Blots der unteren Proteinbande von TTHY war bei DLB im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine signifikante

Hochregulation um den Faktor 1,6 nachweisbar (Abbildung 3.12). Des Weiteren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, es war jedoch die Tendenz erkennbar, dass die untere Proteinbande von TTHY auch bei AD und PD im Vergleich zu der zentralneurologisch gesunden Kontrollgruppe leicht hochreguliert war (für AD wurde der Faktor 1,2 berechnet, für PD der Faktor 1,3). Als durchschnittliche densitometrische Volumina ergaben sich für DLB 3,1, für gesunde Kontrollen 2,0, für AD 2,4 und für PD 2,5.

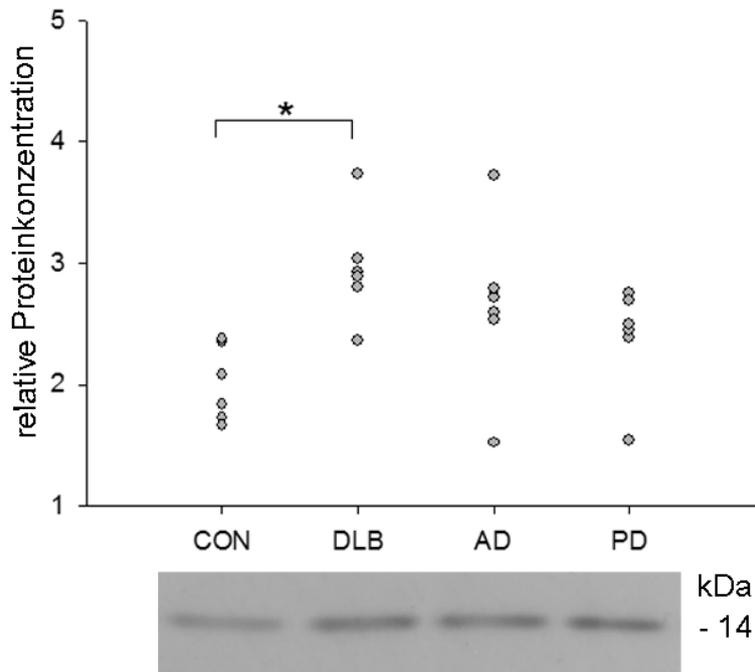
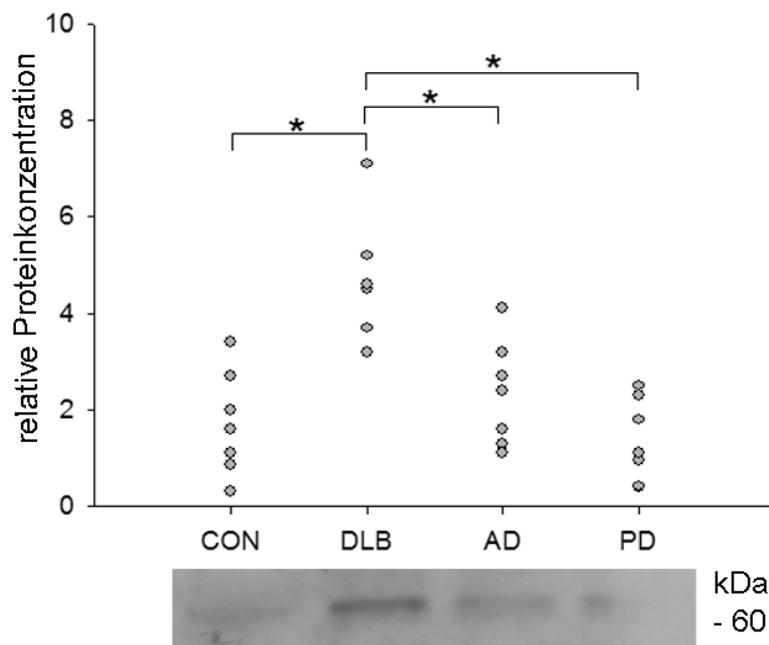


Abbildung 3.12: Densitometrische Auswertung der Western Blots der unteren Proteinbande von Transthyretin (entsprechend der Monomere von TTHY) mit je acht Liquorproben der vier Gruppen, bestehend aus Kontrollen (CON), Patienten mit Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB), Alzheimer-Patienten (AD) und Parkinson-Patienten (PD). Im unteren Teil der Abbildung ist exemplarisch ein Western Blot dargestellt, der alle vier Gruppen zeigt. Bei DLB war die untere Proteinbande von TTHY im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant um den Faktor 1,6 hochreguliert (\* statistisch signifikant mit  $p < 0,5$ ). Des Weiteren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, insgesamt wurde jedoch bei DLB das höchste mittlere densitometrische Volumen der unteren Proteinbande (3,1) dokumentiert, bei den anderen Gruppen zeigten sich durchweg geringere Volumina (bei gesunden Kontrollen 2,0, bei AD 2,4, bei PD 2,5).

### 3.6.3 Contactin-1

Im Western Blot von CNTN1 zeigte sich eine signifikante Hochregulation bei DLB gegenüber zentralneurologisch gesunden Kontrollen, AD und PD. Bei DLB war CNTN1 im Vergleich zu den gesunden Kontrollen 2,7fach hochreguliert, im Vergleich zu AD 2,0fach und im Vergleich zu PD 3,4fach (Abbildung 3.13). Zwischen den Gruppen AD, PD und gesunden Kontrollen ließen sich keine relevanten Unterschiede bei CNTN1 detektieren.



*Abbildung 3.13:* Densitometrische Auswertung der Western Blots von CNTN1 mit je acht Liquorproben der vier Gruppen, bestehend aus Kontrollen (CON), Patienten mit Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB), Alzheimer-Patienten (AD) und Parkinson-Patienten (PD). Im unteren Teil der Abbildung ist exemplarisch ein Western Blot dargestellt, der alle vier Gruppen zeigt. Bei DLB war CNTN1 im Vergleich zu allen drei anderen Gruppen signifikant hochreguliert (\* statistisch signifikant mit  $p < 0,5$ ). DLB war im Vergleich zu gesunden Kontrollen 2,7fach hochreguliert, im Vergleich zu AD 2,0fach und im Vergleich zu PD 3,4fach. Zwischen den Kontroll-, AD- und PD-Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

### 3.6.4 Chromogranin A

Im Western Blot zeigten sich zwei Proteinbanden unterschiedlichen Molekulargewichts (circa 55kDa und 25kDa), die separat densitometrisch

ausgewertet wurden. Weder bei der oberen (Abbildung 3.14) noch der unteren (Abbildung 3.15) Proteinbande ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen DLB und gesunden Kontrollen nachweisen. Jedoch zeigte sich bei der Analyse der oberen Proteinbande eine signifikante Hochregulation von PD im Vergleich zu DLB um den Faktor 3,6 und von AD im Vergleich zu DLB um den Faktor 2,6. Ein Unterschied der oberen Proteinbande von CGA zwischen AD und gesunden Kontrollen oder PD und gesunden Kontrollen wurde im Western Blot nicht gefunden.

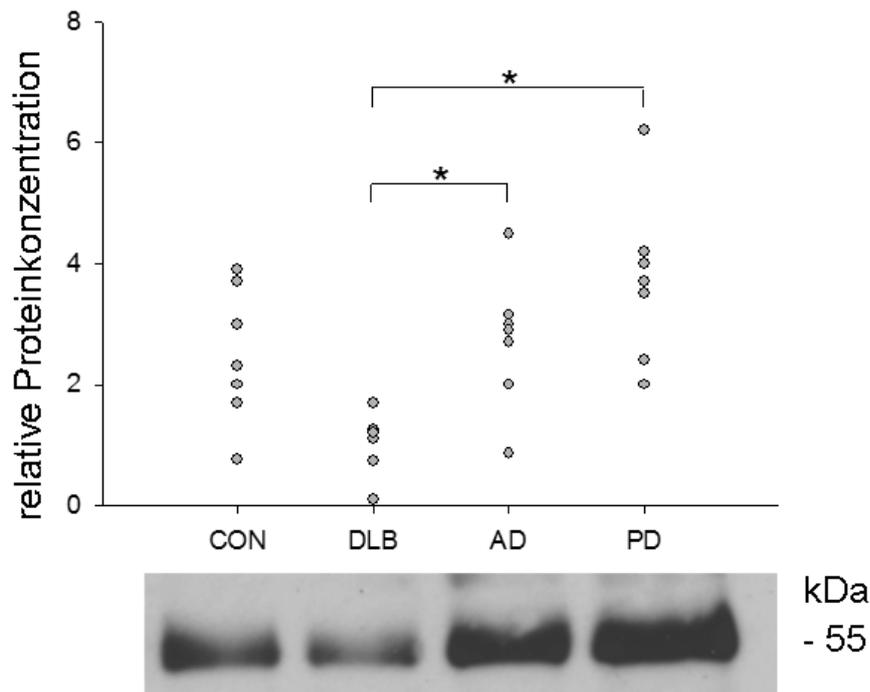


Abbildung 3.14: Densitometrische Auswertung der Western Blots der oberen Proteinbande (höheres Molekulargewicht von circa 55kDa) von CGA mit je acht Liquorproben der vier Gruppen, bestehend aus Kontrollen (CON), Patienten mit Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB), Alzheimer-Patienten (AD) und Parkinson-Patienten (PD). Im unteren Teil der Abbildung ist exemplarisch ein Western Blot dargestellt, der alle vier Gruppen zeigt. Es zeigte sich eine signifikante Hochregulation von PD gegenüber DLB um den Faktor 3,6 und von AD gegenüber DLB um den Faktor 2,6 (\* statistisch signifikant mit  $p < 0,5$ ). Weitere signifikante Regulationen insbesondere von DLB im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigten sich nicht. Tendenziell war sogar ein geringeres mittleres densitometrisches Volumen der oberen Proteinbande von CGA bei DLB (1,0) als bei neurologisch gesunden Kontrollen (2,5) zu dokumentieren.

Bei der unteren Proteinbande zeigte sich eine signifikante 2,3fache Hochregulation bei PD im Vergleich zu DLB. Auch bei der AD ließ sich eine tendenzielle

Hochregulation gegenüber DLB feststellen, die sich mit dem Faktor 1,8 berechnen ließ, jedoch statistisch nicht signifikant war. Wiederum ließen sich keine signifikanten Regulationen bei PD im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Tendenz einer Hochregulation um den Faktor 1,5) oder von AD im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigen (Tendenz einer Hochregulation um den Faktor 1,2).

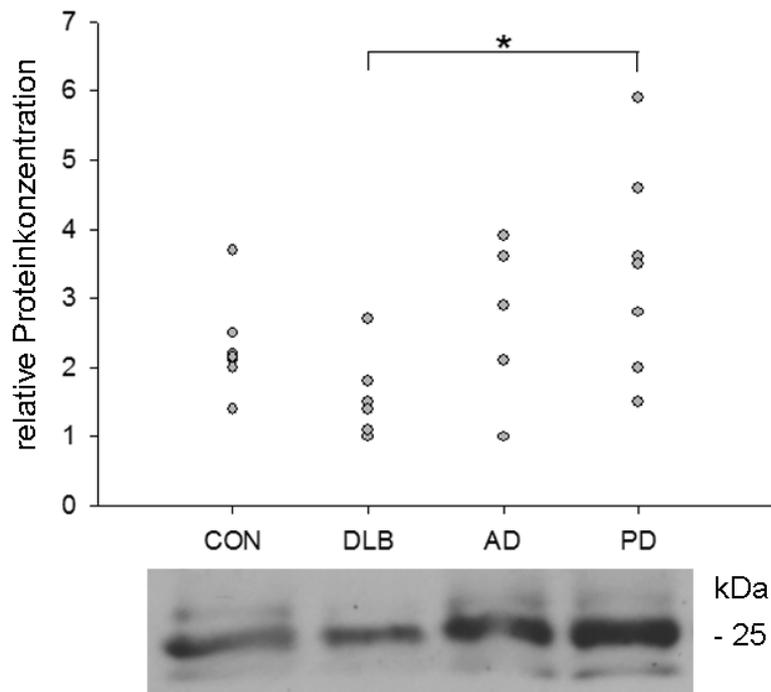


Abbildung 3.15: Densitometrische Auswertung der Western Blots der unteren Proteinbande (niedrigeres Molekulargewicht von circa 25 kDa) von CGA mit je acht Liquorproben der vier Gruppen bestehend aus Kontrollen (CON), Patienten mit Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB), Alzheimer-Patienten (AD) und Parkinson-Patienten (PD). Im unteren Teil der Abbildung ist exemplarisch ein Western Blot dargestellt, der alle vier Gruppen zeigt. Es zeigte sich eine signifikante Hochregulation von PD gegenüber DLB um den Faktor 2,3 (\* statistisch signifikant mit  $p < 0,5$ ). Weitere signifikante Regulationen, insbesondere von DLB im Vergleich zu gesunden Kontrollen, zeigten sich nicht. Tendenziell war sogar ein geringeres mittleres densitometrisches Volumen der unteren Proteinbande von CGA bei DLB (1,5) als bei neurologisch gesunden Kontrollen (2,3) oder AD (2,8) zu dokumentieren.

