

**Aquaporin-4-Konzentration im Liquor cerebrospinalis als
Biomarker für das glymphatische System bei Narkolepsie Typ 1**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Jonas Ranke

Betreuer*innen:

Herr Prof. Dr. med. Markus Otto

Frau Prof. Dr. rer. nat. Petra Steinacker

Gutachter*innen:

PD Dr. med. Christopher Weise, Halle (Saale)

Prof. Dr. med. Hayrettin Tumani, Ulm

Datum der Verteidigung: 27.05.2025

REFERAT

Narkolepsie Typ 1 (NT1) ist eine seltene neurologische Erkrankung, die zu übermäßiger Tagesschläfrigkeit und Kataplexien führt. Patienten zeigen pathologisch verminderte Hypocretin-1-Konzentrationen im Liquor (Hcrt-1 < 110pg/mL). Schlafstörungen treten häufig assoziiert mit kognitiven Störungen auf. Dabei wird ein dysfunktionales glymphatisches System als Ursache diskutiert. Aquaporin-4 (AQP4) als dessen zentraler funktioneller Bestandteil stellt einen vielversprechenden Biomarker für eine glymphatische Dysfunktion dar. Ziel der Arbeit ist die Bestimmung von AQP4 im Liquor von Patienten mit NT1. Damit soll untersucht werden, ob eine glymphatische Dysfunktion auch zur Pathophysiologie der NT1 beiträgt. Ferner soll eine Korrelation des Biomarkers mit klinischen Daten von NT1-Patienten untersucht werden.

Zur Bestimmung der AQP4-Konzentration im Liquor kam ein neuentwickelter, nicht-kommerzieller ELISA zur Anwendung. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit zusätzlich ein digitaler ELISA (SIMOA-Assay) zur Messung von AQP4 im Liquor etabliert und validiert. Das Probenmaterial stammte aus der Biomaterialbank der Universitätsmedizin Halle und umfasste insgesamt 349 Liquorproben von NT1-Patienten (N=133), schlafmedizinischen Kontrollen (Hcrt-1 > 110 pg/mL, N=145), Kontrollpatienten mit Kopfschmerzen, Schwindel und funktionellen Symptomen (N=62) sowie Patienten mit Alzheimer-Demenz (N=9). Die Erhebung der klinischen Daten der NT1-Patienten erfolgte durch eine retrospektive Analyse der zugehörigen Epikrisen.

Diese Studie konnte für NT1-Patienten erniedrigte AQP4-Konzentrationen im Liquor im Vergleich zu schlafmedizinischen Kontrollen ($p < 0,0001$), der zweiten Kontrollgruppe ($p = 0,024$) sowie Patienten mit Alzheimer-Demenz ($p < 0,0001$) zeigen. Diese Ergebnisse sprechen zunächst nicht für eine deutliche Störung der glymphatischen Clearance bei der Erkrankung jedoch für eine Beteiligung von AQP4-Kanälen an der Pathophysiologie der Erkrankung.

Es bestand eine positive Korrelation von AQP4 und Alter ($r = 0,26$, $p < 0,0001$) und Hypocretin-1-Konzentration im Liquor ($r = 0,35$, $p < 0,0001$) sowie eine negative Korrelation zwischen AQP4 und N3-Anteil in der Polysomnographie bei NT1-Patienten ($r = -0,28$, $p = 0,03$). Diese Befunde belegen zum einen den relevanten Einfluss von Alter und Tiefschlafanteil auf die glymphatische Clearance und legen zum anderen einen Zusammenhang zwischen glymphatischem System und Hypocretin-1 nahe.

Ranke, Jonas: Aquaporin-4-Konzentration im Liquor cerebrospinalis als Biomarker für das glymphatische System bei Narkolepsie Typ 1, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2024

INHALTSVERZEICHNIS

REFERAT

TABELLENVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Narkolepsie	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie und Pathophysiologie	1
1.1.3	Klinik	2
1.1.4	Diagnostik	3
1.1.4.1	Hypocretin-Bestimmung im Liquor cerebrospinalis	4
1.1.5	Therapie	4
1.2	Schlafstörungen und kognitive Störungen	4
1.2.1	Hypocretin und kognitive Störungen	5
1.3	Aquaporine	6
1.3.1	Aquaporin-4	6
1.3.2	Aquaporin-4 als Bestandteil des glymphatischen Systems	7
1.3.3	Glymphatische Dysfunktion und neurodegenerative Erkrankungen	8
2.	ZIELSTELLUNG	9
3.	MATERIAL UND METHODEN	12
3.1	Studiendesign	12
3.2	Ethikvotum	12
3.3	Probenmaterial	12
3.4	Datenerhebung	13
3.5	Tabellarische Auflistung der verwendeten Materialien	13
3.6	Methoden	17
3.6.1	Probengewinnung und Präanalytik	17
3.6.2	Enzyme-linked Immuno-Assay (ELISA)	17

3.6.2.1	Biotinylierung des Detektorantikörpers	19
3.6.2.2	Durchführung des Aquaporin-4-ELISAs	20
3.6.2.3	Glial-fibrillary-acidic-Protein (GFAP) – ELISA	21
3.6.3	Konzentrationsbestimmung mit dem NanoDrop-1000-Spectrophotometer	21
3.6.4	Präanalytische Einflussfaktoren auf die Proteinstabilität	22
3.6.5	Single Molecule Array (SIMOA)	22
3.6.5.1	Bead-Kopplung der Aquaporin-4-Antikörper	24
3.6.5.2	Durchführung der Messungen am SIMOA-HD-X-Analyzer	24
3.6.5.3	Vergleich verschiedener Assay-Formate	25
3.6.5.4	Optimierung der Anzahl der verwendeten Beads	26
3.6.5.5	Optimierung der Inkubationszeit und des Probenvolumens	26
3.6.5.6	Untersuchung des Assayparallelismus	26
3.6.5.7	Evaluation der Wiederfindungsrate (Spiking)	27
3.6.5.8	Probenaufbereitung	27
3.6.5.9	Methodenvergleich zwischen SIMOA- und ELISA-Assay	29
3.6.6	Statistische Verfahren	29
4.	ERGEBNISSE	30
4.1	Deskriptive Statistik der Kohorten der Pilotmessungen	30
4.2	Klinische Daten	31
4.2.1	Anamnestische Daten	31
4.2.2	Polysomnographische Daten	32
4.2.3	Multipler-Schlaf-Latenz-Test (MSLT)	33
4.2.4	Laborbefunde	34
4.3	Etablierung und Validierung des Aquaporin-4-ELISA	35
4.3.1	Assaypräzision	35
4.3.2	Präanalytische Einflussfaktoren auf die Proteinstabilität von Aquaporin-4 und Variabilität des Aquaporin-4-ELISAs	36
4.4	Aquaporin-4-Liquorkonzentration bei Narkolepsie Typ 1	37
4.4.1	Validierung der Messergebnisse an weiteren Kontrollkohorten	37
4.4.2	Aquaporin-4-Konzentration der unterschiedlichen diagnostischen Gruppen	38
4.4.3	Korrelation der Liquor-Aquaporin-4-Konzentration mit Biomarkern der Narkolepsie	39
4.4.4	Untersuchung des differentialdiagnostischen Potentials des AQP4-ELISAs	42
4.5	Etablierung eines Aquaporin-4-SIMOA-Assays	43
4.5.1	Optimierung des Assay-Ablaufs: 2-Schritt-Assay und 3-Schritt-Assay	43
4.5.2	Variation der Bead-Konzentrationen und Einführung von Helper Beads	44

4.5.3	Vergleich unterschiedlicher Verdünnungsmedien	45
4.5.4	Anpassung der Inkubationszeiten sowie der Probenvolumina des Assays	46
4.6	Validierung des etablierten Aquaporin-4-SIMOA-Assays	47
4.6.1	Bestimmung der Präzision des SIMOA-Assays	47
4.6.2	Evaluation der Wiederfindungsrate des Aquaporin-4-SIMOA-Assays	48
4.6.3	Assay-Parallelismus	48
4.6.4	Einfluss verschiedener Methoden der Probenvorbereitung auf die Aquaporin-4-Bestimmung	50
4.6.5	Anwendung des SIMOA-Assays an der Pilotkohorte zur Detektion der Aquaporin-4-Konzentration im Liquor	53
4.6.6	Vergleich der Aquaporin-4-Konzentrationsbestimmung im SIMOA- und ELISA-Assay	54
4.7	Untersuchung der Liquor-GFAP-Konzentration bei NT1-Patienten	54
4.7.1	Präanalytische Einflussfaktoren auf die Probenstabilität bei der GFAP-Messung	57
5.	DISKUSSION	59
5.1	Klinische Charakterisierung der Patienten mit Narkolepsie Typ 1	60
5.2	Etablierung und Validierung des Aquaporin-4-ELISA	60
5.3	Etablierung und Validierung des Aquaporin-4-SIMOA-Assays	61
5.4	Aquaporin-4 als Biomarker für glymphatische Dysfunktion	64
5.5	GFAP-Bestimmung bei Narkolepsie Typ 1 und Kontrollen	67
5.6	Stärken und Limitationen	68
6.	LITERATURVERZEICHNIS	70
7.	THESEN	80
8.	ANHANG	
	DANKSAGUNG	
	ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE UND SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 – Rekombinantes Protein	13
Tabelle 2 – Monoklonale Antikörper	13
Tabelle 3 – Kommerzielle ELISA-Kits	13
Tabelle 4 – Chemikalien und weitere Reagenzien.....	14
Tabelle 5 – Puffer und Lösungen.....	15
Tabelle 6 – Arbeitsmaterialien und -geräte	15
Tabelle 7 – Verbrauchsmaterialien	16
Tabelle 8 – Software und Programme	17
Tabelle 9 – Durchgeführte Methoden der chemischen Probenvorbereitung	28
Tabelle 10 - Deskriptive Statistik der NT1-Kohorte und schlafmedizinischer Kontrollen (Kontrollgruppe 1)	30
Tabelle 11 – Polysomnographie bei Narkolepsie Typ 1 und schlafmedizinischen Kontrollen.....	33
Tabelle 12 - Basisdaten aus der Liquoranalyse von NT1-Patienten und Kontrollen.....	34
Tabelle 13 – Aquaporin-4-Konzentrationen der verschiedenen Kohorten im Vergleich	39
Tabelle 14 – Diagnosekriterien Narkolepsie Typ 1 und 2 nach ICSD-3.....	IX
Tabelle 15 – Deskriptive Statistik der zusätzlichen Kontrollkohorten im Vergleich zur NT1-Kohorte	X