## **4 Diskussion**

Proteomanalysen haben in den letzten Jahren besonders in der medizinischen Forschung stetig steigende Bedeutung erlangt. Dabei werden alle Arten humaner Proben untersucht, angefangen von verschiedensten Körperflüssigkeiten, wie dem in dieser Arbeit verwendeten Liquor cerebrospinalis, über Gewebeproben bis hin zu Kulturen menschlicher Zelllinien. Dabei stehen die unterschiedlichsten Methoden zur Verfügung, Proteinprofile zu vergleichen, unter anderem der hier gewählte Ansatz, basierend auf der Auswertung zweidimensionaler Gelelektrophoresen, die je nach verwendeter Färbemethode der Proteinspots eine sehr hohe Präzision bieten.

Liquoruntersuchungen spielen dabei im Zusammenhang mit der Erforschung zentralneurologischer Krankheitsbilder eine besondere Rolle, da diese Körperflüssigkeit in direktem Kontakt mit dem geschädigten Gehirngewebe steht und mittels Lumbalpunktion zum Beispiel für diagnostische Zwecke gewonnen werden kann.

### **4.1 Vorteile der proteindepletierten gegenüber unfraktioniert verwendeten Proben**

Bei den meisten Untersuchungen, die sich mit der Suche nach Biomarkern und der Darstellung von Proteinveränderungen im Liquor bei neurodegenerativen Erkrankungen beschäftigen, wurde das gesamte Proteom einer Probe verwendet und unfraktioniert weiterführenden Analysen zugeführt. Dabei besteht jedoch die Gefahr des Informationsverlustes aufgrund von Überlagerungen der nur in geringem Prozentsatz repräsentierten Proteine durch einige in deutlich höherem Anteil in der untersuchten Körperflüssigkeit vorkommenden Proteine. In dieser Arbeit wurde deshalb zunächst eine Proteindepletion von zwölf in hohem Vorkommen vorliegender Proteine durchgeführt, woraufhin anschließend eine zehnfach bis 20fach höhere Menge der Eluatfraktion (Proteine in niedrigem Vorkommen) auf ein 2D-Gel aufgetragen werden konnte. Damit wurde die Möglichkeit verbessert, die Potentiale der Proteomanalyse mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese gänzlich auszunutzen und so optimale Voraussetzungen geschaffen, eine maximale Ausschöpfung zu

erreichender Erkenntnisse zu erlangen (Echan et al. 2005, Huang HL et al. 2005, Millionini et al. 2011).

#### **4.2 Ergebnisse der Western Blots**

Western Blots wurden für vier selektierte Proteine durchgeführt, ihre Auswahl erfolgte orientiert an Regulationsgrad, der Anzahl der zu einem einzelnen Protein korrespondierenden Spots, bereits beschriebenen Zusammenhängen mit neurodegenerativen Erkrankungen oder weil sie repräsentativ für eine funktionelle Gruppe bezüglich ihres Biomarkerpotentials und zur Bestätigung der vorher im 2D-Gel erhobenen Ergebnisse untersucht werden sollten. Besonders interessant wäre es noch, die beiden am höchsten regulierten Proteine ITIH4 und CSTN1 weiterführend mittels Western Blot oder Elisa zu untersuchen. Zwar waren für diese Arbeit bereits mehrfach CSTN1-Western Blots durchgeführt worden, jedoch lieferten diese leider wiederholt keine verwertbaren oder reproduzierbaren Ergebnisse. Mangels geeigneter Liquorproben konnte ITIH4 dann im Verlauf nicht mehr analysiert werden. Für die Western Blots wurde vor allem Wert auf eine sorgfältige Patientenauswahl gelegt, wobei zwar geringere Ansprüche an Probenalter und Standardliquorparameter gestellt wurden, um die vorliegenden Bedingungen denen im klinischen Alltag anzunähern, die Diagnosekriterien jedoch genauso streng erfüllt werden mussten wie bei den Proben, die für die vorangegangenen 2D-Analysen verwendet worden waren.

Bei den vier Proteinen, die im Western Blot untersucht wurden, ergab sich in zumindest drei Fällen (CO4A, Monomere von TTHY und CNTN1) eine entweder statistisch signifikante (Monomere von TTHY und CNTN1) oder eine in der Tendenz übereinstimmende Regulation (CO4A) konform zu den zuvor in den 2D-Analysen erhobenen Ergebnissen. Lediglich für CGA konnten die Ergebnisse der 2D-Gelelektrophoresen nicht auch mittels Western Blots reproduziert werden. Erklärungen hierfür mögen zum einen eine geringere Probenqualität sein, da zum Beispiel durch ein höheres Alter der Liquorprobe eine zunehmende Degradation der Proteine umso wahrscheinlicher wird, oder auch die Methodik Western Blot selbst, die sich in ihrer Durchführung von 2D-Gelelektrophoresen unterscheidet. Außerdem wurden durch den Depletionsschritt vor der zweidimensionalen Gelelektrophorese

interferierende Proteine eliminiert sowie eine Aufkonzentrierung der weiter zu untersuchenden Proben erreicht, für die Western Blots hingegen wurde dieser Schritt nicht durchgeführt, sondern native Proben wie sie auch im Klinikalltag vorliegen verwendet. Auch damit könnten von den 2D-Untersuchungen leicht abweichende Western-Blot-Ergebnisse erklärt werden. Insgesamt lässt sich feststellen, dass wir unsere Ergebnisse aus den vorangehenden 2D-Gelelektrophoresen in den folgenden Tests mittels Western Blots bestätigen konnten.

Gegenüber diesen Überlegungen steht die Frage, inwiefern die vier ausgewählten Proteine Anforderungen an einen molekularen Biomarker erfüllen, der womöglich auch zu diagnostischen Zwecken eingesetzt werden kann, um die DLB auch gegenüber anderen neurodegenerativen Erkrankungen abzugrenzen. Diese Frage soll im letzten Kapitel 4.4 erörtert werden.

### **4.3 Einfluss der DLB-Pathologie auf verschiedene biologische Funktionsbereiche in einer Zelle**

Das von der DLB-Pathologie betroffene Gehirn ist in verschiedenen biologischen Funktionsbereichen beeinflusst beziehungsweise gestört. Dies lässt sich durch die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse des Proteoms darstellen, in der im Liquor von DLB-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine Regulation von 23 verschiedenen Proteinen nachgewiesen werden konnte. Die identifizierten Proteine sind an unterschiedlichen Prozessen des Zellorganismus beteiligt und für viele wurden bereits Zusammenhänge mit neurodegenerativen Erkrankungen und auch im Besonderen mit der DLB untersucht (z.B. Abdi et al. 2006).

Im Anhang (Kapitel 7) findet sich zu Übersichtszwecken eine detaillierte Tabelle mit der Aufführung der Proteine, die sich in dieser Arbeit im Liquor von DLB-Patienten reguliert fanden und bereits in der Literatur als im Liquor bei unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen reguliert beschrieben wurden (die Proteine wurden in der Reihenfolge des Auftretens im Text des Kapitels 4.3 aufgelistet).



Unsere Ergebnisse fügen sich nahtlos in dieses Modell ein: Die Mehrzahl der in dieser Arbeit als bei der DLB reguliert identifizierten Proteine (acht Proteine) ist an der Immunantwort, Komplementprozessen beziehungsweise der Akuten-Phase-Reaktion beteiligt. Im Einzelnen wurden viele dieser Proteine hinsichtlich ihrer Bedeutung bei neurodegenerativen Prozessen untersucht und sollen im Folgenden detaillierter dargestellt werden.

Die Wichtigkeit der HLA-assoziierten Komplementfaktoren bei der AD und PD wurde bereits 1984 von Nerl et al. diskutiert. Eine Genvariante von Complement C4a (CO4A) wurde sogar als möglicher Marker für die AD postuliert, dieser Vorschlag hat aber bis zum heutigen Tage keine klinische Bedeutung erlangt. Zudem wurde erst kürzlich das Vorhandensein von Komplementfaktoren und Indikatoren für Neuroinflammation für die AD mit Hilfe eines Mausmodells analysiert (Fonseca et al. 2011). *In vitro* konnte gezeigt werden, was auch schon für *in vivo*-Situationen beschrieben wurde:  $\beta$ -Amyloid-Fibrillen besitzen die Fähigkeit, auf klassischem und auch auf alternativem Weg das Komplementsystem zu aktivieren. Sowohl protektive als auch schädigende Effekte des Komplement-Systems bei der Neurodegeneration wurden vermutet, wobei auch die Faktoren CO4A und Complement C3 (CO3) besondere Erwähnung fanden (Zhou et al. 2008). Eine Assoziation von CO3 mit neurodegenerativen Erkrankungen wurde auch in weiteren Publikationen schon konkreter beschrieben. Die Konzentration von CO3 im Liquor wurde bereits bei Gesunden im Vergleich zu AD-, PD- und MSA-Patienten gemessen, DLB-Patienten wurden nicht untersucht. Es zeigten sich dabei eine absolute CO3-Hochregulation in der AD-Gruppe gegenüber allen anderen Krankheitsgruppen und gesunden Kontrollen sowie eine Herunterregulation von CO3 für MSA-Patienten. Zusätzlich wurden geschlechtsspezifische Abweichungen deutlich. Als alleinstehender Marker wurde CO3 als nicht sinnvoll befunden, dafür jedoch bei der Quotientenbildung mit  $\beta$ -Amyloid (1-42) (Wang et al. 2011). In der hier vorliegenden Arbeit fanden sich im 2D-Gel sowohl von COA4 als auch CO3 Hochregulationen im Liquor von DLB-Patienten. Eine signifikante Hochregulation von COA4 ließ sich im Western Blot zwar nicht reproduzieren, jedoch war eine eindeutige Tendenz in diese Richtung erkennbar. Die fehlende Signifikanz lässt sich möglicherweise durch die Vielzahl an vorliegenden Isoformen dieses Proteins erklären, die sich nur in aufwändigeren, hochauflösenden Methoden im Einzelnen nachweisen und unterscheiden lassen.

Transthyretin (TTHY) scheint eine neuroprotektive Rolle bei neurodegenerativen Prozessen zu spielen, da es in der Lage ist, A $\beta$ -Peptid-Ablagerungen zu verwerfen (Doggui et al. 2010). Auf der Suche nach potentiellen Biomarkern im Liquor wurde schon die Regulation von TTHY bei der AD im Vergleich zu gesunden Kontrollen beschrieben (Gloeckner et al. 2008, Perrin et al. 2011). Durch Gloeckner et al. (2008) konnte insbesondere gezeigt werden, dass sich nephelometrisch bestimmte TTHY-Werte als signifikant bei AD und Normaldruckhydrozephalus reduziert zeigten und demgegenüber zwischen gesunden Kontrollen und anderen Demenzerkrankungen wie der DLB, CJK oder FTD keine Unterschiede detektiert werden konnten. Bei den in dieser vorliegenden Arbeit durchgeführten Western Blot-Analysen zeigte sich jedoch bei den Monomeren eine signifikante Hochregulation bei DLB gegenüber gesunden Kontrollen, für die Dimere ließ sich keine statistisch signifikante Regulation nachweisen. Interessanterweise fand sich außerdem bei den Dimeren bei drei der acht PD-Patienten eine Doppelbande, die sich bei keiner der anderen Patientengruppen nachweisen ließ. Dies lässt sich eventuell durch spezielle, womöglich krankheitsspezifische Proteinmodifikationen erklären und in weiterführenden Untersuchungen sollte diesen Überlegungen nachgegangen werden. Da TTHY scheinbar in verschiedenen Isoformen beziehungsweise unterschiedlich posttranslational modifiziert vorliegt, ist weiterhin zu diskutieren, ob TTHY Biomarkerpotential innehatte, wenn eine bestimmte Unterform dieses Proteins spezifisch mittels ELISA oder Western Blot erfasst werden könnte.

In dieser Arbeit fand sich der als Pigment epithelium-derived factor (PEDF) identifizierte Proteinspot bei der DLB 2,1fach hochreguliert, und auch bei weiteren Demenzerkrankungen wurde dieses Protein bereits in der Literatur als reguliert beschrieben. So etwa bei der frontotemporalen Demenz, bei der sich PEDF im Liquor Erkrankter als herunterreguliert erwies (Davidsson et al. 2002), oder der AD, wo es einen Hinweis auf einen möglichen diagnostischen Wert des PEDF im Liquor gibt, wenn es in Kombination mit Haptoglobin und Tau gemessen wird (Abraham et al. 2011). PEDF ist ein bekannter und potenter Neuroprotektor, der zum Beispiel schützend gegenüber Glutamat-Toxizität oder oxidativem Stress wirkt (Tombran-Tink 2005). Die Bedeutung von PEDF gegenüber neurodegenerativen Schäden ist vielseitig und es scheint sinnvoll, die Bedeutung von PEDF für die Pathogenese, Therapie und Diagnostik von Demenzerkrankungen weiter zu untersuchen. Bislang hat PEDF jedoch noch keinen Einzug in die klinische Routine gefunden.

Das Akute-Phase-Protein Prothrombin (THRB) fand sich in der vorliegenden Untersuchung im Liquor von DLB-Patienten erhöht. Selbiges wurde schon für Patienten mit Chorea Huntington beschrieben (Huang YC et al. 2011). THRB scheint durch die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Protease-aktivierten Rezeptoren sowie Mikrogliazellen eine bedeutende Rolle bei inflammatorischen Prozessen zu spielen und ebenfalls bei dem durch oxidativen Stress vermittelten kortikalen Neuronenzelltod. Assoziationen von THRB zu neurodegenerativen Erkrankungen wie der AD (Arai et al. 2006), der Chorea Huntington (Huang YC et al. 2011) und vaskulär bedingter dementieller Entwicklung (Quinn et al. 2011) wurden bereits beschrieben, bislang jedoch nicht ein Zusammenhang mit der DLB. Da zudem eine vergleichende Untersuchung von THRB-Werten bei unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen noch aussteht, bleibt neben der genauen pathogenetischen Bedeutung die Spezifität dieses Proteins unklar.

Angiotensinogen (ANGT) korrespondierte in dieser Studie zu zwei bei DLB herunterregulierten Proteinspots. Als Teil des RAAS erhält dieses Protein die Flüssigkeitshomöostase im Körper mit aufrecht und beeinflusst den Blutdruck. Dass viele Komponenten dieses Systems auch im ZNS nachgewiesen werden können, suggeriert, dass es auch dort eine Rolle spielt. Es wurde der mögliche Beitrag des RAAS zu Krankheitsprozessen zum Beispiel bei der AD oder der vaskulären Demenz analysiert und zusammengefasst (Savaskan 2005). Auch in größeren Proteomstudien fand ANGT schon Erwähnung im Zusammenhang mit Liquoruntersuchungen bei der DLB oder der AD (Abdi et al. 2006, Perrin et al. 2011).

Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 (ITIH4) fand sich bei DLB extrem hochreguliert, entweder um den Faktor 87,9 oder 60,1. Eine exakte Zuordnung zu einem dieser beiden regulierten Spots war für die Proteine ITIH4 und CSTN1 jedoch aus technischen Gründen bei der Vorbereitung der Proben für die massenspektrometrische Analyse nicht möglich. ITIH4 fand bereits in einer neueren Proteomarbeit zur Identifikation neuer Biomarker für die AD Erwähnung (Perrin et al. 2011) und wurde des Weiteren als möglicher Serummarker für den akuten ischämischen Schlaganfall diskutiert (Kashyap et al. 2009).

Auch Serum albumin (ALBU) wurde als Akute-Phase-Protein in dieser Gruppe von Proteinen involviert in die Immunantwort mit aufgeführt. Da es bei der Immundepletion der Patientenproben jedoch zu größten Teilen aus dem Liquor

eliminiert werden sollte, ist das vorliegende Ergebnis der Herunterregulation von ALBU nicht verwertbar.

#### **4.3.2 Die Bedeutung des Glukosestoffwechsels bei der DLB**

Glukose ist der Hauptenergielieferant für das Gehirn und erhält so seine Funktionalität aufrecht. Entsprechend ist für viele neurodegenerative Erkrankungen eine Beeinträchtigung des Glukosemetabolismus beschrieben. Mittels FDG-PET-Untersuchungen können dabei regionale Störungen der Glukoseaufnahme detektiert und so charakteristische Befunde bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen erhoben werden (Herholz et al. 2007). Bei der AD finden sich zum Beispiel sowohl ein beeinflusster Glukosestoffwechsel als auch ein reduzierter Blutfluss in temporoparietalen Hirnkortizes, bei der FTD ist vor allem der Glukosestoffwechsel des Frontalkortex beeinträchtigt und bei der DLB der Glukosestoffwechsel okzipitaler Hirnbereiche, insbesondere des primären visuellen Kortex. Bei der Pathogenese der AD scheinen auf funktioneller Ebene unter anderem gestörte Insulin-Signaltransduktionskaskaden und damit eine mitochondriale Fehlfunktion, mangelhafte Glukoseverwertung und ineffiziente Energieverwertung eine wichtige Bedeutung innezuhaben (Rhein et Eckart 2007).

In dieser Arbeit fanden sich auf biochemischer Ebene drei im Liquor bei DLB hochregulierte Proteine, die in den Glukosestoffwechsel, beziehungsweise noch genauer in die Glykolyse involviert sind - Fructose-bisphosphate aldolase C (ALDOC), Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (KPYM) und Alpha-Enolase (ENOA). Einen Link zu diesen Ergebnissen bietet eine Studie von Opii et al. (2008), in der Hunde als Modelle des menschlichen Alterns fungieren. In deren Gehirnen findet man A $\beta$ -Peptide, die in der Sequenz den menschlichen ähneln und mit einem Abbau der kognitiven Funktion verbunden sind. Vergleichend wurden Hirnproben von Hunden untersucht, die zuvor „prophylaktisch“ eine diätetische (antioxidative) Therapie und behaviourale Stimulation erhalten hatten. Es zeigte sich, dass in den Proben der Hunde, die die beschriebene Prophylaxe erhalten hatten, im Vergleich zu nicht-therapierten Kontrolltieren eine Erhöhung von Proteinen gefunden wurde, die in den Glukosestoffwechsel involviert sind, unter anderem von ALDOC und ENOA. Oxidativer Stress spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der AD. In

einer Studie des Redoxproteoms des menschlichen Gehirns von Patienten mit familiärer AD wurden KPYM und ENOA dekektiert (Butterfield et al. 2006), die auch in dieser Arbeit im Liquor von DLB hochregulierten waren. Die oxidative Inaktivierung dieser Enzyme könnte eine Rolle bei der Progression eines milden kognitiven Impairments zur AD spielen. Weiterhin hat ENOA eine entscheidende Bedeutung bei altersassoziierten neurodegenerativen Erkrankungen inne, wie zum Beispiel der Huntington Erkrankung (Perluigi et al. 2005) oder der PD (Poon et al. 2005). Poon et al. beschreiben, dass Proteine, die mit gestörtem Energiemetabolismus und Mitochondriendysfunktion assoziiert sind, besonders anfällig für oxidativen Stress seien, der in dem vorliegendem Fall mit A30P-mutiertem  $\alpha$ -Synuklein in Zusammenhang gebracht wurde (2005). Oxidative Schäden sind auch bei der DLB von großer Wichtigkeit (Power et Blumbergs 2009, Navarro et al. 2009).

#### **4.3.3 Die Bedeutung des Lipidstoffwechsels bei der DLB**

Modifikationen von Fettstoffwechselwegen, Lipid Rafts und einzelnen Proteinen und Genen involviert in Lipidstoffwechselprozesse wurden bereits im Zusammenhang mit verschiedensten neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben. Bei der PD wurden zum Beispiel im visuellen Kortex auch in Abwesenheit der typischen Parkinson-Pathologie und LK signifikante Veränderungen von Sphingolipiden, Glycerophospholipiden und Cholesterolförmungen detektiert (Cheng et al. 2011). Lipid Rafts als cholesterol-, sphingomyelin- und gangliosidreiche Mikrodomänen, die Interaktionen zwischen Lipiden und Proteinen beziehungsweise Proteinen und Proteinen medieren, zeigten sich in Frontalhirn-Kortex-Proben sowohl bei der AD (Martín et al. 2010) als auch bei der PD (Fabelo et al 2011) im Vergleich zu gesunden Kontrollen verändert. Vor allem bei der Entstehung der Alzheimer-Pathologie wurde die Rolle der Lipid Rafts in Membranen bei der abnormalen A $\beta$ -Aggregation ausführlich diskutiert (Matsuzaki 2011), bei der PD scheint eine Assoziation von  $\alpha$ -Synuklein mit Lipid Rafts zu existieren (Zabrocki et al. 2008).

In dieser Arbeit fanden sich im Liquor bei DLB-Patienten drei signifikant hochregulierte Proteine, die am Lipidstoffwechsel beteiligt sind - Prostaglandin-H2 D-isomerase (PTGDS), Ganglioside GM2 activator (SAP3) und Apolipoprotein A-IV (APOA4). PTGDS fand bislang im Zusammenhang mit dementiellen Erkrankungen

erst in letzter Zeit Erwähnung, so wurde eine Regulation dieses Proteins im Liquor von AD-Patienten gezeigt (Perrin et al. 2011). Ebenso wurde eine signifikante Hochregulation von PTGDS im Liquor von Schizophreniepatienten dargestellt, dies im Zusammenhang mit einer Hochregulation von Apolipoprotein E und A1 (Martins-De-Souza et al. 2010). Die Ergebnisse der letztgenannten Studie stützen die Hypothese eines gestörten Cholesterol- und Phospholipidmetabolismus bei Schizophreniepatienten, der auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie auch der DLB von Bedeutung scheint. SAP3 interagiert mit Gangliosid GM2, das eine wichtige Komponente von Lipid Rafts darstellt. Gangliosid GM2 wurde unter anderem als bei der AD im menschlichen Hirnkortex erhöht beschrieben (Molander-Melin et al. 2005) und steht im Zusammenhang mit der Formation von neurotoxischen  $\beta$ -Amyloid-Plaques.

Das Glykoprotein APOA4 wurde im Liquor bei der Chorea Huntington Erkrankung hochreguliert gefunden und als ein möglicher Biomarker für diese Erkrankung vorgeschlagen (Huang YC et al 2011). Es wurde ebenfalls diskutiert, ob dieses Protein als Suppressor der Nahrungsaufnahme mitverantwortlich für die Gewichtsabnahme bei dieser neurodegenerativen Erkrankung ist (Shen et al. 2008), einem Symptom, dass sich bekanntermaßen auch bei anderen Demenzformen wie auch bei der DLB wiederfinden lässt. Im Maus-Modell konnte zudem gezeigt werden, dass eine Defizienz von APOA4 auch eine Akzeleration der Pathogenese von AD hervorruft, indem A $\beta$ -Ablagerungen vermehrt und damit kognitive Schäden verstärkt werden (Cui et al. 2011). Da sich in Hirnbiopsien von DLB-Patienten klassische Charakteristika der Alzheimer-Pathologie finden, könnte APOA4 daher eine genauso entscheidende Bedeutung bei der Genese der DLB innehaben.

#### **4.3.4 Modifikation der Zellstruktur und Zelladhäsion durch DLB und weitere neurodegenerative Erkrankungen**

Drei Proteine mit Einfluss auf die Zellstruktur zeigten sich im Liquor bei DLB signifikant hochreguliert, zu diesen zählen Contactin-1 (CNTN1), Calsyntenin-1 (CSTN1) und Gelsolin (GELS).

In dieser Arbeit konnte auch in zusätzlich zu der 2D-Gel-Analyse angefertigten Western Blots von CNTN1 eine signifikante Hochregulation dieses Proteins bei DLB

im Vergleich zu gesunden Kontrollen und ebenso zu an AD und PD erkrankten Patienten gezeigt werden. Damit ist CNTN1 hier das einzige Protein, durch dessen Regulationsprofil auch die unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen deutlich voneinander abgegrenzt werden können. Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen steht dabei die Arbeit von Yin et al. (2009), in der CNTN1 auch bei der AD als erhöht beschrieben wird. CNTN1 wird bei vielen Prozessen, die das ZNS betreffen, aber auch zum Beispiel bei der Tumorgenese eine wichtige Rolle zugesprochen. So scheinen Adhäsionsmoleküle der Contactin-Untergruppe, die der Immunglobulin-Superfamilie zuzuordnen sind, an der Synaptogenese sowie der axonalen Entwicklung beteiligt zu sein und somit einen Einfluss auf die neuronalen Verschaltungen, insbesondere des Cerebellums auszuüben (Stoeckli 2010). Dies wurde in einer Studie mit Contactin-Knock-out-Mäusen bestätigt, in der die Versuchstiere eine symptomatische Ataxie und eine abnormale cerebelläre Mikroorganisation zeigten. Allgemein ist Contactin in vier Hauptprozesse im Cerebellum involviert: Es führt Granulazell-Axon-Populationen in die korrekte Ausrichtung, wirkt an der Bündelung von Axonen in Faszikeln mit, mediiert Interaktionen, die notwendig für die Expansion von Granulazell-Dendriten sind, und reguliert die Extension von Golgi-Zell-Dendriten in die Molekularebene (Berglund et al. 1999).