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 – Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA-Verfahrens.....	18
Abbildung 2 – Puffer-Austausch (Umwaschung) im Amicon-Filter	19
Abbildung 3 – Bindung von Coating- und Detektorantikörper an das Aquaporin-4-Peptid	20
Abbildung 4 – Häufigkeit wichtiger Kardinalsymptome der Narkolepsie Typ 1 in den Kohorten	32
Abbildung 5 – Typische Kalibrationskurve für den Aquaporin-4-ELISA.....	35
Abbildung 6 – Präanalytischer Einfluss wiederholter Einfrier-Auftau-Zyklen auf die Bestimmung der Aquaporin-4-Konzentration im Liquor	36
Abbildung 7 – Aquaporin-4-Konzentration im Liquor verschiedener diagnostischer Kohorten	38
Abbildung 8 – Korrelation von Aquaporin-4 und Hypocretin-1.....	40
Abbildung 9 – Korrelation von Aquaporin-4-Konzentration und Patientenalter.....	41
Abbildung 10 – Korrelation von Aquaporin-4-Konzentration im Liquor und N3-Anteil in der Polysomnographie.....	41
Abbildung 11 – ROC-Kurven für das diskriminative Potenzial des Aquaporin-4-ELISAs im Liquor	42
Abbildung 12 – Vergleich verschiedener Assayformate	44
Abbildung 13 – Signal-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise ratio) verschiedener AQP-4-Bead-Konzentrationen	45
Abbildung 14 – Einfluss des Verdünnungsmediums auf die Signalintensität	46
Abbildung 15 – Optimierung der Inkubationszeit des SIMOA-Assays	46
Abbildung 16 – Typische Kalibrationskurve für den Aquaporin-4-SIMOA-Assay	47
Abbildung 17 – Überprüfung der Assay-Wiederfindungsrate in Liquor- und Serumproben	48
Abbildung 18 – Untersuchung des Assay-Parallelismus im Liquor.....	49
Abbildung 19 – Untersuchung des Assay-Parallelismus im Serum	49
Abbildung 20 – Einfluss verschiedener Arten der Probenvorbereitung auf die Messung der Aquaporin-4-Konzentration im Liquor	50
Abbildung 21 – Einfluss verschiedener Arten der Probenvorbereitung auf die Bestimmung der Aquaporin-4-Konzentration im Serum	51
Abbildung 22 – Vorbehandlung von Liquor- und Serumproben durch Filtration im 50kDa-Amicon-Filter.....	52
Abbildung 23 – Effekt der Aufbereitung von Seren durch RIPA-Puffer, DTT und Filtration im Amicon-Filter auf das Fluoreszenzsignal des SIMOA-Assays	52

Abbildung 24 – Im SIMOA-Assay determinierte Aquaporin-4-Konzentration im Liquor von NT1-Patienten und Kontrollen.....	53
Abbildung 25 – Korrelation zwischen der AQP4-Konzentration nach Bestimmung mit der ELISA- und SIMOA-Methode.....	54
Abbildung 26 – GFAP-Liquorkonzentration der diagnostischen Kohorten.....	55
Abbildung 27 – Korrelation von GFAP-Konzentration und Patientenalter bei Probenentnahme	56
Abbildung 28 – Zusammenhang von GFAP-Konzentration im Liquor und BMI in NT1-Patienten und Kontrollen.....	56
Abbildung 29 – Einfluss wiederholter Einfrier-Auftau-Zyklen auf die GFAP-Konzentration im Liquor	57
Abbildung 30 – Liquor-GFAP-Konzentration nach unterschiedlich langer Probenlagerung bei Raumtemperatur	58
Abbildung 31 – Einfluss des Probenvolumens auf die Bestimmung der AEB	XI

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A β 40	beta-Amyloid-40
A β 42	beta-Amyloid-42
Abb	Abbildung
AEB	Average Number Of Enzyme Labels Per Bead
AI	Arousal-Index
AK	Antikörper
AQP	Aquaporin
AQP4	Aquaporin-4
ARAS	Aufsteigendes retikuläres Aktivierungssystem
AUC	area under the curve
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serumalbumin
CIEF	Kapillarbasierte isoelektrische Fokussierung
CV	Variationskoeffizient
CYP	Cytochrom-P
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNS	Gestörter Nachtschlaf (disrupted night time sleep)
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid-Hydrochlorid
EDS	Übermäßige Tagesschläfrigkeit (excessive daytime sleepiness)
EEG	Elektroenzephalographie
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESS	Epworth-Schläfrigkeitsskala
EU-NN	Europäisches Narkolepsienetzwerk
F _{ab} -Teil	Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers
fL	Femtoliter
GABA	Gammaaminobuttersäure
GFAP	Saures Gliafaser-Protein (glial fibrillary acidic protein)
h	Stunde
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
ICHD-3	International Classification of Headache Disorders, 3rd Version
ICSD-3	International Classification of Sleeping Disorders, 3rd Version
iPS	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KS	Kopfschmerz
LLOQ	Untere Quantifizierungsgrenze (lower limit of quantification)
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
MG	Myasthenia gravis
min	Minuten
mL	Milliliter
MSLT	Multipler-Schlaflatenz-Test
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumbicarbonat
NfL	Neurofilament light chain
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMOSD	Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen

NT1	Narkolepsie Typ 1
OD	Optische Dichte
OR1	Orexinrezeptor 1
OR2	Orexinrezeptor 2
oSAS	Obstruktives Schlafapnoesyndrom
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline + Tween
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pg	Pikogramm
PLMD	periodic limb movement disorder
PLMS	Periodische Beinbewegungen im Schlaf
pM	Pikomolar
p-Tau	Phospho-Tau
RBD	REM-Schlaf-Verhaltensstörung (REM sleep behavioral disorder)
REM	Rapid-Eye-Movement
RGP	Resorufin-beta-D-Galaktopyranosid
RIA	Radioimmunassay
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
ROC	receiver operating characteristics
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SBG	Streptavidin-beta-Galaktosidase
SIMOA	Single Molecule Array
SOREMP	sleep onset REM potential
TMB	Tetramethylbenzidin
t-Tau	Gesamt (total)-Tau
UMH	Universitätsmedizin Halle (Saale)
UV	Ultraviolett
WASO	Wake after sleep onset
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter

1. Einleitung

1.1 Narkolepsie

Die wissenschaftliche Erstbeschreibung narkoleptischer Symptome erfolgte bereits Ende des 19. Jahrhunderts durch Westphal und Fischer^{1,2}. Mit der Fallbeschreibung eines Patienten, der beim Beobachten grimassierender Affen im Pariser Jardin des Plantes plötzlich kollabierte, prägte Gelineau 1880 den noch heute für die Erkrankung gebräuchlichen Begriff *Narkolepsie*³. Zudem gelang ihm in diesem Zusammenhang die Schilderung eines der typischen Leitsymptome der Narkolepsie, welches seit 1902 nach Loewenfeld als Kataplexie bezeichnet wird⁴.

Die Narkolepsie zählt laut aktueller Version der *International Classification of Sleep Disorders* (ICSD-3) zur Gruppe der zentralen Störungen mit exzessiver Tagesschläfrigkeit⁵.

1.1.1 Epidemiologie

Schlafstörungen sind ein weit verbreitetes Phänomen. Bereits 1978 konnten Bixler et al. eine Prävalenz von 52,1% in der Allgemeinbevölkerung aufzeigen, wobei der größte Anteil auf die Gruppe der Insomnien entfiel (42,5%)⁶. 7,1% der Patienten waren von einer exzessiven Tagesschläfrigkeit betroffen, die als ein Leitsymptom der Narkolepsie auftreten kann. Die Narkolepsie selbst ist im Gegensatz zu Schlafstörungen im Allgemeinen eine seltene Erkrankung mit einer Prävalenz von 25 – 80/100.000⁷⁻⁹. Typischerweise manifestiert sich die Erkrankung in den ersten beiden Lebensdekaden mit einem Median um das 16. Lebensjahr⁷ mit einer Inzidenz von 0,64 bis 1,37 pro 100,000^{10,11}.

1.1.2 Ätiologie und Pathophysiologie

Ursache für die Narkolepsie ist ein selektiver Untergang der hypocretinergen Neurone des lateralen Hypothalamus^{12,13}. Die Erstbeschreibung des Neuropeptids Hypocretin-1 (synonym Orexin) erfolgte 1998 durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen^{14,15}. Physiologischerweise stabilisieren die exzitatorischen Projektionen dieser Neurone auf Orexin-Rezeptoren (OR1 und OR2) des Locus coeruleus, des Nucleus tuberomammillaris und der Raphe-Kerne als wichtige Zentren des aufsteigenden retikulären Aktivierungssystems (ARAS) den Wachheitszustand. Dabei wird ein Übergang in den REM-Schlaf und damit auch eine muskuläre Atonie verhindert¹⁶.

Durch den Verlust der Hypocretinwirkung lässt sich die bei Narkolepsiepatienten beobachtete Fragmentierung von Wach- und Schlafphasen sowie das Auftreten von Charakteristika des REM-Schlafs in Wachheitsphasen (Schlafparalyse, Halluzinationen

etc.) erklären. Insbesondere der Orexin-Rezeptor-2 scheint von besonderer pathophysiologischer Bedeutung zu sein, da bei der caninen genetischen Narkolepsie, welche einen gleichen Phänotyp wie die humane Erkrankung zeigt, eine loss-of-function-Mutation im OR2-Gen nachgewiesen werden konnte¹⁷. Ferner zeigen Mausmodelle mit OR2-Dysfunktion einen narkoleptischen Phänotyp¹⁸. Ein zusätzlicher knock-out des Orexin-Rezeptor 1 führt im Modell zu einer ausgeprägteren Symptomatik¹⁹.

Im Gegensatz zu den überwiegend genetisch bedingten Narkolepsien des Tierreichs wird für die humane NT1 eine ursächliche autoimmune Destruktion der hypothalamischen Neurone vermutet. Unterstützend kann für diese These eine starke Assoziation mit dem HLA-Haplotyp DQB1*06:02 (98% der NT1-Fälle im Vergleich zu 25 Prozent der kaukasischen Allgemeinbevölkerung) angeführt werden. Weiterhin zeigt sich auch eine positive Assoziation zu HLA DRB1*15, welches in der kaukasischen Bevölkerung für gewöhnlich gekoppelt mit dem DQB1*06:02-Allel vorliegt²⁰. Mit der suszipierten autoimmunen Genese vereinbar wäre auch der beobachtete Inzidenzanstieg infolge der H1N1-Pandemie 2009²¹, der insbesondere bei HLA-Prädisponierten nach Applikation des Impfstoffs Pandemrix auffiel. Die Ursache dieses Phänomens bleibt bisher ungeklärt, insbesondere eine molekulare Mimikry mit Epitopen des Impfstoffes oder eine Nebenwirkung des verwendeten Adjuvans AS03 werden diskutiert²². Darüber hinaus zeigt sich eine saisonale Häufung der Neuerkrankungen im Frühling nach Atemwegsinfektionen mit dem Influenzavirus oder Streptokokken. Dazu passend fanden sich bei einigen Patienten erhöhte Anti-Streptolysin-O- und Anti-DNAse-B-Titer im Rahmen der Initialdiagnostik²³. Ebenfalls konnten Polymorphismen in T-Zell-Rezeptor-Genen sowie gegen Epitope des Hypocretins oder assoziierte Proteine (Trib2) gerichtete spezifische T-Zellen bei Narkolepsiepatienten festgestellt werden^{24,25}. Vereinbar mit der angenommenen Pathophysiologie lieferten neuropathologische Untersuchungen des lateralen Hypothalamus Hinweise auf einen gliotischen Umbau^{26,27}, der oft im Rahmen von entzündlichen oder degenerativen ZNS-Erkrankungen beobachtet werden kann^{12,26,28}.