Die beiden am stärksten regulierten Proteinspots (um die Faktoren 87,9 und 60,9) wurden als CSTN1 oder ITIH4 identifiziert, an dieser Stelle soll CSTN1 näher beschrieben werden. Dieses Protein wird auch als Alzheimer-related cadherin like protein bezeichnet und interagiert mit der leichten Kette von Kinesin-1 (Konecna et al. 2006). Zudem ist es möglicherweise aktiv an axonalem Wachstum sowie der Entwicklung beteiligt und erhält die neuronale Polung des erwachsenen Nervensystems. Eine Mitwirkung an der Stabilisierung von  $\beta$ -amyloid precursor protein bei seinem anterograden axonalen Weg wird diskutiert (Steuble et al. 2010). Die Isoform 2 des Proteins CSTN1 wurde als bei der PD reguliert beschrieben (Yin et al. 2009).

Ein weiteres bei der DLB signifikant hochreguliertes Protein ist das aktin-bindende GELS, das von Epithelzellen der Plexi choroidei produziert wird. Bezüglich der AD wurden GELS-Werten im Plasma von dementen Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen untersucht und die Korrelation eines erniedrigten Plasma-GELS-Spiegels

mit fortschreitender Krankheitsprogression, die anhand von MMST-Ergebnissen determiniert wurde, beschrieben (Güntert et al. 2010). Im Mausmodell wurde gezeigt, dass GELS einen modulierenden Effekt auf die A $\beta$ -Formation - möglicherweise durch eine Steigerung der A $\beta$ -Elimination durch Megalin - hat und somit an der Herunterregulation der durch A $\beta$  hervorgerufenen neurotoxischen Einflüsse mitbeteiligt ist (Antequera et al. 2009). Dieser neuroprotektive Effekt wurde auch in einer Studie mit Zellkulturen, die mit GELS versetzt wurden, untersucht und bestätigt (Vargas et al. 2010). Die Versuchsreihen ergaben, dass GELS an Megalin bindet und konsekutiv einen Komplex mit A $\beta$  bildet, die durch A $\beta$ -induzierte Störung des Zytoskeletts der untersuchten Plexus choroideus-Epithelzellen inhibiert und zudem die Stickstoffmonoxid-Produktion und neuronalen Zelltod verhindert. Es wurde außerdem nachgewiesen, dass durch GELS die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette gesteigert wurde. Ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress, neuronaler Apoptose und der Spaltung von GELS wurde weiterführend bereits suggeriert (Ji et al. 2009).

Bei der DLB und PD wurde kürzlich in Hirngewebe und Zellkulturen untersucht, inwiefern GELS und die  $\alpha$ -Synuklein-Aggregation assoziiert sind. Dabei fanden sich sowohl GELS als auch  $\alpha$ -Synuklein als Bestandteile von LK. Durch die Präsenz von Calciumchlorid konnte GELS in vitro die Aggregationsrate von  $\alpha$ -Synuklein steigern, strukturelle Unterschiede schienen dabei durch GELS nicht hervorgerufen zu werden (Welander et al. 2011). Weiterführende Untersuchungen sind jedoch nötig, um die genauen Mechanismen GELS in der Pathogenese von Synukleinopathien zu definieren.

#### **4.3.5 Einfluss der DLB-Pathologie auf Signaltransduktionskaskaden**

Sechs signifikant im 2D-Gel bei DLB hochregulierte Proteinspots wurden als Chromogranin A (CGA) identifiziert. Dieses Ergebnis war jedoch in Western Blot-Analysen nicht reproduzierbar, wo sich zwei Proteinbanden unterschiedlichen Molekulargewichts von CGA zeigten. Beide Proteinbanden waren jeweils am prominentesten bei der PD ausgeprägt, gefolgt von der AD und dann den gesunden Kontrollen. Bei den DLB-Proben waren beide CGA-Banden jeweils im Vergleich zu den drei Vergleichsgruppen tendenziell herunterreguliert, jedoch in den meisten

Kombinationen ohne statistische Signifikanz. Signifikante Unterschiede zeigten sich jeweils für die beiden CGA-Banden bei PD, die im Vergleich zu DLB hochreguliert waren, und für die Bande höheren Molekulargewichts bei AD, die sich im Vergleich zu DLB hochreguliert zeigte. Das Protein CGA wird in sekretorischen Vesikeln von Neuronen und neuroendokrinen Zellen gefunden und wurde bereits als neuer Liquor-Biomarker für die AD postuliert (Perrin et al. 2011). Im Zusammenhang mit der AD soll es eine Rolle als Mediator zwischen neuronalen, glialen und inflammatorischen Prozessen spielen (Lechner et al. 2004), womit eine Verknüpfung zwischen einigen Funktionsbereichen einer Zellen geschaffen wäre. Bei der DLB wurde die Akkumulation axonal transportierter Substanzen in kortikalen LK untersucht, zu welchen auch CGA gehörte (Katsuse et al. 2003). Dieses Ergebnis suggeriert, dass die chronische Blockade des axonalen Transports eine Rolle bei der Entwicklung von LK im erkrankten Gehirn spielt.

Das zweite bei DLB hochregulierte Protein, das an Signaltransduktionkaskaden beteiligt ist, ist Insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP2). Insulin und IGF-1 scheinen neben der Regulation des Energiehaushaltes im Gehirn auch eine Rolle bei der Modulation kognitiver Prozesse vor allem bei der AD zu spielen. Für IGFBP2 wurde ein Zusammenhang mit der cerebralen Amyloid-Angiopathie bei AD beschrieben (Rensink et al. 2004). Später wurden die eindrücklichen Effekte von IGF-1 auf die verschiedenen Proteine der APP-Familie untersucht und so zum Beispiel gezeigt, dass durch IGF-1 die Prozessierung endogenen APPs vermehrt wird und die A $\beta$ -Produktion unter IGF-1-Therapie erniedrigt ist (Adlerz et al. 2007). Zu diskutieren bleibt, ob und inwiefern IGFBP2 als IGF-bindendes Protein an diesen Vorgängen beteiligt ist. Auch im Liquor wurde IGFBP2 ebenfalls bei der AD bereits als reguliert gefunden (Craig-Schapiro et al. 2011, Zhang et al. 2005). Im Übrigen ist dieses Protein besonders in Prozesse der Tumorgenese involviert, wo es die Zellproliferation, -migration und -invasion beeinflusst.

#### **4.3.6 Die Rolle anderer bei DLB regulierter Proteine**

Vier weitere in dieser Arbeit regulierte Proteine konnten nicht den oben genannten funktionellen Gruppen zugeordnet werden und werden folglich in diesem Kapitel diskutiert. Zu diesen Proteinen gehört unter anderem das bei DLB hochregulierte

Amyloid-like protein 1 (APLP1), das wie das APP – Amyloid Precursor Protein –, aus dem das toxische A $\beta$  resultiert, sowie das APLP2 zur APP-Protein-Familie gehört. Eine ähnliche Entwicklung dieser drei Proteine wird ebenso diskutiert wie ihre überlappenden Funktionen in der Zelle (Adlerz et al. 2007). APLP1 scheint dabei in postsynaptische Funktionen involviert zu sein und regelt das Neuritenwachstum mittels Bindung an Komponenten der extrazellulären Matrix wie Heparin und Kollagen 1. Das Gamma-CTF Peptid des APLP1 wirkt zudem als Verstärker der neuronalen Apoptose (Kim et al. 1995). Bei der Genese der AD wird vor allem APP eine Schlüsselrolle zugesprochen, aber auch APLP1 wurde eine entscheidende Bedeutung bei der Entwicklung des Krankheitsprozesses nachgewiesen. Gezeigt wurde, dass APLP1 das „APP-Ektodomänen-Shedding“, also einen wichtigen Schritt bei der Bildung von A $\beta$ , beeinflusst, indem es mit der Endozytose von APP interferiert und APP auf diese Weise vermehrt der Spaltung durch  $\alpha$ -Sekretasen zuführt. Dadurch entsteht als Resultat nicht das toxische A $\beta$ -Peptid, was nämlich aus der Spaltung durch  $\beta$ -Sekretasen resultiert (Neumann et al. 2006). Eine weitere interessante Studie befasst sich mit nicht-humanen Primaten, die chronischer Manganexposition ausgesetzt wurden. Es zeigte sich, dass die Versuchstiere psychiatrische, kognitive und parkinsonoide Symptome entwickelten und ihre Frontalhirnkortizes stark beeinflusste Genexpressionsprofile aufwiesen. Immunhistochemisch fanden sich insbesondere eine deutlich hochregulierte APLP1-Expression und neben Aggregationen von A $\beta$ -Plaques auch  $\alpha$ -Synuklein-Ablagerungen. APLP1 scheint also in diesem Zusammenhang eine Bedeutung bei den durch das toxische Element Mangan hervorgerufenen neurodegenerativen Prozessen zu haben (Guilarte 2010).

Das Protein N-acetyllactosaminide beta-1,3-N-acetylglucosaminyl-transferase (B3GN1) wurde bereits als hochreguliert bei der DLB (Abdi et al. 2006) und herunterreguliert bei der AD beschrieben (Perrin et al. 2011, Zhang et al. 2005) und konnte in dieser Arbeit als bei im Liquor bei DLB-Patienten hochreguliertes Protein identifiziert werden. Im Übrigen fand B3GN1 bisher in der Literatur keine Erwähnung im Zusammenhang mit neurodegenerativen Prozessen oder seiner genauen Funktion im ZNS.

Das im Liquor von DLB ebenfalls hochregulierte Protein Glutathione peroxidase 3 (GPX3) ist Bestandteil des schützenden Systems vor oxidativem Stress. Erstmals

von D. Harman 1956 postuliert wird die Theorie der freien Radikale bereits seit Jahrzehnten als eine bedeutende Ursache für Zellalterungsprozesse gehandelt und ist auch Teil des Erklärungsmodells für die Entstehung der AD (Clark et al. 2010). Oxidative Imbalance und die daraus entstehenden Schäden gelten auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen als ein wichtiger contributiver Faktor bei der Pathogenese (Bennett et al. 2009, Coyle et Puttfarcken 1993, Jenner et al. 1992 und Sian et al. 1994), so dass davon auszugehen ist, dass dies auch bei der DLB eine wichtige Rolle spielt.

Bei Cystatin-C (CYTC) scheinen vermutlich posttranslationale Modifikationen, die das Molekulargewicht eines Proteins verändern, bei DLB zu einem niedrigeren Molekulargewicht geführt zu haben (Abbildung 3.3, Spot Nummer 20). Dies ließ sich durch das bei DLB und gesunden Kontrollen unterschiedliche Migrationsverhalten dieses Proteins an Stellen unterschiedlichen Molekulargewichts im 2D-Gel zeigen, nämlich zu einer Lage an demselben isoelektrischen Punkt, jedoch in unmittelbarer Nähe zueinander an Stellen unterschiedlichen Molekulargewichts. So erklärt sich die detektierte gleichzeitige Hoch- und Herunterregulation von CYTC. CYTC bindet lösliche A $\beta$ -Peptide und inhibiert so die cerebrale Amyloidablagerung (Mi et al. 2007). Auch in einer weiteren Studie wurde die protektive Rolle dieses Proteins bei der AD dargestellt und seine Funktion als ein potentieller therapeutischer Ansatzpunkt gesehen (Tizon et al. 2010). CYTC wurde zudem bereits als Biomarker für die AD vorgeschlagen (Craig-Schapiro et al. 2011, Perrin et al. 2011, Simonsen et al. 2008). Erniedrigte CYTC-Konzentrationen wurden auch schon im Liquor von DLB-Patienten gefunden (Maetzler et al. 2010) und ebenso bei PD-Patienten (Abdi et al. 2006). Die Bedeutung dieses Proteins bei Nicht-Amyloidangiopathien muss also noch näher definiert werden und auch seine Spezifität in der Funktion als molekularer Biomarker sei in Frage gestellt.