1.1.3 Klinik

Eine übermäßige Tagesschläfrigkeit (*excessive daytime sleepiness*, EDS) ist ein Leit- und häufiges Erstsymptom der Narkolepsie. Insbesondere während repetitiver, nicht stimulierender Tätigkeiten (Autofahren, Unterricht, o.ä.) kann EDS in Schlafattacken gipfeln. Diese werden von Patienten zunächst als erholsam empfunden, bevor mit einer individuellen Latenz eine erneute Schläfrigkeit einsetzt²⁹. Ferner ist die Erkrankung im Verlauf durch eine Fragmentierung von Schlaf- und Wachphasen (*disrupted night time*

sleep, DNS) bei in der Regel normaler Gesamtschlafdauer gekennzeichnet, die bedingt, dass der Schlaf als unerholsam empfunden wird.

Pathognomonisch für NT1 sind Kataplexien, welche einen plötzlichen, unwillkürlichen Tonusverlust der Muskulatur beschreiben, der durch starke positive (Lachen, Überraschung) oder negative Emotionen (z.B. Angst) getriggert werden kann. Sowohl generalisierte als auch lokalisierte (z.B. *head drop attacks*) Verläufe sind möglich.

Die gestörte Regulation von Schlaf- und Wachphasen kann weiterhin zu Halluzinationen beim Einschlafen (hypnagog) und Aufwachen (hypnopomp) führen. Diese Halluzinationen treten auch in der gesunden Bevölkerung mit einer Prävalenz von ca. 20% auf, jedoch deutlich häufiger im Kollektiv der Narkolepsiepatienten (66%)³⁰. Weiterhin werden bei bis zu 50% der Patienten mit Narkolepsie episodische Schlafparalysen mit einer bewusst erlebten Sprech- oder Bewegungsunfähigkeit beobachtet, welche ähnlich wie eine Kataplexie von Patienten als extrem belastend wahrgenommen werden²⁹. Pathophysiologisch liegt diesen Phänomenen eine Dissoziation der Charakteristika des REM-Schlafs mit Intrusion von REM-Schlaf-Bestandteilen (bspw. muskuläre Atonie) in Wachheitsphasen zugrunde. REM-Schlaf-Verhaltensstörungen (RBD), welche auch im Rahmen anderer Erkrankungen, z.B. dem idiopathischen Parkinsonsyndrom, beobachtet werden, treten bei bis zu 60% der Patienten auf, sodass die NT1 der häufigste Grund für RBD im jungen Lebensalter ist³¹. Zudem besteht eine Assoziation der Narkolepsie zu arterieller Hypertonie sowie zu Adipositas und obstruktiver Schlafapnoe (10–20%)^{32,33}. Auch psychiatrische Komorbiditäten wie Depression, Essstörungen und Suizidalität werden bei narkoleptischen Patienten gehäuft beobachtet³⁴. Aufgrund der initial oft unspezifischen Symptomatik sowie einer hohen Komorbidität wird die Diagnose im Schnitt mit einer Latenz von 7–8 Jahren nach Symptombeginn gestellt³⁵.

1.1.4 Diagnostik

Aktuell erfolgt die Diagnosestellung einer Narkolepsie nach den 2014 veröffentlichten Kriterien der *International Classification of Sleep Disorders* in der 3. Auflage (ICSD-3)⁵. Obligates Eingangskriterium ist das Vorliegen von EDS über mindestens 3 Monate als Leitsymptom der Narkolepsie. In Abhängigkeit vom Vorliegen typischer klinischer sowie laborchemischer Charakteristika können zwei distinkte Typen der Narkolepsie unterschieden werden (siehe Anhang, Tabelle 14).

1.1.4.1 Hypocretin-Bestimmung im Liquor cerebrospinalis

Der selektive Untergang der hypothalamischen Hypocretin-Neurone als pathophysiologisches Korrelat der NT1^{12,13} führt zu erniedrigten Hypocretinspiegeln im Liquor cerebrospinalis, welche mittels eines für den Forschungsgebrauch zugelassenen, kompetitiven Radioimmunassays (RIA) messbar sind. Angesichts der eingeschränkten Spezifität der klinischen Symptomatik sowie der apparativen Diagnostik (Polysomnographie, MSLT) dient der Assay der besseren diagnostischen Abgrenzung einer Narkolepsie Typ 1³⁶. Dabei erreicht die Hypocretin-Bestimmung unter Verwendung des etablierten Grenzwertes von <110 pg/mL eine Sensitivität von 88,5% bei einer Spezifität von 99,1% für Narkolepsie Typ 1³⁶⁻³⁸.

1.1.5 Therapie

Trotz des zunehmend verbesserten pathophysiologischen Verständnisses der Narkolepsie steht aktuell kein kausaler Therapieansatz zur Verfügung. Neben einem regelmäßigen, ausreichenden Nachtschlaf können geplante Tagschlafphasen von max. 20 min zur Adressierung der EDS empfohlen werden. Ferner kann der Genuss stimulierender Getränke bei Alkohol- und Nikotinkarenz die Symptomatik lindern³⁹.

Aktuell stehen zur symptomatischen Therapie der Narkolepsie mehrere Präparate zur Verfügung, die die verschiedenen Symptome der Narkolepsie unterschiedlich gut adressieren. Hinsichtlich der übermäßigen Tagesschläfrigkeit werden von den aktuellen europäischen Leitlinien insbesondere Pitolisant als Histamin-H3-Rezeptorantagonist sowie Psychostimulantien wie Modafinil und Methylphenidat empfohlen. Insbesondere beim gleichzeitigen Vorliegen einer Kataplexie stellt Natrium-Oxybat eine Alternative dar. Als Metabolit der Gammaaminobuttersäure (GABA) liegt seiner Wirkung eine Verstärkung der GABAergen Neurotransmission und damit eine Stabilisierung tiefer Schlafphasen sowie Unterdrückung des REM-Schlafes zu Grunde⁴⁰. Zudem existieren Medikamente, die führend gegen Kataplexie wirksam sind. Außer Clomipramin, welches durch potenzielle Arzneimittelinteraktionen aufgrund einer CYP-Enzyminduktion gekennzeichnet ist, unterliegen alle Medikamente dieser Gruppe (z.B. Venlafaxin und Fluoxetin) einem off-label use, welcher bei der Indikationsstellung zu beachten ist. Für die Symptomatik des gestörten Nachtschlafes und schlafbezogener Halluzinationen findet ebenfalls Natrium-Oxybat Verwendung.

1.2 Schlafstörungen und kognitive Störungen

Die Konsolidierung von Gedächtnisinhalten im Hippocampus findet insbesondere im Tiefschlaf (slow wave sleep) statt⁴¹. Die Assoziation eines gestörten Nachtschlafes mit kognitiven Störungen und dementiellen Syndrome ist hinlänglich bekannt⁴²⁻⁴⁶.

Polysomnographisch zeigt sich bei Patienten mit Alzheimer-Demenz eine Schlafragmentierung sowie erhöhte REM-Latenz⁴⁷. Bei Patienten mit selbstberichteter verkürzter Schlafdauer und -qualität konnte eine erhöhte β -Amyloid-Last in der Positronen-Emissions-Tomographie nachgewiesen werden⁴⁵. Dabei wird zunehmend ein bidirektionaler Zusammenhang zwischen beiden Krankheitsentitäten postuliert und Schlafstörungen werden nicht mehr alleinig als Symptom der kognitiven Störung verstanden. Ein möglicher Mechanismus der Begünstigung kognitiver Dysfunktion ist eine durch gestörten Nachtschlaf bedingte gesteigerte Inflammation, welche als Treiber verstärkter β -Amyloid-Plauebildung bekannt ist⁴⁸. Neben einer solchen gesteigerten β -Amyloid-Freisetzung kann auch dessen gestörter Abbau im Zusammenhang mit Schlafstörungen beobachtet werden. So konnte bei Mäusen mit Schlafdeprivation eine Depolarisation der Aquaporin-4-Verteilung korrelierend mit einer reduzierten glymphatischen Clearance und verstärkter Amyloidplauebildung festgestellt werden⁴⁹.

1.2.1 Hypocretin und kognitive Störungen

Auch wenn eine übermäßige Tagesschläfrigkeit sowie Kataplexien die führenden Leitsymptome der Narkolepsie Typ 1 darstellen, ist die Erkrankung ebenfalls durch eine Fragmentation des Nachtschlafs gekennzeichnet. So konnte eine rezente Meta-Analyse eine signifikante Erhöhung der Parameter Wake After Sleep Onset (WASO), Arousal Index (AI) sowie N1-Anteil in der Polysomnographie bei NT1-Patienten nachweisen⁵⁰. Zudem fand sich in dieser Kohorte auch eine signifikante Erniedrigung von Schlafeffizienz, REM-Latenz und N2-Anteil bei NT1-Patienten⁵⁰. Diese Störung der Schlafarchitektur legt eine mögliche Assoziation von NT1, glymphatischer Clearance und Kognition nahe.

Eine französische Studie fand bei Narkolepsiepatienten, die mindestens 65 Jahre alt waren, im Vergleich zu alters- und geschlechtsangepassten Kontrollen ohne klinisch apparente kognitive Defizite PET-morphologisch eine signifikant niedrigere kortikale Amyloid-Last⁵¹. Bezüglich typischer Biomarker neurodegenerativer Erkrankungen (β -Amyloid (A β 40, A β 42, Ratio), p-Tau, t-Tau, NfL) liegen diskrepante Ergebnisse aus mehreren Studien vor^{52,53}. Jedoch vermochte bisher keine Studie alzheimerartige, pathologische Veränderungen von Liquorparametern bei NT1-Patienten aufzuzeigen. Eine Metaanalyse konnte im Liquor von Patienten mit Alzheimer-Demenz nicht-signifikant erhöhte Hypocretin-1-Spiegel nachweisen⁵⁴, jedoch war in einer Gruppe älterer Menschen ohne kognitive Defizite eine positive Korrelation von Hypocretin-1 und p181-Tau ersichtlich⁵⁵. Hohe Orexinpiegel waren zudem mit einer Störung der Mikrogliaaktivierung und einem reduzierten Abbau von β -Amyloid-Fibrillen assoziiert⁵⁶.

1.3 Aquaporine

Die Proteinfamilie der Aquaporine umfasst 13 verschiedene Subformen (AQP0 – AQP12), welche in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden^{57,58}. Zu den wichtigsten Funktionen dieser Gruppe von Proteinen zählt der transmembranöse Wassertransport entlang osmotischer Gradienten. So kommt beispielsweise Aquaporin-2, welches im distalen Tubulusepithel der Niere exprimiert wird, eine wesentliche Funktion in der Regulation des Wasserhaushalts durch Modulation der Harnausscheidung zu⁵⁹. Weiterhin konnte in knock-out-Mäusen nachgewiesen werden, dass Aquaporine an der Zellmigration, epithelialer Flüssigkeitssekretion in Speicheldrüsen, sowie dem adipozytären Metabolismus beteiligt sind⁵⁷. Die Erstbeschreibung der ersten, initial in Erythrozyten entdeckten Aquaporinform, Aquaporin-1, erfolgte im Jahr 1992⁶⁰.

1.3.1 Aquaporin-4

Die Expression einer für das zentrale Nervensystem charakteristischen Aquaporinform konnte 1994 durch zwei Forschergruppen nachgewiesen werden^{61,62}. Das später als Aquaporin-4 (AQP4) bekannt gewordene Protein besteht wie die weiteren Vertreter der Proteinfamilie aus 6 Transmembrandomänen, 3 extrazellulären sowie 2 intrazellulären Loops. Auch die n-terminale und c-terminale Peptidkette befinden sich intrazellulär^{57,63}. Ausschlaggebend für die Kanalfunktion des Proteins bildet es eine uhrglasähnliche Tertiärstruktur aus. Die Aquaporinmonomere lagern sich in der Zellmembran zu Tetrameren zusammen. Speziell für AQP4 konnte zudem die Ausbildung supramolekularer Strukturen, sogenannter *orthogonal arrays of particles*, gezeigt werden. Solche Gruppierungen, deren Ausbildung durch das Verhältnis der beiden durch Spleißingvorgänge und posttranslationale Modifikation entstehenden Hauptisoformen M1 und M23⁶⁴ moduliert wird, ließen sich hierbei insbesondere an den perivaskulären Fortsetzen von Astrozyten darstellen^{65–67}. Immunzytochemische sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten zeigen, dass AQP4 im Gehirn außer in Astrozyten in periventrikulären ependymalen Zellen exprimiert wird⁶⁸.

Über verschiedene Proteine des Dystrophin-Komplexes, insbesondere alpha-Syntrophin, erfolgt eine Verbindung der AQP4-Kanäle mit dem Zytoskelett der Astrozyten^{69,70}. Weiterhin besteht eine enge Assoziation zu Laminin als Hauptbestandteil der zerebralen, perivaskulären Basalmembran. Es konnte eine erhebliche Reduktion der Expression von Laminin mit zunehmendem Abstand von den zerebralen Kleinstgefäßen nachgewiesen werden⁷¹. Dieser Umstand korreliert mit der unter physiologischen

Bedingungen hochpolarisierten Expression von AQP4-Molekülen auf der Astrozytenmembran.

Der transmembranöse Transport von Wassermolekülen ist wie für die gesamte Gruppe der Aquaporine auch eine Kernfunktion von AQP4. Eine Selektivität für Wasser wird dabei durch strukturelle Charakteristika des Aquaporinmoleküls erreicht. Der mit 1,5 Ångström geringe Durchmesser des Zentrums des Proteinkanals stellt hierfür einen ersten Selektivitätsmechanismus dar. Ferner hindern Argininreste an der extrazellulären Seite sowie positiv geladene Dipole nahe des Mittelpunkts des Kanals insbesondere protonierte Wassermoleküle sowie andere Kationen an der Passage^{72,73}. Dadurch bleibt der elektrische Gradient entlang der Zellmembran und das Ruhemembranpotential trotz des Transports von Wassermolekülen intakt⁵⁷.

Die Expression von AQP4 konnte in allen Hirnregionen nachgewiesen werden. Seltener finden sich im Gehirn auch andere Aquaporinformen, insbesondere das isoliert im Plexus choroideus vorkommende Aquaporin-1 sowie Aquaporin-9⁷⁴.

1.3.2 Aquaporin-4 als Bestandteil des glymphatischen Systems

Durch *in vivo* 2-Photonen-Mikroskopie wurde 2012 ein Mechanismus der zentralen Schadstoffclearance entdeckt, welcher angesichts des Fehlens zerebraler lymphatischer Gefäße lange unbekannt geblieben war⁷⁵. Dieses *glymphatische System* nutzt einen gerichteten Flüssigkeitsstrom durch das zerebrale Interstitium, dessen Direktionalität durch die arteriovenöse Druckdifferenz bedingt ist, zur Elimination von zerebralen Endmetaboliten. Das System wird dabei entlang der periarteriellen Räume von Liquor cerebrospinalis gespeist, der unter essenzieller Beteiligung von AQP4-Kanälen ins Interstitium geleitet wird^{76,77}. Durch Vermischung mit der Extrazellulärflüssigkeit können im Interstitium abgelagerte Stoffwechselprodukte aufgenommen werden. Die Drainage des glymphatischen Systems erfolgt anschließend entlang der kleinen venösen Gefäße und der duralen Sinus. Über Leitgefäße entlang der Meningen, welche typische Merkmale lymphatischen Endothels zeigen und damit als funktionelle lymphatische Gefäße wirken, erfolgt schließlich eine Einleitung in die zervikalen lymphatischen Bahnen⁷⁸. Die Kapazität des glymphatischen Entgiftungssystems unterliegt zahlreichen Einflussfaktoren. Neben der arteriellen Pulsation und der arteriovenösen Druckdifferenz hat auch die Respiration über eine Modulation des venösen Drucks Einfluss auf die zerebrale Schadstoffclearance⁷⁶. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein ausreichender Anteil an Tiefschlafphasen für die Funktionalität des Systems essenziell ist, da im durch Delta-Wellen im EEG gekennzeichneten Slow-Wave-Sleep (Schlafphase III) eine Expansion des Interstitiums um ca. 60% erfolgt, welche den Fluss des

glymphatischen Systems begünstigt⁷⁹. Auch eine seitliche Schlafposition zeigt darüber hinaus günstige Effekte, was anhand des Einflusses auf die Amyloidclearance belegt werden konnte⁸⁰.

Ein ausreichender glymphatischer Transport kann nur unter Beteiligung der Aquaporinkanäle auf der Astrozytenmembran erreicht werden. Dabei scheint dessen polarisierte Expression auf den Astrozytenfortsätzen insbesondere für die Clearance höhermolekularer Stoffe entscheidend zu sein⁸¹.

1.3.3 Glymphatische Dysfunktion und neurodegenerative Erkrankungen

Mit der Entdeckung des glymphatischen Systems hielten seine Komponenten zunehmend Einzug in pathophysiologische Theorien zur Entstehung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen. So konnte in Bezug auf das idiopathische Parkinsonsyndrom (iPS) gezeigt werden, dass AQP4-knock-out-Mäuse eine verstärkte Aktivierung der Mikroglia in der Substantia nigra zeigen, welche mit einer proinflammatorischen Zytokinfreisetzung und neuronalem Zelltod assoziiert ist⁸²⁻⁸⁴. Zudem fand sich ein inverser Zusammenhang zwischen AQP4-Expression und alpha-Synuclein-Ablagerungen bei iPS⁸⁵. Für die Alzheimer-Erkrankung war im Tiermodell an AQP4-knock-out-Mäusen eine 55% reduzierte beta-Amyloid-Clearance auffällig⁸⁶. Ferner korrelierten in neuropathologischen Studien die Lokalisationen von beta-Amyloid-Plaques und verstärkter immunhistochemischer Anfärbbarkeit von AQP4⁸⁷. Vermutet wird zudem, dass der Verlust der polarisierten Aquaporinexpression bei begleitend verstärkter disseminierter Aquaporinexpression auf den Astrozyten durch eine Störung der zerebralen Clearance die Amyloid-Proteinopathie fördert⁸⁸. In Tierstudien fand sich weiterhin an einem Schädel-Hirn-Trauma-Modell eine Assoziation von AQP4-Defizienz und intrazellulärer Akkumulation von Tau, welche auch zur Alzheimer-Pathologie beitragen könnte⁸⁶. Erstmals gelang es Arighi et al. 2022 erhöhte AQP4-Spiegel im Liquor cerebrospinalis von Alzheimerpatienten *in vivo* nachzuweisen, sodass eine mögliche Verwendung von AQP4 als Marker glymphatischer Dysfunktion in die wissenschaftliche Diskussion geriet⁸⁹. Auch für die Creutzfeld-Jakob-Erkrankung, den Normaldruckhydrozephalus und vaskuläre Demenz postulieren verschiedene Studien einen Einfluss der depolarisierten AQP4-Expression auf die jeweilige Pathogenese⁹⁰.

2. Zielstellung

Die Diagnostik der Autoimmunerkrankung Narkolepsie Typ 1 basiert aktuell vor allem auf der klinischen Symptomatik und der Bestimmung des Surrogatparameters Hypocretin-1 im Liquor, welches im Rahmen der eingangs beschriebenen Pathophysiologie der NT1 typischerweise pathologisch erniedrigt ist^{5,12}. Weitere diagnostische, prädiktive oder prognostische laborchemische Biomarker für diese Erkrankung liegen aktuell nicht vor.

Eine bidirektionale Assoziation von Schlafstörungen und kognitiven Störungen ist bekannt^{43,46}, jedoch ist zum aktuellen Zeitpunkt unklar, ob diese Assoziation auch für Narkolepsiepatienten besteht. Dabei wird eine Störung des glymphatischen Systems in Kollektiv der Patienten mit Schlafstörungen, welche die pathologische Proteinaggregation (insb. Alzheimerpathologie mit extrazellulären Amyloidaggregaten) fördern würde, als Ursache des Zusammenhangs der Erkrankungen diskutiert. AQP4 wird in diesem Zusammenhang als vielversprechender Biomarker einer glymphatischen Dysfunktion postuliert⁷⁹, jedoch fehlen zum aktuellen Zeitpunkt verfügbare sensitive Assays, um dessen Konzentration in Körperflüssigkeiten wie Liquor oder Serum zu detektieren.

Diese Forschungsarbeit hat die Etablierung eines sensitiven Assays für die AQP4-Bestimmung an der Universitätsmedizin Halle (Saale) zum Ziel, welcher zukünftig auch als Biomarker für das glymphatische System in anderen Forschungsprojekten verwendet werden kann. Dabei kann auf die Erfahrungen mit einem an den Universitätskliniken Ulm im Rahmen einer Forschungsarbeit entwickelten ELISA-Assays zurückgegriffen werden⁹¹. Im Rahmen des hiesigen Etablierungsprozesses soll zudem eine erneute Validierung des Assays erfolgen.

Im Rahmen der geschilderten Assoziation von Schlafstörungen mit glymphatischer Dysfunktion soll im Folgenden an einem Kollektiv aus Patienten mit NT1 mit erniedrigten Hypocretinspiegeln im Liquor cerebrospinalis untersucht werden, ob deren AQP4-Konzentrationen im Liquor im Vergleich zu alters- und geschlechtsgematchten Kontrollen alteriert sind. Insbesondere unter der Annahme eines gliotischen Umbaus der bei NT1 betroffenen Hirnareale des lateralen Hypothalamus, wäre eine Veränderung der AQP4-Spiegel ein weiterer Hinweis für diesen zerebralen astrozytären Umbauprozess. Diese pathophysiologischen Veränderungen könnten im Folgenden auch eine gestörte glymphatische Clearance verursachen, für die AQP4 als Surrogatparameter betrachtet wird.

Neben der prinzipiellen Frage, ob eine glymphatische Dysfunktion Bestandteil der Pathophysiologie der NT1-Erkrankung ist, soll auch untersucht werden, ob AQP4-Konzentrationen in diesem Patientenkollektiv mit klinischen und laborchemischen Markern der Narkolepsie korrelieren und sich daraus gegebenenfalls eine diagnostische oder prognostische Bedeutung des Biomarkers AQP4 ableiten lässt.

Neben dem Vergleich mit gesunden Kontrollen sollen die AQP4-Konzentrationen der NT1-Kohorte auch denen von Alzheimer-Patienten gegenübergestellt werden, für die erhöhte AQP4-Konzentration beschrieben sind⁸⁹.