#### **4.4 Gibt es ein klassisches Proteinprofil bei der DLB oder sogar Biomarker-Potential einzelner Proteine?**

In dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von im Liquor von DLB-Patienten regulierten Proteinen identifiziert. Einige von Ihnen wurden bereits im Zusammenhang mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben und zeigten sich nun auch

bei der DLB von offensichtlicher Bedeutung. Als wichtige Differentialdiagnosen zur DLB fungierten die AD und die PD als Vergleichsproben bei den durchgeführten Western Blots der vier ausgewählten Proteine. Bei den Western Blot-Analysen zeigte sich, dass die drei betrachteten Krankheitsentitäten nur teilweise Unterschiede auf Proteomlevel aufweisen, so wie sie sich auch klinisch und neuropathologisch zum Teil stark ähneln. Lediglich CNTN1 zeigte sich bei DLB ausnahmslos und signifikant gegenüber allen anderen untersuchten neurodegenerativen Erkrankungen erhöht und sollte im Hinblick auf seine pathogenetische Bedeutung und seine mögliche Rolle bei der klinischen Diagnostik der DLB näher untersucht werden. Da nur für vier ausgewählte Proteine Western Blots angefertigt wurden, stehen weitere Untersuchungen der in dieser Arbeit als bei DLB reguliert identifizierten Proteine im Vergleich zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen noch aus.

Vor allem die AD als häufigste Ursache einer Demenz wurde hinsichtlich klinischer und molekulargenetischer Grundlagen bereits eingehend untersucht und es existieren viele Vorschläge für molekulare Marker für diese Erkrankung. Deutlich seltener wurden dahingegen Proteomanalysen, die sich mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen beschäftigen, veröffentlicht. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit für Proteinveränderungen bei der DLB wurden für die AD (Tabelle 4.1) und PD (Tabelle 4.2) viele identische Proteine von verschiedenen Autoren als reguliert beschrieben.

Studie	regulierte Proteine
Abdi et al. 2006	CO4A, CGA, ANGT, APOA4, IGFBP2
Simonsen et al. 2008	CYTC und CGA
Yin et al. 2009	COA4, CYTC, PDGDS, PEDF, GELS, CNTN1
Craig-Schapiro et al. 2011	CYTC und IGFBP2
Perrin et al. 2011	CYTC, CGA, TTHY, PTGDS, GELS, ITIH4, CSTN1, PEDF, ANGT und verschiedene Apolipoproteine

*Tabelle 4.1:* Mit der Literatur übereinstimmende Liquorproteinveränderungen bei der AD im Vergleich mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen für regulierte Proteine bei der DLB.

Studie	regulierte Proteine
Abdi et al. 2006	CYTC, APLP1
Yin et al. 2009	PDGDS, PEDF, GELS, ITIH4

*Tabelle 4.2:* Mit der Literatur übereinstimmende Liquorproteinveränderungen bei der PD im Vergleich mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen für regulierte Proteine bei der DLB.

In einer Proteomikarbeit zu diesem Thema wurden auch DLB-Patienten untersucht (Abdi et al. 2006). Die dort beschriebenen Proteine, die sich übereinstimmend auch in dieser Arbeit als reguliert finden ließen, werden in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Studie	regulierte Proteine
Abdi et al. 2006	TTHY, ANGT, B3GN1

*Tabelle 4.3:* Übereinstimmend regulierte Proteine bei DLB in der Literatur im Vergleich mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen.

Diese bei AD, PD und DLB zum Teil sehr ähnlichen Funde auf Proteinebene unterstreichen die Annahme, dass vielen neurodegenerativen Erkrankungen zumindest verwandte Krankheitsmechanismen zugrunde liegen, womit auch ähnliche Symptom-Komplexe sowie histopathologische Befunde zu erklären sind.

Abschließend lässt sich feststellen, dass es sicherlich hilfreich wäre, bei differentialdiagnostischen Überlegungen den Liquor Demenzerkrankter auf sämtliche Veränderungen der in dieser Arbeit identifizierten Proteine hin zu untersuchen, jedoch scheint dies im klinischen Alltag mit den aktuell zur Verfügung stehenden Methoden kaum praktikabel. Das Protein CNTN1 bietet allerdings weiterreichendes Potential: Es zeigte sich bei der DLB gegenüber gesunden Kontrollen, der AD und PD signifikant reguliert, so dass weiterführende Untersuchungen mit größeren Patientenkollektiven unter Einbeziehung weiterer neurodegenerativer Krankheitsentitäten als Kontrollen folgen sollten. So könnte der Nachweis erbracht werden, dass CNTN1 tatsächlich spezifisch bei der DLB verändert ist, was in der Diagnostik dieser Erkrankung durch einfache Methoden der Proteomik von Nutzen sein könnte.

## 5 Zusammenfassung

Die Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB) ist eine progrediente neurodegenerative Erkrankung und stellt nach der Alzheimer-Erkrankung eine der häufigsten Ursachen einer Demenz dar. Betroffene leiden neben dem zentralen Merkmal Demenz an Fluktuationen der Kognition, Parkinsonismus und visuellen Halluzinationen. Charakteristische neuropathologische Kennzeichen der DLB sind  $\alpha$ -Synuklein-enthaltende Lewy-Körperchen und -Neuriten, die sich in kortikalen und subkortikalen Hirnregionen finden. Bei der klinischen Diagnostik dieser Erkrankung sind neben der Beurteilung klinischer Befunde laborchemische, psychometrische, apparative und bildgebende Verfahren von Bedeutung, jedoch ist eine sichere Diagnose nur bioptisch zu stellen.

Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung des Liquorproteomprofils von DLB-Patienten im Vergleich zu neurologisch gesunden Kontrollen und die Identifikation von regulierten Proteinen im Liquor bei der DLB durch Verwendung klassischer Methoden der Proteomik. Nach initialer Depletion von zwölf häufigen Proteinen wurden die Liquorproben mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt, die Proteinexpressionsmuster quantitativ verglichen und anschließend insgesamt 23 verschiedene Proteine aus 44 regulierten Gelspots massenspektrometrisch identifiziert. Es fanden sich Proteine involviert in die Immunantwort, den Lipidstoffwechsel, den Glukosestoffwechsel, die Signaltransduktion und die Zellstruktur sowie einige, die sich keiner dieser funktionellen Gruppen zuordnen ließen. Von vier ausgewählten Proteinen - Complement C4a, Transthyretin, Contactin-1 und Chromogranin A - wurden Western Blots angefertigt, wofür Liquor sowohl von DLB-Patienten und gesunden Kontrollen als auch zum weiterführenden Vergleich von Parkinson- und Alzheimer-Patienten verwendet wurde.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auf Proteinebene die Vielfalt der biologischen Prozesse, die bei der DLB gestört ist. Zum Teil lassen sich Parallelen zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen erkennen, einige Proteine konnten jedoch erstmalig und einzig als bei der DLB reguliert nachgewiesen werden.

## 6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung	Seite	Tabelle	Seite
1.1	5	1.1	6
1.2	13	1.2	8
2.1	20	1.3	11
3.1	45	2.1	18-19
3.2	46	2.2	21
3.3	47	2.3	21
3.4	50	2.4	22-23
3.5	51	2.5	25-26
3.6	55	2.6	28
3.7	56	2.7	32
3.8	57	2.8	34
3.9	68	2.9	39
3.10	59	2.10	40
3.11	60	3.1	43
3.12	61	3.2	43
3.13	62	3.3	44
3.14	63	3.4	44
3.15	64	3.5	44
4.1	68	3.6	48-49
		4.1	80
		4.2	81
		4.3	81

## 7 Anhang

Tabellarische Auflistung der in der Literatur beschriebenen Proteinveränderungen im menschlichen Liquor bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, die die gleichen Proteine betreffen, die auch in dieser vorliegenden Arbeit als im Liquor bei DLB reguliert gefunden wurden.

Reguliertes Protein	Studie	Diagnose des Patientenkollektivs	Regulation
CO4A	Yin et al. 2009	AD	↓
CO3	Wang et al. 2011	AD	↑
		MSA	↓
TTHY	Abdi et al. 2006	DLB	↑
	Gloeckner et al. 2008	AD und NPH	↓
	Perrin et al. 2011	AD	↓
	Yin et al. 2009	AD	↑
PEDF	Abraham et al. 2011	AD	-
	Davidsson et al. 2002	FTD	↓
	Perrin et al. 2011	AD	↓
	Yin et al. 2009	AD und PD	↑
THRB	Abdi et al. 2006	PD	↓
	Huang YC et al. 2011	Chorea Huntington	↑
ANGT	Abdi et al. 2006	AD	↓
		DLB	↑
	Perrin et al. 2011	AD	↓
	Yin et al. 2009	AD und PD	↑
	Zhang et al. 2005	AD	↑
ITIH4	Perrin et al. 2011	AD	↓
ALBU	-	-	-
ALDOC	-	-	-
KPYM	-	-	-
ENOA	-	-	-

Reguliertes Protein	Studie	Diagnose des Patientenkollektivs	Regulation
PTGDS	Perrin et al. 2011	AD	↓
	Martins-De-Souza et al. 2010	Schizophrenie	↑
	Yin et al. 2009	AD	↑
SAP3	Zhang et al. 2005	AD	↓
APOA4	Huang YC et al. 2011	Chorea Huntington	↑
CNTN1	Yin et al. 2009	AD	↑
CSTN1	Perrin et al. 2011	AD	↓
	Yin et al. 2009	PD	↑
GELS	Perrin et al. 2011	AD	↓
	Yin et al. 2009	AD und PD	↑
CGA	Abdi et al. 2006	AD	↓
	Simonsen et. al 2008	AD	↓
	Perrin et al. 2011	AD	↓
IGFBP2	Craig-Schapiro et al. 2011	AD	↑
	Zhang et al. 2005	AD	↑ (36kDa)/↓
APLP1	Abdi et al. 2006	PD	↓
B3GN1	Abdi et al. 2006	DLB	↑
	Perrin et al. 2011	AD	↓
	Zhang et al. 2005	AD	↓
GPX3	-	-	-
CYTC	Abdi et al. 2006	PD	↓
	Craig-Schapiro et al. 2011	AD	↓
	Maetzler et al. 2010	DLB	↓
	Perrin et al. 2011	AD	↓
	Simonsen et al. 2008	AD	↑/↓ (abh. v. Isoform)
	Yin et al. 2009	AD	↑

(MSA Multisystematrophie, NPH Normaldruckhydrozephalus)

## 8 Literaturverzeichnis

Aarsland D, Perry R, Larsen JP, McKeith IG, O'Brien JT, Perry EK, Burn D, Ballard CG (2005): Neuroleptic sensitivity in Parkinson's disease and parkinsonian dementias. *J Clin Psychiatry* 66, 633-637

Abdi F, Quinn JF, Jankovic J, McIntosh M, Leverenz JB, Peskind E, Nixon R, Nutt J, Chung K, Zabetian C et al. (2006): Detection of biomarkers with a multiplex quantitative proteomic platform in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis* 9(3), 293-348

Abraham JD, Calvayrac-Pawlowski S, Cobo S, Salvetat N, Vicat G, Molina L, Touchon J, Michel BF, Molina F, Verdier JM, Farih J, Mourton-Gilles C (2011): Combined measurement of PEDF, haptoglobin and tau in cerebrospinal fluid improves the diagnostic discrimination between alzheimer's disease and other dementias. *Biomarkers* 16(2), 161-171

Adam BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, Semmes OJ, Schellhammer PF, Yasui Y, Feng Z et al. (2002): Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 62(13), 3609-3614

Adlerz L, Holback S, Multhaup G, Iverfeldt K (2007): IGF-1-induced processing of the amyloid precursor protein family is mediated by different signaling pathways. *J Biol Chem* 282(14), 10203-10209

Ahmed N, Rice GE (2005): Strategies for revealing lower abundance proteins in two-dimensional protein maps. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 815, 39-50

Alzheimer A (1907): Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin* 64, 146-148

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV-TR), 4th edn-text revised. Washington, DC: 2000

Antequera D, Vargas T, Ugalde C, Spuch C, Molina JA, Ferrer I, Bermejo-Pareja F, Carro E (2009): Cytoplasmic gelsolin increases mitochondrial activity and reduces Abeta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 36(1), 42-50

Arai T, Miklossy J, Klegeris A, Guo JP, McGeer PL (2006): Thrombin and prothrombin are expressed by neurons and glial cells and accumulate in neurofibrillary tangles in Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 65(1), 19-25

Arakaki TL, Pezza JA, Cronin MA, Hopkins CE, Zimmer DB, Tolan DR, Allen KN (2004): Structure of human brain fructose 1,6-(bis)phosphate aldolase: linking isozyme structure with function. *Protein Sci* 13(12), 3077-3084

Ballard C, Grace J, McKeith IG (1998): Neuroleptic sensitivity in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Lancet* 351, 1032

Ballard C, O'Brien J, Gray A, Cormack F, Ayre G, Rowan E, Thompson P, Bucks R, McKeith I, Walker M et al. (2001 a): Attention and Fluctuating Attention in Patients With Dementia With Lewy Bodies and Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 58, 977-982

Ballard C, O'Brien J, Morris C, Barber R, Swann A, Neill D and McKeith I (2001 b): The progression of cognitive impairment in dementia with Lewy bodies, vascular dementia and Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 16, 499-503