In einem nächsten Schritt sollen die im ELISA etablierten Antikörperkombinationen zur Entwicklung eines Assays auf der SIMOA-Plattform der Firma Quanterix verwendet werden, um eine Steigerung der Sensitivität der Messung zu ermöglichen und gegebenenfalls die Übertragung des Assays auf andere Probenmatrices zu ermöglichen. Wie in den aktuellen ICSD-3-Diagnosekriterien abgebildet, ist für die Diagnose einer NT1, insbesondere beim Fehlen einer eindeutigen klinischen Befundkonstellation, die Bestimmung des Liquor-Hypocretin-1-Spiegels erforderlich⁵. Die dafür notwendige Lumbalpunktion stellt eine Belastung für die Patienten dar, die durch die Entwicklung weiterer blutbasierter Biomarker vermieden werden könnte.

Als eine von wenigen Kliniken in Europa führt die Universitätsklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Halle (Saale) die Hypocretin-Bestimmung im Liquor als Biomarker für NT1 durch. Über die vergangenen Dekaden konnte damit eine große Biomaterialbank mit Proben von Patienten mit Schlafstörungen und Verdacht auf NT1 aufgebaut werden.

Aufgrund der niedrigen Prävalenz der NT1 weisen Studien mit diesem Patientenkollektiv häufig geringe Fallzahlen auf. Ein immanentes Ziel dieser Promotionsarbeit ist es daher, basierend auf den in die Biomaterialbank eingeschlossenen Patienten, eine gut charakterisierte Kohorte aus Narkolepsie-Patienten und Kontrollen aufzubauen, welche für diese als auch zukünftige Forschungsarbeiten im Neurologischen Labor der UMH Anwendung finden kann. Dabei sollen durch die retrospektive Erhebung der Patientendaten der einsendenden Kliniken (korrespondierend zu den vorliegenden Liquores) klinische, laborchemische sowie elektrophysiologische Kenndaten für die Kohorte dieser an einer seltenen Erkrankung betroffenen Patienten erhoben werden. Dabei ist zunächst die Häufigkeit des Auftretens von typischen Symptom- und Befundkonstellationen in der Kohorte der NT1-Patienten sowie ein Vergleich mit Kontrollen gleichen Alters und Geschlechts untersuchenswert. Ferner soll eine mögliche Korrelation zwischen Biomarker-Spiegeln und dem Auftreten oder dem Schweregrad

klinischer Symptome sowie typischer Befunde der apparativen Diagnostik untersucht werden.

Die Messung des bereits in der Literatur etablierten astrozytären Biomarkers glial fibrillary acidic protein (GFAP) über einen kommerziell verfügbaren ELISA soll ergänzend erfolgen. In der Vergangenheit wurde die GFAP-Bestimmung bereits einmalig an einer kleinen Kohorte von NT1-Patienten im Vergleich zu schlafmedizinischen Differentialdiagnosen sowie neurologisch unauffälligen Kontrollen durchgeführt. Dabei fanden sich signifikant erhöhte GFAP-Spiegel für Patienten mit NT1⁹². Die aktuellen Untersuchungen zielen zum einen auf die Verifikation dieser vorliegenden Ergebnisse an deutlich größeren Kohorten ab. In Kombination mit der Bestimmung der AQP4-Konzentrationen soll zudem eine umfassendere Abbildung, der vermuteten astrozytären Pathologie bei NT1-Patienten erfolgen, als es die Bestimmung eines einzelnen Biomarkers erlaubt. Zum anderen soll analog zur AQP4-Konzentration eine Korrelation mit klinischen Kenndaten der Patienten überprüft werden. Diese Untersuchungen ergänzen damit weiter den Beitrag der Forschungsarbeit zum Verständnis über die zerebralen Veränderungen bei NT1-Patienten.

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Kohortenstudie. Wie im Folgenden genauer erläutert, konnten die verwendeten Patientendaten multizentrisch, retrospektiv aus der klinischen Befunddokumentation der einsendenden Kliniken erhoben werden. Die übrigen experimentellen Untersuchungen fanden monozentrisch im Neurologischen Labor der Universitätsmedizin Halle (Saale) statt.

3.2 Ethikvotum

Für die Verwendung der Biobankproben, die Durchführung der Experimente sowie die Akquirierung der klinischen Befunde der Patientinnen und Patienten liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle (Saale) vor (Bearbeitungsnummer 2021-101, 07/23). Zudem bestanden, sofern die einsendenden Kliniken im europäischen Narkolepsie-Netzwerk (EU-NN) integriert sind, für die diesbezügliche Datenerhebung ebenfalls positive Voten der lokalen Ethikkommissionen. Diese Durchführung der Studie erfolgte im Einklang mit den Vereinbarungen der Deklaration von Helsinki.

3.3 Probenmaterial

Die für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen verwendeten Proben stammen aus der Biobank der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Halle (Saale). Dabei konnte eine Kohorte aus 133 Proben von Patienten mit NT1 und Hypocretin-1-Werten unter 110 pg/mL sowie eine entsprechende nach Alter, Geschlecht und Probenalter gematchte Kontrollkohorte bestehend aus 145 Patienten mit nicht pathologischen Hypocretin-1-Konzentrationen im Liquor zurückgegriffen werden. Dieses Untersuchungsmaterial sowie, sofern verfügbar, die zugehörigen klinischen Daten stammen von Patienten der neurologischen und schlafmedizinischen Kliniken der Hephata-Klinik Schwalmstadt-Treysa, des Klinikums Leer, des Klinikums Westerstede und des Klinikums Bremen-Ost, welche dort zwischen 2006 und 2023 in Behandlung waren und im Rahmen der differentialdiagnostischen Evaluation einer Schlafstörung einer Lumbalpunktion zur Hypocretin-1-Bestimmung im Liquor unterzogen wurden.

Im Zuge der späteren Validierungsmessung kamen ferner weitere 71 Liquorproben aus der Hallenser Biobank zur Verwendung, die von Patienten der Universitätsklinik für Neurologie Halle stammen und im Rahmen der hiesigen Diagnostik gewonnen worden waren. Insgesamt wurden in der Promotion 349 Biobankproben eingeschlossen.

3.4 Datenerhebung

Für die klinische Charakterisierung der beiden Kohorten erfolgte eine retrospektive Datenerhebung anhand der Epikrisen und Befunde der einsendenden Kliniken. Einige Daten konnten darüber hinaus aus der EU-NN-Datenbank abgerufen werden, sofern eine Teilnahme der einsendenden Klinik am Narkolepsie-Netzwerk bestand. Dabei wurden neben Patientencharakteristika und den klinischen Symptomen der Narkolepsie sowie deren Ausprägung insbesondere der HLA-Haplotyp (HLA DQB1*06, HLA DQA1*01, HLA DRB1*15), polysomnographische Parameter und MSLT-Daten sowie Basisdaten der jeweiligen zur Hypocretinbestimmung verwendeten Liquorprobe (Zellzahl, Proteingehalt, Albumin-Quotient, intrathekale Immunglobulin-Synthese) erfasst.

3.5 Tabellarische Auflistung der verwendeten Materialien

Tabelle 1 – Rekombinantes Protein

AQP4 – Aquaporin-4.

Bezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller
AQP4 Fusion Protein	Ag9561	Proteintech Group Inc., Rosemont IL, USA

Tabelle 2 – Monoklonale Antikörper

AQP4 – Aquaporin-4. BSA – bovinen Serumalbumin.

Bezeichnung	Konzentration	Artikel-Nr.	Epitop	Hersteller
AQP4 (D1F8E) XP® Rabbit mAb (BSA and Azide Free)	1,024 mg/mL	39374	C-terminal	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers MA, USA
Anti-Aquaporin 4 antibody [EPR7040] - BSA and Azide free	1.024 - 1.072 mg/mL	ab248213	300-323	Abcam plc, Cambridge MA, USA

Tabelle 3 – Kommerzielle ELISA-Kits

Bezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller
Glial Fibrillary Acidic Protein Human ELISA (GFAP)	RD192072200R	BioVendor - Laboratorni medicina a.s., Brno, Tschechische Republik

Tabelle 4 – Chemikalien und weitere Reagenzien

SIMOA – Single Molecule Array. SBG – Streptavidin-beta-Galaktosidase. RGP – Resorufin- β -D-Galaktopyranosid. EDC – 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid-Hydrochlorid. HPLC – Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie. RIPA – Radioimmunopräzipitationsassay.

Bezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller
Vectastain Elite ABC Kit, Peroxidase (Standard)	PK-6100	Vector Laboratories, Inc., Newark, CA, USA
SIMOA Homebrew Assay Starter Kit	101351	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA
Biotinylation Reaction Buffer	101354	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA
Bead Conjugation Buffer	100453	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA
Bead Wash Buffer	101352	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA
EDC	100022	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA
Detector/Sample Diluent	101353	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA
Bead Diluent	100458	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA
SBG Dilution Buffer	100376	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA
SBG Concentrate	103397	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA
RGP	103159	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA
488-dyed Singleplex Beads	104007	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA
Homebrew Helper Beads (647)	103208	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA
EZ-Link™ NHS-PEG4-Biotin, No-Weigh™ Format	A39259	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
HISTOPRIME Normal Goat Serum, w/Preservative (0.08% NaN3), Non Sterile	LIN-ENG9010	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland
3, 3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	T0440	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7,2	D5652-50L	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salzsäure (HCl) 1N	6792.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) 96%	4623.3	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	A891592	Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irland
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	S8875-500G	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
SIMOA System Buffer 1	100486	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA
SIMOA System Buffer 2	100487	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA

HPLC-Wasser	34877-2-5L-M	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pierce RIPA-Puffer	89901	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
Harnstoff	2317.3	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DTT	6908.4	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	8076.2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 5 – Puffer und Lösungen

PBS – Phosphate buffered saline. HRP – Horseradish peroxidase.

Bezeichnung	Zusammensetzung
10-fach-PBS	47,75 g PBS ad 0,5 L Aqua bidest.
Tween-20 10% (w/v)	4,75g Tween ad 47,5 mL Aqua bidest.
PBST-Waschpuffer	1xPBS 0,05% (w/v) Tween20
0,1 M HCl-Lösung	100mL 1M HCl-Lösung ad 1000 mL Aqua bidest.
0,5 M H ₂ SO ₄ -Lösung	27,8mL 18M H ₂ SO ₄ -Lösung ad 1000 mL Aqua bidest.
Blocking Puffer	1% (v/v) Goat Serum (LIN-ENG9010) PBST
Coating Puffer	68,6 mM Natriumbicarbonat 31,4 mM Natriumcarbonat HPLC-Wasser pH 9,6
Streptavidin-HRP-Lösung	0,5% (v/v) VectaStain Reagent A 0,5% (v/v) VectaStain Reagent B in 1xPBS

Tabelle 6 – Arbeitsmaterialien und -geräte

SIMOA – Single Molecule Array.