Ballard C, O'Brien J, Swann A, Thompson P, Neill D, McKeith IG (2001 c): The natural history of psychosis and depression in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease: persistence and new cases over 1 year of follow-up. *J Clin Psychiatry* 62, 46-49

Barber R, Ballard C, McKeith I, Gholkar A, O'Brien JT (2000): MRI volumetric study of dementia with Lewy bodies: a comparison with AD and vascular dementia. *Neurology* 54(6), 1304-1309

Bennett S, Grant MM, Aldred S (2009): Oxidative stress in vascular dementia and Alzheimer's disease: a common pathology. *J Alzheimers Dis* 17(2), 245-257

Berglund EO, Murai KK, Fredette B, Sekerková G, Marturano B, Weber L, Mugnaini E, Ranscht B (1999): Ataxia and abnormal cerebellar microorganization in mice with ablated contactin gene expression. *Neuron* 24(3), 739-750

Bermejo-Pareja F, Benito-León J, Vega S, Medrano MJ, Román, Neurological Disorders in Central Spain (NEDICES) Study Group (2008): Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. *J Neurol Sci* 264, 63-72

Bian H, Van Swieten JC, Leight S, Massimo L, Wood E, Forman M, Moore P, de Koning I, Clark CM, Rosso S et al. (2008): CSF biomarkers in frontotemporal lobar degeneration with known Pathology. *Neurology* 70, 1827-1835

Bickel H (2000): Dementia syndrome and Alzheimer disease: an assessment of morbidity and annual incidence in Germany. *Gesundheitswesen* 62, 211-218

Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westeremeier R, Postel W (1982): Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 6, 317-339

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99

Boeve B, Silber M, Ferman T, Lucas J, Parisi J (2001): Association of REM sleep behavior disorder and neurodegenerative disease may reflect an underlying synucleinopathy. *Mov Disord* 16, 622-630

Boeve BF, Silber MH, Ferman TJ (2004): REM Sleep Behavior Disorder in Parkinson's Disease and Dementia With Lewy Bodies. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 17, 146-157

Bogaerts V, Engelborghs S, Kumar-Singh S, Goossens D, Pickut B, van der Zee J, Sleegers K, Peeters K, Martin J-J, Del-Favero J, Gasser T et al. (2007): A novel locus for dementia with Lewy bodies: a clinically and genetically heterogeneous disorder. *Brain* 130, 2277-2291

Bonanni L, Thomas A, Tiraboschi P, Perfetti B, Varanese S, Onofri (2008): EEG comparisons in early Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with dementia patients with a 2-year follow-up. *Brain* 131, 690-705

Bradshaw J, Saling M, Hopwood M, Anderson V, Brodtmann A (2004): Fluctuating cognition in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease is qualitatively distinct. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75, 382-387

Brett FM, Henson C, Staunton H (2002): Familial diffuse Lewy body disease, eye movement abnormalities, and distribution of pathology. *Arch Neurol* 59(3), 464-467

Briel RCG, McKeith IG, Barker WA, Hewitt Y, Perry RH, Ince PG, Fairbairn AF (1999): EEG findings in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66, 401-403

Butterfield DA, Poon HF, St Clair D, Keller JN, Pierce WM, Klein JB, Markesbery WR (2006): Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 22(2), 223-232

Byrne EJ, Lennox G, Lowe J, Godwin-Austen RB (1989): Diffuse Lewy body disease: clinical features in 15 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 52, 709-717

Carrette O, Burkhard PR, Sanchez JC, Hochstrasser DF (2006): State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis: a key tool of proteomics research. *Nat Protoc* 1(2), 812-823

Cheng D, Jenner AM, Shui G, Cheong WF, Mitchell TW, Nealon JR, Kim WS, McCann H, Wenk MR, Halliday GM et al. (2011): Lipid pathway alterations in Parkinson's disease primary visual cortex. *PLoS One* 6(2), e17299

Chu CT, Caruso JL, Cummings TJ, Ervin J, Rosenberg C, Hulette CM (2000): Ubiquitin immunohistochemistry as a diagnostic aid for community pathologists evaluating patients who have dementia. *Mod Pathol* 13(4), 420-426

Claassen DO, Josephs KA, Ahlskog JE, Silber MH, Tippmann-Peikert M, Boeve BF (2010): REM sleep behavior disorder preceding other aspects of synucleinopathies by up to half a century. *Neurology* 75, 494-499

Clark TA, Lee HP, Rolston RK, Zhu X, Marlatt MW, Castellani RJ, Nunomura A, Casadesus G, Smith MA, Lee HG et al. (2010): Oxidative Stress and its Implications for Future Treatments and Management of Alzheimer Disease. *Int J Biomed Sci* 6(3), 225-227

Collerton D, Burn D, McKeith I, O'Brien J (2003): Systematic review and meta-analysis show that dementia with Lewy bodies is a visual-perceptual and attentionalexecutive dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 16, 229-237

Colloby SJ, Firbank MJ, Pakrasi S, Lloyd JJ, Driver I, McKeith IG, Williams ED, O'Brien JT (2008): A comparison of 99mTc-exametazime and 123I-FP-CIT SPECT imaging in the differential diagnosis of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Int Psychogeriatr* 20, 1124-1140

Coyle JT, Puttfarcken P (1993): Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262(5134), 689-695

Craig-Schapiro R, Kuhn M, Xiong C, Pickering EH, Liu J, Misko TP, Perrin RJ, Bales KR, Soares H, Fagan AM et al. (2011): Multiplexed immunoassay panel identifies novel CSF biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis and prognosis. *PLoS One* 6(4):e18850.

Cui Y, Huang M, He Y, Zhang S, Luo Y (2011): Genetic ablation of apolipoprotein A-IV accelerates Alzheimer's disease pathogenesis in a mouse model. *Am J Pathol* 178(3), 1298-1308

Davidsson P, Sjögren M, Andreasen N, Lindbjer M, Nilsson CL, Westman-Brinkmalm A, Blennow K (2002): Studies of the pathophysiological mechanisms in frontotemporal dementia by proteome analysis of CSF proteins. *Brain Res Mol Brain Res* 109(1-2), 128-133

Del-Ser T, Munoz DG, Hachinski V (1996): Temporal pattern of cognitive decline and incontinence is different in Alzheimer's disease and diffuse Lewy body disease. *Neurology* 46, 682-686

Dickson DW, Ruan D, Crystal H, Mark MH, Davies P, Kress Y, Yen SH (1991): Hippocampal degeneration differentiates diffuse Lewy body disease (DLBD) from Alzheimer's disease: light and electron microscopic immunocytochemistry of CA2-3 neurites specific to DLBD. *Neurology* 41, 1402-1409

Doggui S, Brouillette J, Chabot JG, Farso M, Quirion R (2010): Possible involvement of transthyretin in hippocampal beta-amyloid burden and learning behaviors in a mouse model of Alzheimer's disease (TgCRND8). *Neurodegener Dis* 7(1-3), 88-95

Dubois B, Feldman HH, Jacova C, DeKosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G et al. (2007): Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 6, 734-746

Echan LA, Tang HY, Ali-Khan N, Lee K, Speicher DW (2005): Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics* 5(13), 3292-3303

Fabelo N, Martín V, Santpere G, Marín R, Torrent L, Ferrer I, Díaz M (2011): Severe Alterations in Lipid Composition of Frontal Cortex Lipid Rafts from Parkinson's Disease and Incidental Parkinson's Disease. *Mol Med* 17(9-10), 1107-1118

Ferman TJ, Boeve BF, Smith GE, Silber MH, Kokmen E, Peterson RC, Ivnik RJ (1999): REM sleep behavior disorder and dementia: cognitive differences when compared with AD. *Neurology* 52, 951-957

Ferman TJ, Smith GE, Boeve BF, Ivnik RJ, Petersen RC, Knopman D, Graff-Radford N, Parisi J, Dickson DW (2004): DLB fluctuations: specific features that reliably differentiate DLB from AD and normal aging. *Neurology* 62(2), 181-187

Fischer P, Krenn Y (2006): Diagnose und Therapie der sogenannten Lewy-Körperchen-Demenz. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie* 7(1), 32-42

Fonseca MI, Chu SH, Berci AM, Benoit ME, Peters DG, Kimura Y, Tenner AJ (2011): Contribution of complement activation pathways to neuropathology differs among mouse models of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 8(1), 4

Forster E, Lewy FH: Paralysis agitans: I. Pathologische Anatomie; in: *Handbuch der Neurologie* (hrsg. v. M. Lewandowsky). Springer, Berlin 1912, 920-933

Gawinecka J, Dieks J, Asif AR, Carimalo J, Heinemann U, Streich JH, Dihazi H, Schulz-Schaeffer W, Zerr I (2010): Codon 129 polymorphism specific cerebrospinal fluid proteome pattern in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and the implication of glycolytic enzymes in prion-induced pathology. *J Proteome Res* 9(11), 5646-5657

Gloeckner SF, Meyne F, Wagner F, Heinemann U, Krasnianski A, Meissner B, Zerr I (2008). Quantitative analysis of transthyretin, tau and amyloid- $\beta$  in patients with dementia. *J Alzheimers Dis* 14, 17-25

Gomez-Tortosa E, Gonzalo I, Fanjul S, Sainz MJ, Cantarero S, Cemillan C, Yebenes JG, del Ser T (2003): Cerebrospinal fluid markers in dementia with Lewy Bodies compared with Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 60, 1218-1222

Good DM, Thongboonkerd V, Novak J, Bascands JL, Schanstra JP, Coon JJ, Dominiczak A, Mischak H (2007): Body fluid proteomics for biomarker discovery: lessons from the past hold the key to success in the future. *J Proteome Res* 6(12), 4549-55

Goto H, Ishii K, Uemura T, Miyamoto N, Yoshikawa T, Shimada K, Ohkawa S (2010): Differential diagnosis of dementia with Lewy Bodies and Alzheimer Disease using combined MR imaging and brain perfusion single-photon emission tomography. *AJNR Am J Neuroradiol* 31(4), 720-725

Grace JB, Walker MP, McKeith IG (2000): A comparison of sleep profiles in patients with dementia with lewy bodies and Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 15 (11), 1028-1033

Graves PR, Haystead THJ (2002): Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 39–63

Guilarte TR (2010): APLP1, Alzheimer's-like pathology and neurodegeneration in the frontal cortex of manganese-exposed non-human primates. *Neurotoxicology* 31(5), 572-574

Güntert A, Campbell J, Saleem M, O'Brien DP, Thompson AJ, Byers HL, Ward MA, Lovestone S (2010): Plasma gelsolin is decreased and correlates with rate of decline in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 21(2), 585-596

Hansen LA, Salmon D, Galasko D, Masliah E, Katzman R, De-Teresa R, Thal L, Pay MM, Hofstetter R, Klauber M et al. (1990): The Lewy body variant of Alzheimer's disease: a clinical and pathologic entity. *Neurology* 40, 1-8

Harding AJ, Broe GA, Halliday GM (2002): Visual hallucinations in Lewy body disease relate to Lewy bodies in the temporal lobe. *Brain* 125, 391-403

Heidebrink JL (2002): Is dementia with Lewy bodies the second most common cause of dementia? *J Geriatr Psychiatry Neurol* 15, 182-187

Herholz K, Carter SF, Jones M (2007): Positron emission tomography imaging in dementia. *British J Radiol* 80 Spec No 2, 160-167

Holmes C, Cairns N, Lantos P, Mann A (1999): Validity of current clinical criteria for Alzheimer's disease, vascular dementia and dementia with Lewy bodies. *Br J Psychiatry* 174, 45-50

Huang HL, Stasyk T, Morandell S, Mogg M, Schreiber M, Feuerstein I, Huck CW, Stecher G, Bonn GK, Huber LA (2005): Enrichment of low-abundant serum proteins by albumin/immunoglobulin G immunoaffinity depletion under partly denaturing conditions. *Electrophoresis* 26(14), 2843-2849

Huang YC, Wu YR, Tseng MY, Chen YC, Hsieh SY, Chen CM (2011): Increased prothrombin, apolipoprotein A-IV, and haptoglobin in the cerebrospinal fluid of patients with Huntington's disease. *PLoS One* 6(1), e15809

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

Imamura T, Ishii K, Hirono N, Hashimoto M, Tanimukai S, Kazui H, Hanihara T, Sasaki M, Mori E (2001): Occipital glucose metabolism in dementia with Lewy bodies with and without Parkinsonism: a study using positron emission tomography. *Dement Geriatr Cogn Disord* 12, 194-197

Jenner P, Dexter DT, Sian J, Schapira AH, Marsden CD (1992): Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Ann Neurol* 32, 82-87

Ji L, Chauhan A, Wegiel J, Essa MM, Chauhan V (2009): Gelsolin is proteolytically cleaved in the brains of individuals with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 18(1), 105-111