Bezeichnung	Hersteller
Analytische Waage ABJ 220-4NM	Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
Infinite F50 PlateReader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mehrkanalpipette MultiChannel	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipipette Dispenser	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Nanodrop 1000 Spectrophotometer	ThermoFisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland
Orbitalschüttler Rotamax 120	Heidolph, Schwabach, Deutschland
pH-Meter pMX 3000	WTW, Weilheim, Deutschland
Präzisionspipetten (10µL, 100µL, 200µL, 1000µL, 5000µL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
SIMOA HD-X-Analyzer	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA
SIMOA Microplate Shaker 210405009	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA
Thermomixer 5432	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischvortexer Reax2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Tischvortexer Vortex Gene-2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Tischzentrifuge 5415-R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Universal 30RF	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 7 – Verbrauchsmaterialien
SIMOA – Single Molecule Array.

Bezeichnung	Hersteller
Amicon Ultra 0,5 mL Zentrifugalfilter 100 kDa	Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irland
Amicon Ultra 0,5 mL Zentrifugalfilter 50 kDa	Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irland
Combitips (2,5 mL und 5 mL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Conductive Black Tips SIMOA 2.0	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 mL und 2,0 mL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
MaxiSorp ImmunoPlate F96	ThermoFisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland
Pipettenspitzen (10µL, 200µL, 1000µL)	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen (300µL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
SealingTape 15036	ThermoFisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland
SIMOA 96-Well Conical Plates	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA
SIMOA Discs	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA
Waagschälchen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugenröhrchen / Falcon-Tubes (15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

Tabelle 8 – Software und Programme
SIMOA – Single Molecule Array.

Bezeichnung	Hersteller
GraphPad Prism 10	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Magellan Data Analysis Software	Tecan, Männedorf, Schweiz
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
NanoDrop 1000 3.7.1. Measurement Software	ThermoFisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland
SIMOA Analyzer Software	Quanterix Corporation, Billerica, MA, USA

3.6 Methoden

3.6.1 Probengewinnung und Präanalytik

Die Probengewinnung im Rahmen einer diagnostischen Lumbalpunktion erfolgte nach den lokalen Standards der einsendenden Kliniken. Zur initial indizierten Hypocretin-1-Bestimmung wurden die Proben vor Versand an die Universitätsmedizin Halle (zuvor Neurochemisches Labor am Universitätsklinikum Ulm) auf -80°C gekühlt und auf Trockeneis versandt. Nach der abgeschlossenen Hypocretin-1-Bestimmung wurden die Proben erneut eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

3.6.2 Enzyme-linked Immuno-Assay (ELISA)

Die Spezifität eines Antikörpers für ein charakteristisches Protein-Epitop, welche Grundlage der humoralen, adaptiven Immunreaktion ist, lässt sich diagnostisch zur gezielten Detektion von Proteinen in Probenmaterialien nutzen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde dieses Prinzip im Rahmen eines Sandwich-Immunoassays genutzt. Nach Adsorption eines Fangantikörpers (Capture-Antikörper) auf eine Mikrotiter-Platte und Blockung freigebliebener Bindungsstellen der Platte durch unspezifische Proteine zur Verhinderung falsch-positiver Ergebnisse erfolgt die Zugabe der den Analyten enthaltenden Probensubstanz, welcher durch den F_{ab} -Teil des Capture-Antikörpers spezifisch gebunden und auf der Platte immobilisiert werden kann. Ein zweiter Antikörper, welcher an ein anderes Epitop des zu untersuchenden Proteins bindet, wird im Anschluss zur Detektion hinzugefügt. Um diese spezifische Antikörper-Antigen-Bindung quantifizierbar zu machen, ist eine Markierung des Antikörpers notwendig. Beim 1971 durch Engvall und Perlmann entwickelten und auch im Rahmen dieser Arbeit angewandten ELISA-Verfahren wird hierfür die Kopplung eines Enzyms an den detektierenden Antikörper benutzt, dessen Aktivität durch seinen spezifischen Substratumsatz und eine damit verbundenen Farbumschlag zur Darstellung gebracht

werden kann. Neben einer direkten Bindung des Enzyms an den Detektorantikörper kann eine Biotinylierung des Immunglobulins und Zugabe von Streptavidin erfolgen. Ein Biotinmolekül bindet mehrere Streptavidine, welche eine Streptavidin-vermittelte Bindung des Enzyms (hier: horse radish peroxidase, HRP) ermöglicht. Der anschließende Substratumsatz und die daraus resultierende fotometrisch messbare Extinktion ist abhängig von der Konzentration des Analyten im Probenmaterial. Letztere kann in Bezug auf eine Standardreihe bekannter Konzentrationen aus den ermittelten Extinktionen berechnet werden.

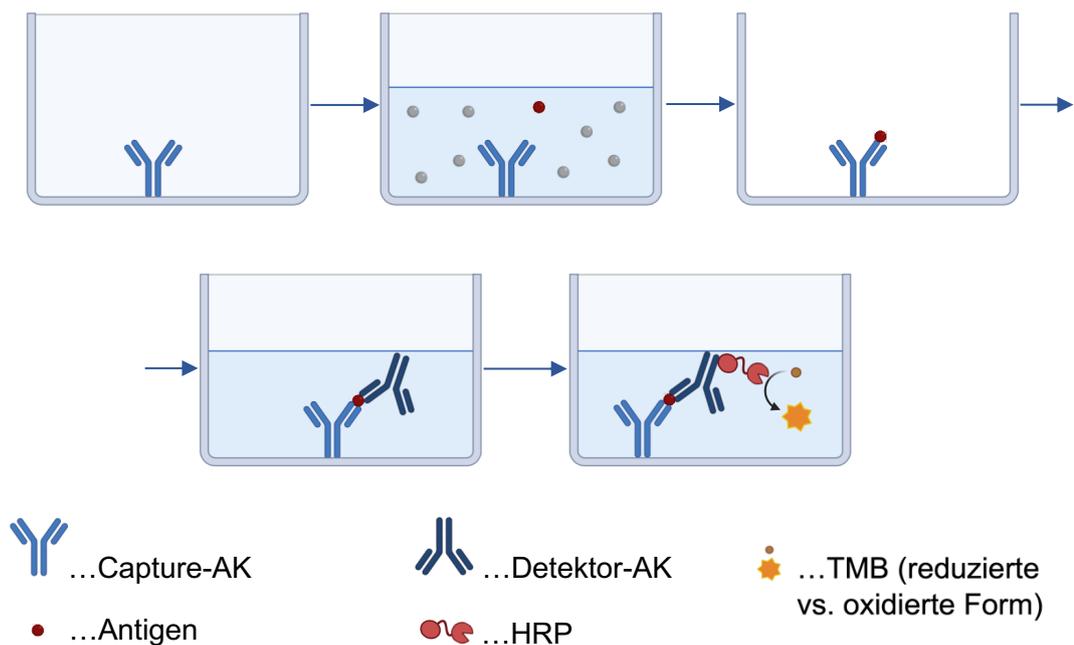


Abbildung 1 – Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA-Verfahrens

Von links nach rechts kommen die wichtigsten Schritte eines ELISAs zur Darstellung. Dabei ist jeweils ein Well der Platte im Querschnitt dargestellt. (1) Bindung des Coating-Antikörpers an die Well-Oberfläche. (2) Nach dem Blocking wird eine Probe einer bestimmten Antigenkonzentration appliziert. (3) Nach der Inkubationszeit und einem Waschschrift liegt eine spezifische Bindung zwischen Antikörper und Antigenepitop vor. Dabei bleibt der Fang-Antikörper an der ELISA-Platte adhären. (4) Der hinzugefügte Detektorantikörper geht mit einem anderen Epitop des zu analysierenden Proteins eine spezifische Bindung ein. (5) Durch die Zugabe von Streptavidinlösung (HRP) und anschließendem enzymatischen Umsatz des Substrats (TMB) wird die Antikörperbindung durch Farbumschlag sichtbar. AK – Antikörper. TMB - 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin. HRP – Meerrettichperoxidase. Abbildung erstellt mit Biorender.com

3.6.2.1 Biotinylierung des Detektorantikörpers

Für die Biotinylierung des Detektorantikörpers (Abcam Corporation, ab248213) erfolgte zunächst die Umwaschung des Antikörpers in Biotinylation Reaction Buffer (Quanterix Corporation, 101358) in einem 50-kDa-Amicon-Filter (Abbildung 2).

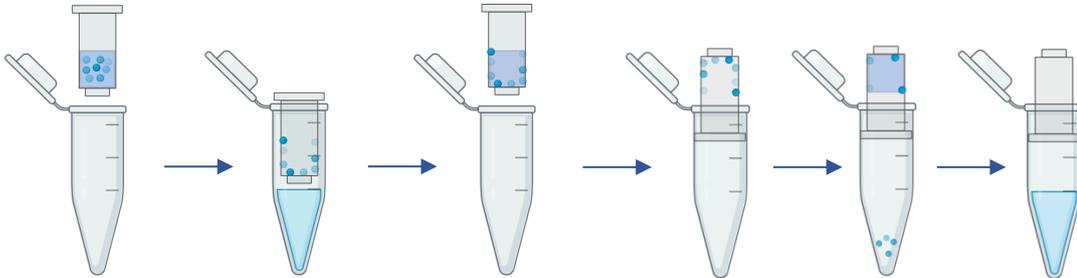


Abbildung 2 – Puffer-Austausch (Umwaschung) im Amicon-Filter

Von links nach rechts kommt die Funktionsweise des Zentrifugalfilters zur Darstellung. (1) Initial wird ein definiertes Volumen des Antikörper-Stocks zusammen mit Biotinylation Reaction Buffer unter Generierung eines Gesamtvolumens von 500 µL in den Zentrifugalfilter verbracht und anschließend für 5 min bei 14.000 Umdrehungen pro Minute in die Zentrifuge gestellt. (2) Der Antikörper liegt nach der Zentrifugation konzentriert auf der Filtermembran vor. (3) Erneut wird Biotinylation Reaction Buffer hinzugefügt und die Zentrifugation (Schritte 2 und 3) für mehrere Male wiederholt, um eine Entfernung des Puffers zu erreichen, in dem der Antikörper gelagert war. (4) Da der Antikörper nach den Zentrifugationen auf dem Filter konzentriert vorliegt, wird der Amicon-Filter anschließend in einem neuen Auffang-Röhrchen invertiert und für 2 min bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. (5) 50µL Biotinylation Reaction Buffer werden in den Filter appliziert und die Membranen anschließend durch Pipettieren gewaschen. Der Filter wird nun wieder invertiert und erneut für 2 min bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. (6) Schlussendlich werden ca. 100µL der umgewaschenen Antikörperlösung gewonnen. Abbildung erstellt mit *Biorender.com*

Im Anschluss wurde EZ-link NHS-PEG4-Biotin (ThermoFisher Scientific, #A39259) in einem 40-fachen molaren Überschuss zugegeben und der Reaktionsansatz für 30 min inkubiert. Die anschließende Aufreinigung des Antikörpers zur Entfernung überschüssigen Biotins erforderte ein erneutes Umwaschen in Biotinylation Reaction Buffer in einem 50-kDa-Amicon-Filter. Unter Verwendung eines NanoDrop 1000 Spectrophotometers konnte die finale Konzentration des biotinylierten Antikörpers bestimmt werden. Die Lagerung erfolgte anschließend bis zur Verwendung bei 4°C.

Vergleichend zur oben erwähnten Methode mit NHS-PEG4-Biotin wurde im Rahmen des initialen Etablierungsprozesses des ELISA auch eine Biotinylierung mit dem Biotinylation Kit Lightning Link (ab 201795) von Abcam evaluiert. Die vom Hersteller angegebenen Vorgaben zum Reaktionsablauf wurden eingehalten. Aufgrund eines hohen Hintergrundsignals bei der Auslesung im ELISA-Reader bei im Gegensatz dazu guten Ergebnissen mit dem NHS-PEG4-biotinylierten Antikörper wurde die Quick-

Biotinylierung verlassen. Initiale Versuche einer Biotinylierung mit Sulfo-NHS-LC-Biotin (A39257, ThermoFisher Scientific) waren nicht erfolgreich. Hier waren sowohl in einem direkten ELISA mit Coating mit AQP4-Antigen als auch im nachfolgend beschriebenen ELISA nach finalem Protokoll, selbst mit dem höchstkonzentrierten Standard der Kalibrationskurve, nur geringe Extinktionswerte messbar.

3.6.2.2 Durchführung des Aquaporin-4-ELISAs

Die Bestimmung der AQP4-Konzentration im Liquor cerebrospinalis erfolgte über einen von Gómez de San José et al. erstbeschriebenen Aquaporin-4-ELISA⁹¹. Der Assay nutzt einen gegen den C-Terminus von AQP4 gerichteten Capture-Antikörper (cell signalling, #39374), der in einem 100mM Bicarbonat-Carbonat-Puffer (pH 9,6) auf einer 96-well-Platte über Nacht mit 3,3 µg/mL bei 4°C gecoatet wird. Nach Entfernung der überschüssigen Lösung erfolgt am Folgetag nach zweistündiger Inkubation mit 200µL Block-Puffer (1% (v/v) goat serum, 0,05% (v/v) Tween20 in PBS) die Applikation der Kalibratoren sowie der Liquorproben (1:6 in Block-Puffer), welche im Anschluss für 1,5h inkubieren. Nach drei Waschschritten mit PBST erfolgte die Applikation des biotinylierten Detektorantikörpers (Abcam Corporation, ab248213) in einer Konzentration von 0,66 µg/mL. Abbildung 3 gibt eine schematische Übersicht über die Bindung der Antikörper an das Aquaporin-4-Molekül.

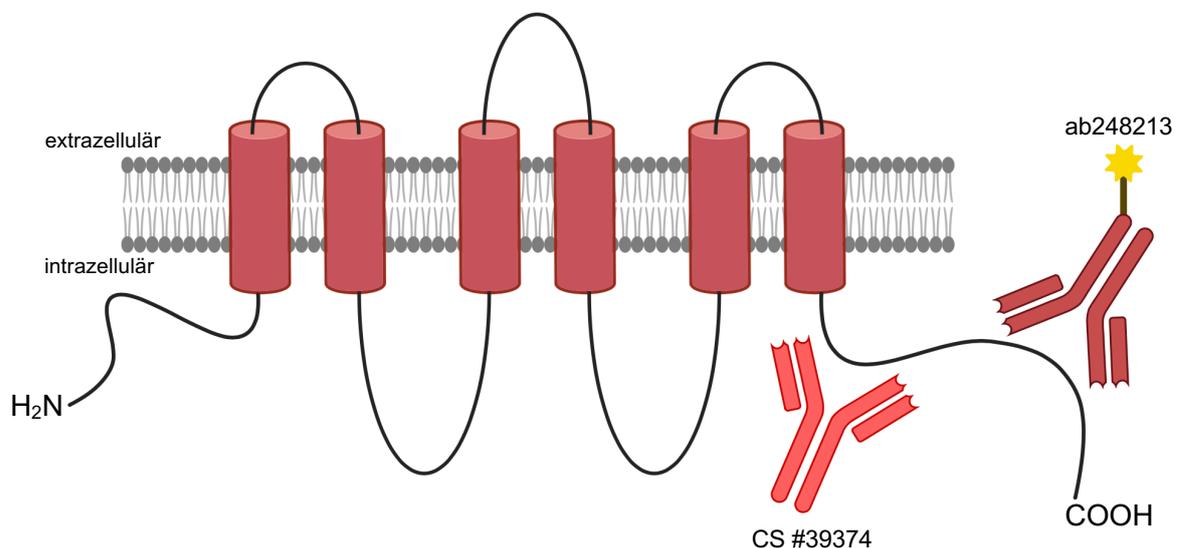


Abbildung 3 – Bindung von Coating- und Detektorantikörper an das Aquaporin-4-Peptid

Das Bild stellt schematisch die Bindungsstellen des im Assay verwendeten Antikörperpaars am AQP4-Protein dar, welches in seiner membrangebundenen Form zur Abbildung kommt. Sowohl der Coating-Antikörper (CS #39374) als auch der biotinylierte Detektorantikörper (ab248213) binden an den c-terminalen Abschnitt des Moleküls. AQP4 – Aquaporin-4. Abbildung erstellt mit Biorender.com

Nach erneuter Inkubation für 1 h, Verwerfen der überschüssigen Lösung sowie erneuten Waschschritten wurden 100µL einer Streptavidin-HRP-Lösung (Vectastain, PK-6100) und nach einem letzten Waschschriff nach weiteren 30 min 100µL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in jedem Well appliziert. Nach 30 min wurde die enzymatische Reaktion durch eine 0,5M H₂SO₄-Lösung gestoppt und die optische Dichte (OD) bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm in einem ELISA-Reader (Infinite F50 Plate Reader, Tecan) gemessen.

Zur Erstellung der Kalibrationskurve fand eine Vier-Parameter-logistische-Regression (4PL) in GraphPad Prism 10 Anwendung. Anhand der im Folgenden aufgeführten Regressionsformel erfolgte die Bestimmung der jeweiligen Aquaporin-4-Konzentrationen im Probenmaterial.

$$y = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} + D$$

y...Signalintensität (OD), x...Konzentration des Analyten, A...OD-Maximalwert, D...OD-Minimalwert, B...Steigung am Testmittelwert, C...Testmittelwert

3.6.2.3 Glial-fibrillary-acidic-Protein (GFAP) – ELISA

Die Bestimmung der GFAP-Konzentration im Liquor erfolgte durch einen kommerziell verfügbaren ELISA (BioVendor Laboratorni medicina a.s., Brno, Tschechische Republik) nach den vom Hersteller zur Verfügung gestellten Angaben. Alle dafür verwendeten Liquorproben von NT1-Patienten sowie Kontrollen wurden vor Bestimmung der GFAP-Konzentration bereits im Rahmen der AQP4-Messung einmalig aufgetaut. Die Lagerung zwischen den AQP4- und GFAP-Messungen erfolgte bei -80°C.

3.6.3 Konzentrationsbestimmung mit dem NanoDrop-1000-Spectrophotometer

Die Detektion der Konzentrationen der in diesem Projekt benutzten Antikörperlösungen erfolgte unter Verwendung eines NanoDrop 1000 Spectrophotometers (ThermoFisher Scientific). Dieses nutzt das Messprinzip der konzentrationsabhängigen Verstärkung der Extinktion einer proteinhaltigen Probe nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz.

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot L}$$

c...Konzentration in mg/mL, A...UV-Extinktion, ε...Extinktionskoeffizient, L...Schichtdicke in cm

Die Extinktionsmessung erfolgt nach Kalibrierung des Geräts auf die verwendete Pufferlösung der Antikörperzubereitung bei einer Wellenlänge von 280 nm, welche das

Absorptionsmaximum aufgereinigter Proteine darstellt. Unter Nutzung der intrinsischen Oberflächenspannung des Analyten kann die Probe beim NanoDrop-Verfahren unter Ausbildung einer Flüssigkeitssäule direkt auf die fiberoptischen Detektionsflächen aufgetragen werden. Damit ist ein geringes Probenvolumen von 2µL zur Konzentrationsbestimmung ausreichend⁹³.

3.6.4 Präanalytische Einflussfaktoren auf die Proteinstabilität

Zur Evaluation der Proteinstabilität und präanalytischer Einflussfaktoren wurde eine Liquorprobe aus der Biomaterialbank aliquotiert und im Anschluss bis zu vier Einfrier-Auftau-Zyklen unterzogen. Dabei wurde eine minimale Einfrierdauer von 4 h bei -80°C nicht unterschritten. Im Anschluss wurde durch die ELISA-Messung für jede Probe eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt und mit dem Referenzwert (einmalig aufgetaute Liquorprobe) der Aquaporin-4-Konzentration verglichen.

Auch für den oben beschriebenen kommerziellen GFAP-ELISA erfolgte eine Untersuchung der Einfrier-Auftau-Stabilität. Dabei wurde auf die für die Evaluation des AQP4-ELISAs hergestellten Einfrier-Auftau-Aliquots zurückgegriffen. Zudem wurde aufgrund der Ergebnisse früherer Publikationen, welche für die Liquorbestimmung von GFAP mit unterschiedlichen Assays wiederholtes Einfrieren und Auftauen als einen erheblichen Einflussfaktor auf die detektierte Konzentration angeben^{94,95}, eine ausgedehntere Einfrier-Auftau-Reihe mit bis zu 6 Zyklen an 3 Proben ergänzt. Ferner wurde auch eine vergleichende GFAP-Bestimmung aus verschiedenen Aliquots einer Liquorprobe durchgeführt, welche zuvor für 6 h, 24 h, 72 h, 5 oder 7 Tage bei Raumtemperatur gelagert, vor Durchführung der Messung bei -80°C eingefroren und anschließend einmalig aufgetaut wurden. Auch für die Evaluation des Einflusses der präanalytischen Bedingungen auf die GFAP-Konzentration diente eine einfach aufgetaute und zuvor bei -80°C gelagerte Liquorprobe als Referenz.

3.6.5 Single Molecule Array (SIMOA)

Konventionelle ELISA-Verfahren sind in Ihrem unteren Detektionslimit beschränkt, sodass in der Vergangenheit weitere Methoden entwickelt wurden, um die analytische Sensitivität der Proteinbestimmung zu verbessern. Das SIMOA-Verfahren (single molecule assay, Wilson et al., Quanterix Corporation) ist als digitaler Immunoassay in der Lage, Proteinkonzentrationen im Bereich von weniger als 10^{-15} M⁹⁶ zu detektieren. Die Messungen erfolgen an der Universitätsklinik für Neurologie in Halle am HD-X-SIMOA-Analyzer der Firma Quanterix⁹⁷.

Das Messprinzip basiert auf der Kopplung eines monoklonalen Antikörpers an paramagnetische Microbeads. Wie bei konventionellen Immunoassays werden diese mit der zu untersuchenden Probe und einem biotinylierten Detektorantikörper, welcher ebenfalls spezifisch für eine Proteinsequenz des gewünschten Analyten ist, unter Ausbildung eines Sandwich-Komplexes inkubiert. Durch die Biotinylierung ist die Kopplung der enzymatisch wirksamen Streptavidin- β -Galaktosidase (SBG) an den gebildeten Immunkomplex möglich. Als enzymatisches Substrat wird Resorufin- β -D-Galaktopyranosid (RGP) verwendet. Vom Hersteller werden 1-, 2- und 3-Schritt-Assays unterschieden, welche sich in der gemeinsamen oder getrennten Inkubation von Fang-, Detektor-Antikörper, SBG und Probe vor der Zugabe der aufgeführten Reagenzien unterscheiden^{96,97}.