Kashyap RS, Nayak AR, Deshpande PS, Kabra D, Purohit HJ, Taori GM, Daginawala HF (2009): Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 is a novel marker of acute ischemic stroke. *Clin Chim Acta* 402(1-2), 160-163

Katsuse O, Iseki E, Marui W, Kosaka K (2003): Developmental stages of cortical Lewy bodies and their relation to axonal transport blockage in brains of patients with dementia with Lewy bodies. *J Neurol Sci* 211(1-2), 29-35

Kim TW, Wu K, Xu JL, McAuliffe G, Tanzi RE, Wasco W, Black IB (1995): Selective localization of amyloid precursor-like protein 1 in the cerebral cortex postsynaptic density. *Brain Res Mol Brain Res* 32(1), 36-44

Konecna A, Frischknecht R, Kinter J, Ludwig A, Steuble M, Meskenaite V, Indermühle M, Engel M, Cen C, Mateos JM et al. (2006): Calsyntenin-1 docks vesicular cargo to kinesin-1. *Mol Biol Cell* 17(8), 3651-3663

Kosaka K (1978): Lewy bodies in cerebral cortex. Report of three cases. *Acta Neuropathol* 42,127-134

Kosaka K, Yoshimura M, Ikeda K, Budka H (1984): Diffuse type of Lewy body disease: progressive dementia with abundant cortical Lewy bodies and senile changes of varying degree-a new disease? *Clin Neuropathol* 3, 185-192

Kuzuhara S, Yoshimura M (1993): Clinical and neuropathological aspects of diffuse Lewy body disease in the elderly. *Adv Neurol* 60, 464-649

Lechner T, Adlassnig C, Humpel C, Kaufmann WA, Maier H, Reinstadler-Kramer K, Hinterhölzl J, Mahata SK, Jellinger KA, Marksteiner J (2004): Chromogranin peptides in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 39(1), 101-113

Lee HJ, Kim C, Lee SJ (2010): Alpha-synuclein stimulation of astrocytes: Potential role for neuroinflammation and neuroprotection. *Oxid Med Cell Longev* 3(4), 283-287

Lennox G, Lowe J, Landon M, Byrne EJ, Mayer RJ, Goldwin-Austen RB (1989 a): Diffuse Lewy body disease: correlative neuropathology using anti-ubiquitin immunocytochemistry. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 52, 1236-1247

Lennox G, Lowe J, Morrell R, Landon M, Mayer RJ (1989 b): Anti-ubiquitin immunocytochemistry is more sensitive than conventional techniques in the detection of diffuse Lewy body disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 52, 67-71

Lippa CF, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ (1999): Antibodies to alphasynuclein detect Lewy bodies in many Down's syndrome brains with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 45, 353-357

Litvan I, MacIntyre A, Goetz CG, Wenning GK, Jellinger K, Verny M, Bartko JJ, Jankovic J, McKee A, Brandel JP et al. (1998): Accuracy of the clinical diagnoses of Lewy body disease, Parkinson disease, and dementia with Lewy bodies. *Arch Neurol* 55, 969-978

Lobotesis K, Fenwick JD, Phipps A, Ryman A, Swann A, Ballard C, McKeith IG, O'Brien JT (2001): Occipital hypoperfusion on SPECT in dementia with Lewy bodies but not AD. *Neurology* 56, 643-649

Lopez OL, Becker JT, Kaufer DI, Hamilton RL, Sweet RA, Klunk W, DeKosky ST (2002): Research Evaluation and Prospective Diagnosis of Dementia With Lewy Bodies. *Arch Neurol* 59, 43-46

Luis CA, Barker WW, Gajraj K, Harwood D, Petersen R, Kashuba A, Waters C, Jimison P, Pearl G, Petito C et al. (1999): Sensitivity and specificity of three clinical criteria for dementia with Lewy bodies in an autopsyverified sample. *Int J Geriatr Psychiatry* 14, 526-533

Maetzler W, Schmid B, Synofzik M, Schulte C, Riester K, Huber H, Brockmann K, Gasser T, Berg D, Melms A (2010): The CST3 BB genotype and low cystatin C cerebrospinal fluid levels are associated with dementia in Lewy body disease. *J Alzheimers Dis* 19(3), 937-942

Martí MJ, Tolosa E, Campdelacreu J (2003): Clinical overview of the synucleinopathies. *Mov Disord* 18(6), 21-27

Martín V, Fabelo N, Santpere G, Puig B, Marín R, Ferrer I, Díaz M (2010): Lipid alterations in lipid rafts from Alzheimer's disease human brain cortex. *J Alzheimers Dis* 19(2), 489-502

Martins-De-Souza D, Wobrock T, Zerr I, Schmitt A, Gawinecka J, Schneider-Axmann T, Falkai P, Turck CW (2010): Different apolipoprotein E, apolipoprotein A1 and prostaglandin-H2 D-isomerase levels in cerebrospinal fluid of schizophrenia patients and healthy controls. *World J Biol Psychiatry* 11(5), 719-728

Matsuzaki K (2011): Formation of Toxic Amyloid Fibrils by Amyloid  $\beta$ -Protein on Ganglioside Clusters. *J Alzheimers Dis* 2011, 956104

McKeith I (2002): Dementia with Lewy Bodies. *Br J Psychiatry* 180, 144-147

McKeith I, Fairbairn A, Perry R, Thompson P, Perry E (1992 a): Neuroleptic sensitivity in patients with senile dementia of Lewy body type. *BMJ* 305,673-678

McKeith I, Perry RH, Fairbairn AF, Jabeen S, Perry EK (1992 b): Operational criteria for senile dementia of Lewy body type (SDLT). *Psychol Med* 22, 911-922

McKeith I, Fairbairn AF, Perry RH, Thompson P (1994): The clinical diagnosis and misdiagnosis of senile dementia of Lewy body type (SDLT). *Br J Psychiatry* 165, 324-332

McKeith I, Galasko D, Kosaka K, Perry EK, Dickson DW, Hansen LA, Salmon DP, Lowe J, Mirra SS, Byrne EJ et al. (1996): 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

McKeith I, Perry EK, Perry RH. (1999): Report of the second dementia with Lewy body international workshop: diagnosis and treatment. Consortium on Dementia with Lewy Bodies. *Neurology* 53(5), 902-905

McKeith I, Mintzer J, Aarsland D, Burn D, Chiu H, Cohen-Mansfield J, Dickson D, Dubois B, Duda JE, Feldman H et al.; International Psychogeriatric Association Expert Meeting on DLB (2004): Dementia with Lewy bodies. *Lancet Neurol* 3, 19-28

McKeith I, Dickson DW, Lowe J, Emre M, O'Brien JT, Feldmann H, Cummings J, Duda JE, Lippa C, Perry EK et al., for the Consortium on DLB (2005): Diagnosis and management of dementia with Lewy Bodies, Third report of the DLB consortium. *Neurology* 65, 1863-1872

McKeith I, O'Brien J, Walker Z, Tatsch K, Booij J, Darcourt J, Padovani A, Giubbinì R, Bonuccelli U, Volterrani D et al.; DLB Study Group (2007): Sensitivity and specificity of dopamine transporter imaging with 123I-FP-CIT SPECT in dementia with Lewy bodies: a phase III, multicentre study. *Lancet Neurol* 6, 305-313

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984): Clinical diagnosis of Alzheimer's disease. Report of the NINCDS-ADRDA Work Group\* under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34, 939-944

Mega MS, Masterman DL, Benson DF, Vinters HV, Tomiyasu U, Craig AH, Foti DJ, Kaufer D, Scharre DW, Fairbanks L et al. (1996): Dementia with Lewy bodies: Reliability and validity of clinical and pathologic criteria. *Neurology* 47, 1403-1409

Merdes AR, Hansen LA, Jeste DV, Galasko D, Hofstetter CR, Ho GJ, Thal LJ, Corey-Bloom J (2003): Influence of Alzheimer pathology on clinical diagnostic criteria in dementia with Lewy bodies. *Neurology* 60, 1586-1590

Mi W, Pawlik M, Sastre M, Jung SS, Radvinsky DS, Klein AM, Sommer J, Schmidt SD, Nixon RA, Mathews PM et al. (2007): Cystatin C inhibits amyloid-beta deposition in Alzheimer's disease mouse models. *Nat Genet* 39(12), 1440-1442

Millioni R, Tolin S, Puricelli L, Sbrignadello S, Fadini GP, Tessari P, Arrigoni G (2011): High abundance proteins depletion vs low abundance proteins enrichment: comparison of methods to reduce the plasma proteome complexity. *PLoS One* 6(5), e19603

Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G, Berg L (1991): The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment for Alzheimer's disease. *Neurology* 41 479-486

Miyamoto T, Miyamoto M, Suzuki K, Nishibayashi M, Iwanami M, Hirata K (2008): 123I-MIBG cardiac scintigraphy provides clues to the underlying neurodegenerative disorder in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Sleep* 31, 717-723

Molander-Melin M, Blennow K, Bogdanovic N, Dellheden B, Månsson JE, Fredman P (2005): Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional disease development; increased density of gangliosides GM1 and GM2 and loss of cholesterol in detergent-resistant membrane domains. *J Neurochem* 92(1), 171-182

Mollenhauer B, Bibl M, Wiltfang J, Steinacker P, Ciesielczyk B, Neubert K, Trenkwalder C, Otto M (2006): Total tau protein, phosphorylated tau (181p) protein, beta-amyloid(1-42), and beta-amyloid(1-40) in cerebrospinal fluid of patients with dementia with Lewy bodies. *Clin Chem Lab Med* 44, 192-195

Mollenhauer B, Steinacker P, Bahn E, Bibl M, Brechlin P, Schlossmacher MG, Locascio JJ, Wiltfang J, Kretzschmar HA, Poser S et al. (2007): Serum Heart-Type Fatty Acid-Binding Protein and Cerebrospinal Fluid Tau: Marker Candidates for Dementia with Lewy Bodies. *Neurodegener Dis* 4, 366-375

Mollenhauer B, Cullen V, Kahn I, Krastins B, Outeiro TF, Pepivani I, Ng J, Schulz-Schaeffer W, Kretzschmar HA, McLean PJ, Trenkwalder C, Sarracino DA, Vonsattel JP, Locascio JJ, El-Agnaf OM, Schlossmacher MG (2008): Direct quantification of CSF alpha-synuclein by ELISA and first cross-sectional study in patients with neurodegeneration. *Exp Neurol* 213(2), 315-325

Mosimann UP, McKeith IG (2003): Dementia with Lewy bodies - diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly* 133, 131-142

Mulugeta E, Londos E, Ballard C, Alves G, Zetterberg H, Blennow K, Skoeth R, Minthon L, Aarsland D (2011): CSF amyloid  $\beta$ 38 as a novel diagnostic marker for dementia with Lewy bodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82, 160-164

Navarro A, Boveris A, Báñez MJ, Sánchez-Pino MJ, Gómez C, Muntané G, Ferrer I (2009): Human brain cortex: mitochondrial oxidative damage and adaptive response in Parkinson disease and in dementia with Lewy bodies. *Free Radic Biol Med* 46(12), 1574-1580

Nerl C, Mayeux R, O'Neill GJ (1984): HLA-linked complement markers in Alzheimer's and Parkinson's disease: C4 variant (C4B2) a possible marker for senile dementia of the Alzheimer type. *Neurology* 34(3), 310-314

Neumann S, Schöbel S, Jäger S, Trautwein A, Haass C, Pietrzik CU, Lichtenthaler SF (2006): Amyloid precursor-like protein 1 influences endocytosis and proteolytic processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 281(11), 7583-7594

O'Brien JT, McKeith IG, Walker Z, Tatsch K, Booij J, Darcourt J, Marquardt M, Reiningner C and the DLB Study Group (2009): Diagnostic accuracy of 123I-FP-CIT SPECT in possible dementia with Lewy bodies. *Br J Psychiatry* 194, 34-39

Ohrfelt A, Grognet P, Andreasen N, Wallin A, Vanmechelen E, Blennow K, Zetterberg H (2009): Cerebrospinal fluid alpha-synuclein in neurodegenerative disorders - a marker of synapse loss? *Neurosci Lett* 450(3), 332-335

Okazaki H, Lipton LS, Aronson SM (1961): Diffuse intracytoplasmic ganglionic inclusions (Lewy type) associated with progressive dementia and quadriplegia in flexion. *J Neuropathol Exp Neurol* 20, 237-44

Olichney JM, Galasko D, Salmon DP, Hofstetter CR, Hansen LA, Katzman R, Thal LJ (1998): Cognitive decline is faster in Lewy body variant than in Alzheimer's disease. *Neurology* 51, 351-357

Opii WO, Joshi G, Head E, Milgram NW, Muggenburg BA, Klein JB, Pierce WM, Cotman CW, Butterfield DA (2008): Proteomic identification of brain proteins in the canine model of human aging following a long-term treatment with antioxidants and a program of behavioral enrichment: relevance to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 29(1), 51-70