Um Proteinkonzentration im femto- bis attomolaren Bereich detektieren zu können, werden die beadgekoppelten Antikörper gemeinsam mit enzymgekoppelten Detektorantikörpern auf sogenannte Arrays einer SIMOA-Disc unter Applikation eines Unterdrucks übertragen. Ein Array, das zur Messung einer einzigen Probe verwendet wird, beinhaltet 216.000 Mikrowells eines Volumens von 40 fL. Dieses Volumen entspricht dem Fassungsvermögen für genau ein Bead. Nach der Entfernung überschüssiger, d.h. nicht in einem Well befindlicher Beads und Verschluss der Wells durch eine spezielle Ölformulierung erfolgt die fluorometrische Bestimmung der SBG-Enzymaktivität, welche durch den Resorufin-Umsatz gekennzeichnet ist. Das optische System des HD1X-Analysers vergleicht dabei die Fluoreszenz-Intensität zweier nacheinander aufgenommener Signale. Eine lokale Zunahme dieser Intensität in einem Well erfolgt nur, wenn dort ein enzymbeinhaltender Bead-Antikörper-Komplex lokalisiert ist⁹⁶. Das Fluoreszenzsignal wird als AEB (average number of enzyme labels per bead) ausgegeben, welches ein Maß für die Anzahl gebundener Enzyme pro Bead ist. In Bezug auf eine Standardkurve erfolgt im Anschluss eine Berechnung der Probenkonzentration.

Die hohe Sensitivität des SIMOA-Verfahrens fußt auf verschiedenen Aspekten. Zentral ist hierfür die Messung der Proben in 40-fL-Microwells im Vergleich zu den deutlich größeren 100 μ L-Wells einer ELISA-Platte, die eine hohe Ortsauflösung des Assays bedingt. Durch das geringe zur Verfügung stehende Diffusionsvolumen für das lumineszierende Reaktionsprodukt des Enzymsubstrats im Well kann bereits bei kleinen Volumina ein Fluoreszenzsignal generiert werden, das das Hintergrundsignal übersteigt⁹⁶. Das ermöglicht zudem eine Reduktion der verwendeten Menge der übrigen Reagenzien (insb. Antikörper- und Enzymformulierungen) im Vergleich zu herkömmlichen Immunoassays, was zu einem niedrigen Hintergrundsignal bei den

Fluoreszenzbestimmungen beiträgt. Die enge räumliche Beziehung der Reaktanten im Analysegerät schafft zudem günstige thermodynamische und kinetische Bedingungen⁹⁶ für die Bildung des Sandwich-Immunkomplexes und trägt somit zu einer hohen Sensitivität des SIMOA-Verfahrens bei⁹⁷.

3.6.5.1 Bead-Kopplung der Aquaporin-4-Antikörper

Die Kopplung des AQP4-Antikörpers an paramagnetische Beads erfolgte nach den Handlungsempfehlungen des Homebrew Assay Development Kit von Quanterix. Hierfür wurde der Antikörper (cell signalling, #39374) zunächst in Bead Conjugation Buffer in einem 50-kDa-Amicon-Filter umgewaschen. Der Bead Stock wurde unter Verwendung eines Magnet-Separators mit Bead Wash Buffer präpariert und im Anschluss in Bead Conjugation Buffer umgewaschen.

Durch Zugabe einer 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid-Hydrochlorid-Lösung (EDC) einer Konzentration von 10mg/mL und Inkubation für 30 min bei 4°C auf dem Schüttler (1000 rpm) erfolgte die Aktivierung der Beads. Die anschließende Konjugation mit dem umgewaschenen Antikörper erforderte die Inkubation beider Lösungen für 2 h bei 4°C.

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen an die Beads wurde das Bead-Antikörper-Konjugat anschließend für 45 min bei RT mit Bead Blocking Buffer inkubiert. Nach einer abschließenden Umwaschung in Bead Diluent erfolgte die Lagerung bis zur Verwendung bei 4°C im Dunkeln analog zu den Empfehlungen von Quanterix. Nach jedem Umwaschzyklus im Amicon-Filter erfolgte zudem eine Konzentrationsbestimmung der erhaltenen Lösung über das NanoDrop-Spektrophotometer.

3.6.5.2 Durchführung der Messungen am SIMOA-HD-X-Analyzer

Für die Etablierung eines AQP4-Assays am SIMOA-Analyzer konnte auf orientierende Durchführungsempfehlungen des Homebrew-Guides der Firma Quanterix zurückgegriffen werden.

Der zuvor biotinylierte Detektorantikörper (Abcam Corporation, ab248213) wurde unter Herstellung einer Lösung einer Konzentration von 0,66µg/ml in Detector Diluent des Herstellers gelöst. Ferner wurde ein ausreichendes Volumen 100pM-SBG-Lösung bereitgestellt, welche durch Mischung der SBG-Stocklösung einer Konzentration von 10nmol/L mit SBG-Diluent erreicht wurde. Das in der Reaktion verwendete Enzymsubstrat RGP wurde gemäß den Herstellerempfehlungen für 30 min vor der Messung bei 30° auf einem Orbitalschüttler bei 900 rpm inkubiert und anschließend kurz vor Start der Messung in das Messgerät verbracht. Zuletzt wurde das Volumen

beadgekoppelter Anti-AQP4-Antikörper-Vorratslösung (siehe 3.6.5.1) in Bead Diluent verdünnt, welches zum Erreichen der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 500.000 beads/mL im Reaktionsansatz benötigt wurde. Dabei ist eine ausreichend hohe Bead-Konzentration Grundlage einer ausreichenden Sensitivität der Proteinkonzentrationsbestimmung im SIMOA-Assay.

Analog zu den im Vorfeld durchgeführten ELISA-Messungen war für die Konzentrationsbestimmung am SIMOA-Analyzer die Erstellung einer Standardreihe aus aufsteigenden Konzentrationen des rekombinanten Aquaporin-4-Proteins erforderlich. Die Auftragung dieser Kalibratoren erfolgte zusammen mit den zu messenden Proben auf einer 96-Well-Platte. Im Verlauf der Etablierung des Assays wurden dabei verschiedene Verdünnungen der Kalibratoren als auch der Proben evaluiert. In den finalen Messungen deckte die Standardreihe Konzentrationen zwischen 5 und 3500 pg/mL ab.

Nach Beladung des SIMOA-Analyzers mit Reagenzien und Substraten sowie Einstellung der Assay-Parameter am Gerät, erfolgte die vollautomatische Konzentrationsbestimmung im Gerät nach den unter 3.6.5 beschriebenen Prinzipien.

3.6.5.3 Vergleich verschiedener Assay-Formate

SIMOA-Assays können grundsätzlich in einem 2-Schritt- oder 3-Schritt-Format erstellt werden. Bei 2-Schritt-Assays erfolgt die gleichzeitige Inkubation von Probe, Capture-Beads und Detektor-Antikörper, während beim 3-Schritt-Assay zunächst nur Probe und Capture-Antikörper zusammengebracht werden und nach Ablauf einer definierten Inkubationszeit und eines Waschschrilles die Inkubation mit dem Detektor-Antikörper erfolgt. Beiden Assayformaten gemein ist die anschließende Inkubation mit SBG und RGB nach dem oben beschriebenen Messprinzip.

Durch die unterschiedliche Reaktionsfolge beeinflusst das gewählte Assayformat die Assayperformance und letztlich auch die Sensitivität. Daher erfolgten Experimente mit Standardreihen gleicher Konzentrationen in Dreifachbestimmung sowie Liquor- und Serumproben vergleichend mit beiden Assayformaten. Anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses, welches die Relation von detektiertem Signal einer Probe mit definierter Konzentration des Analyten zum Signal einer Negativkontrolle (Rauschen) beschreibt, wurde die Performance beider Varianten miteinander verglichen.

3.6.5.4 Optimierung der Anzahl der verwendeten Beads

Zur Steigerung der analytischen Sensitivität kann in einem SIMOA-Assay die Anzahl der verwendeten Capture-Beads variiert werden. Dabei wird zur Erreichung einer ausreichenden Anzahl von 500.000 beads/mL bei der Durchführung des Versuchs ein Teil der antigenspezifischen Capture-Beads durch Helper Beads ersetzt. Zur Evaluation der Assayperformance unter diesen veränderten Bedingungen wurden Beadlösungen hergestellt, die 350.000, 250.000 oder 150.000 capture beads/mL enthalten. Zur Erreichung der erforderlichen Gesamt-Beadkonzentration wurde eine entsprechende Menge an Helper Beads ergänzt. Anhand einer Standardreihe sowie mit PBST verdünnten Liquorproben erfolgte im Anschluss die vergleichende Bestimmung der AEB unter Verwendung der variierten Beadlösungen. Zur Beurteilung der optimalen Performance wurde das jeweilige Signal-Rausch-Verhältnis im Anschluss betrachtet.

3.6.5.5 Optimierung der Inkubationszeit und des Probenvolumens

Eine weitere Option der Veränderung des generierten Messsignals ist die Variation der Inkubationszeit der Proben mit dem Capture- und/oder Detektor-Antikörper. Hierzu wurden je 100µL von identischen Liquor- und Serumproben sowie jeweils eine Negativkontrolle (PBST) für entweder 25, 50, 75 oder 100 Mess-Kadenzen in einem Zweischritt-Assay inkubiert. Eine Kadenz entspricht dabei 45 Sekunden, sodass die Inkubationszeit bis zu 75 min betrug.

Bei einer Inkubationszeit von 37,5 min (50 Kadenzen) wurden zudem vergleichend unterschiedliche Probenvolumina von 55 bis 172µL für Liquor- und Serumproben inkubiert, um den Einfluss des verwendeten Probenvolumens pro Messküvette zu untersuchen. Wie auch für die Untersuchung variierten Inkubationszeiten erfolgte zur Bewertung des Effekts der Inkubationszeit auf die Performanz die Berechnung des Signal-Rausch-Verhältnisses.

3.6.5.6 Untersuchung des Assayparallelismus

Die Untersuchungen zum Assayparallelismus orientieren sich an Handlungsempfehlungen zur Validierung von Immunoassays⁹⁸. Hierfür wurde eine serielle Zweifach-Verdünnungsreihe für Liquor- und Serumproben in PBST erstellt. Später erfolgte ergänzend die zusätzliche Bestimmung von Liquorproben in 1:3- und 1:6-Verdünnung. Nach Korrektur um den Verdünnungsfaktor wurden die ermittelten Konzentrationen je untereinander für Serum und Liquor verglichen.

3.6.5.7 Evaluation der Wiederfindungsrate (Spiking)

Zur weiteren Validierung der Assaypräzision wurden Proben der drei zur Etablierung des Assays überprüften Matrices Serum, Plasma und Liquor mit rekombinatem AQP4-Protein versetzt, welches auch zur Herstellung der Kalibrationskurven Anwendung fand. Dabei wurde jeweils ein solches Volumen der Stocklösung des Proteins zugesetzt, das erforderlich war um den Proben 1000pg/mL oder 500 pg/mL hinzuzufügen. In gleicher Weise wurde der zur Proben- und Kalibratorverdünnung verwendete Puffer mit rekombinantem Protein