Pancholi V (2001): Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* 58(7), 902-920

Parnetti L, Lanari A, Amici S, Gallai V, Vanmechelen E, Hulstaert F; Phospho-Tau International Study Group (2001): CSF phosphorylated tau is a possible marker for

discriminating Alzheimer's disease from dementia with Lewy bodies. Phospho-Tau International Study Group. *J Neurol Sci* 22, 77-78

Perez F, Helmer C, Dartigues JF, Auriacombe S (2010): A 15-year population-based cohort study of the incidence of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies in an elderly French cohort. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81,742-746

Perluigi M, Poon HF, Maragos W, Pierce WM, Klein JB, Calabrese V, Cini C, De Marco C, Butterfield DA (2005): Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in r6/2 transgenic mice: a model of Huntington disease. *Mol Cell Proteomics* 4(12), 1849-1861

Perrin RJ, Craig-Schapiro R, Malone JP, Shah AR, Gilmore P, Davis AE, Roe CM, Peskind ER, Li G, Galasko DR et al. (2011): Identification and validation of novel cerebrospinal fluid biomarkers for staging early Alzheimer's disease. *PLoS One* 6(1), e16032

Perry EK, Marshall E, Kerwin J, Smith CJ, Jabeen S, Cheng AV, Perry RH (1990): Evidence of a Monoaminergic-Cholinergic Imbalance Related to Visual Hallucinations in Lewy Body Dementia. *J Neurochem* 55, 1454-1456

Perry EK, Haroutunian V, Davis KL, Levy R, Lantos P, Egger S, Honavar M, Dean A, Griffiths M, McKeith IG et al. (1994): Neocortical cholinergic activities differentiate Lewy body dementia from classical Alzheimer's disease. *Neuroreport* 5, 747-749

Perry RH, Irving D, Blessed G, Fairbairn A, Perry EK (1990): Senile dementia of Lewy body type. A clinically and neuropathologically distinct form of Lewy body dementia in the elderly. *J Neurol Sci* 95, 119-139

Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC et al. (2002): Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 359(9306), 572-577

Piggott MA, Marshall EF, Thomas N, Lloyd S, Court JA, Jaros E, Burn D, Johnson M, Perry RH, McKeith IG et al. (1999): Striatal dopaminergic markers in dementia with Lewy bodies, Alzheimer's and Parkinson's diseases: rostrocaudal distribution. *Brain* 122, 1449-1468

Poon HF, Frasier M, Shreve N, Calabrese V, Wolozin B, Butterfield DA (2005): Mitochondrial associated metabolic proteins are selectively oxidized in A30P alpha-synuclein transgenic mice - a model of familial Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 18(3), 492-498

Power JH, Blumbergs PC (2009): Cellular glutathione peroxidase in human brain: cellular distribution, and its potential role in the degradation of Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol* 117(1), 63-73

Quinn TJ, Gallacher J, Deary IJ, Lowe GD, Fenton C, Stott DJ (2011): Association between circulating hemostatic measures and dementia or cognitive impairment: systematic review and meta-analyzes. *J Thromb Haemost* 9(8), 1475-1482

Rahkonen T, Eloniemi-Sulkaval U, Rissanen S, Vatanen A, Viramol P, Sulkaval R (2003): Dementia with Lewy bodies according to the consensus criteria in a general population aged 75 years or older. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74, 720-724

Ralph L, Powell J, Howard D, Whitworth AB, Garrard P, Hodges JR (2001): Semantic memory is impaired in both dementia with Lewy bodies and dementia of Alzheimer's type: a comparative neuropsychological study and literature review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70(2), 149-156

Reesink FE, Lemstra AW, van Dijk KD, Berendse HW, van de Berg WD, Klein M, Blankenstein MA, Scheltens P, Verbeek MM, van der Flier WM (2010): CSF  $\alpha$ -synuclein does not discriminate dementia with Lewy bodies from Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 22(1), 87-95

Rensink AA, Otte-Höller I, ten Donkelaar HJ, De Waal RM, Kremer B, Verbeek MM (2004): Differential gene expression in human brain pericytes induced by amyloid-beta protein. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30(3), 279-291

Rhein V, Eckert A (2007): Effects of Alzheimer's amyloid-beta and tau protein on mitochondrial function - role of glucose metabolism and insulin signalling. *Arch Physiol Biochem* 113(3), 131-141

Rogers SL, Farlow MR, Doody RS, Mohs R, Friedhoff LT and Donepezil Study Group (1998): A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 50, 136-145

Sasaki K, Kurata-Miura K, Ujita M, Angata K, Nakagawa S, Sekine S, Nishi T, Fukuda M (1997): Expression cloning of cDNA encoding a human beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase that is essential for poly-N-acetyllactosamine synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(26), 14294-14299

Savaskan E (2005): The role of the brain renin-angiotensin system in neurodegenerative disorders. *Curr Alzheimer Res* 2(1), 29-35

Shen L, Pearson KJ, Xiong Y, Lo CM, Tso P, Woods SC, Davidson WS, Liu M (2008): Characterization of apolipoprotein A-IV in brain areas involved in energy homeostasis. *Physiol Behav* 95, 161-167

Shiozaki K, Iseki E, Uchiyama H, Watanabe Y, Haga T, Kameyama K, Ikeda T, Yamamoto T, Kosaka K (1999): Alterations of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in diffuse Lewy body disease: relation to Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67, 209-213

Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD (1994): Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 36(3), 348-355

Simonsen AH, McGuire J, Podust VN, Davies H, Minthon L, Skoog I, Andreasen N, Wallin A, Waldemar G, Blennow K (2008): Identification of a novel panel of cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 29(7), 961-968

Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998): Alpha-synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6469-6473

Steuble M, Gerrits B, Ludwig A, Mateos JM, Diep TM, Tagaya M, Stephan A, Schätzle P, Kunz B, Streit P et al. (2010): Molecular characterization of a trafficking organelle: dissecting the axonal paths of calyntenin-1 transport vesicles. *Proteomics* 10(21), 3775-3788

Stoeckli ET (2010): Neural circuit formation in the cerebellum is controlled by cell adhesion molecules of the Contactin family. *Cell Adh Migr* 4(4), 523-526

Tannu NS, Hemby SE (2006): Methods for proteomics in neuroscience. *Prog Brain Res* 158, 41-82

Tizon B, Ribe EM, Mi W, Troy CM, Levy E (2010): Cystatin C protects neuronal cells from amyloid-beta-induced toxicity. *J Alzheimers Dis* 19(3), 885-894

Tombran-Tink J (2005): The neuroprotective and angiogenesis inhibitory serpin, PEDF: new insights into phylogeny, function, and signaling. *Front Biosci* 10, 2131-2149

Tsuang DW, DiGiacomo L, Bird TD (2004): Familial Occurrence of Dementia with Lewy Bodies. *Am J Geriatr Psychiatry* 12(2), 179-188

Unlü M, Morgan ME, Minden JS (1997): Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18(11), 2071-2077

Vargas T, Antequera D, Ugalde C, Spuch C, Carro E (2010): Gelsolin restores A beta-induced alterations in choroid plexus epithelium. *J Biomed Biotechnol* 2010, 805405.

Vergheze J, Crystal HA, Dickson DW, Lipton RB (1999): Validity of clinical criteria for the diagnosis of dementia with Lewy bodies. *Neurology* 53, 1974-1982

Wada-Isoe K, Kitayama M, Nakaso K, Nakashima K (2007): Diagnostic markers for diagnosing dementia with Lewy bodies: CSF and MIBG cardiac scintigraphy study. *J Neurol Sci* 260, 33-37

Walker MP, Ballard CG, Ayre GA, Wesnes K, Cummings JA, McKeith IG, O'Brien JT (2000): The Clinician Assessment of Fluctuation and the One Day Fluctuation Assessment Scale Two methods to assess fluctuating confusion in dementia. *Br J Psychiatry* 177, 252-256

Walker Z, Allen RL, Shergill S, Mullan E, Katona CL (2000): Three year survival in patients with a clinical diagnosis of dementia with Lewy bodies. *Int J Geriatr Psychiatry* 15, 267-273

Walker Z, Costa DC, Walker RHW, Shaw K, Gacinovic S, Stevens T, Livingston G, Ince P, McKeith IG, Katona CLE (2002): Differentiation of dementia with Lewy bodies from Alzheimer's disease using a dopaminergic presynaptic ligand. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73, 134-140

Wang Y, Hancock AM, Bradner J, Chung KA, Quinn JF, Peskind ER, Galasko D, Jankovic J, Zabetian CP, Kim HM et al. (2011): Complement 3 and factor h in human cerebrospinal fluid in Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and multiple-system atrophy. *Am J Pathol* 178(4), 1509-1516

Weiner MF (1999): Dementia associated with Lewy Bodies. *Arch Neurol* 56, 1441-1442

Welander H, Bontha SV, Näsström T, Karlsson M, Nikolajeff F, Danzer K, Kostka M, Kalimo H, Lannfelt L, Ingelsson M et al. (2011): Gelsolin co-occurs with Lewy bodies in vivo and accelerates  $\alpha$ -synuclein aggregation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 412(1), 32-38

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL (1996): Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13, 19-50

Wimo A, Winblad B, Aguero-Torres H, von Stauss E (2003): The magnitude of dementia occurrence in the world. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 17, 63-67

World Health Organization (WHO) (2010): International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision

Yin GN, Lee HW, Cho JY, Suk K (2009): Neuronal pentraxin receptor in cerebrospinal fluid as a potential biomarker for neurodegenerative diseases. *Brain Res* 1265, 158-170

Yoshita M, Taki J, Yamada M (2001): A clinical role for [123I]MIBG myocardial scintigraphy in the distinction between dementia of the Alzheimer's-type and dementia with Lewy bodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71, 583-588

Zabrocki P, Bastiaens I, Delay C, Bammens T, Ghillebert R, Pellens K, De Virgilio C, Van Leuven F, Winderickx J (2008): Phosphorylation, lipid raft interaction and traffic of alpha-synuclein in a yeast model for Parkinson. *Biochim Biophys Acta* 1783(10), 1767-1780

Zaccai J, McCracken C, Brayne C (2005): A systematic review of prevalence and incidence studies of dementia with Lewy bodies. *Age Ageing* 34, 561-566

Zhang J, Goodlett DR, Quinn JF, Peskind E, Kaye JA, Zhou Y, Pan C, Yi E, Eng J, Wang Q et al. (2005): Quantitative proteomics of cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis* 7(2), 125-133

Zhou J, Fonseca MI, Pisalyaput K, Tenner AJ (2008): Complement C3 and C4 expression in C1q sufficient and deficient mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 106(5), 2080-92.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich vor allem bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Inga Zerr bedanken, die mir das interessante Thema dieser Arbeit zur Verfügung stellte und mich in jeglicher Hinsicht bei der Durchführung meines Projektes unterstützte. Sie hat mir den wertvollen ersten Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten ermöglicht, mit hilfreichen Anregungen und der Weitergabe ihres fachlichen Wissens für den erfolgreichen Abschluss meiner Arbeit gesorgt und hatte stets ein offenes Ohr für alle aufkommenden Fragen.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Joanna Gawinecka, die mich während meines Doktorandinnendaseins die ganze Zeit unterstützt hat. Sie stand mir sowohl bei der Einführung in die Methoden der Proteomik, bei der Planung und Ausführung meiner Versuche und ihrer Auswertungen sowie mit allen auftretenden Fragen inner- und außerhalb des Labors stets zur Seite und trug damit wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Des Weiteren danke ich der Prionforschungsgruppe Göttingen, vor allem den Mitarbeiterinnen des Forschungslabores - Frau Barbara Ciesielczyk und Frau Monika Bodemer -, die mir im Laboralltag immer den Rücken stärkten. Auch möchte ich Frau Dr. med. Uta Heinemann und Frau Dr. Daniela Varges für ihre Hilfe bei klinischen Fragestellungen danken, außerdem Frau Dr. rer. nat. Julie Carimalo, Herrn Dr. rer. nat. Matthias Schmitz, Frau Jolante Ehrlich und Frau Maja Schneider-Dominco für ihre Hilfe bei unzähligen kleinen und großen Aufgaben, die meinen Weg kreuzten.

Ein Teil meiner Versuche wurde erst durch die Unterstützung kooperierender Abteilungen der UMG und der Nutzungserlaubnis einiger ihrer Laborgeräte möglich. Dafür danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Neurochemischen Labors, Herrn PD Dr. rer. nat. Abdul R. Asif und seinem Team aus der Abteilung Klinische Chemie sowie Herrn PD Dr. rer. nat. Hassan Dihazi und Dr. rer. nat. Jan H. Streich aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie.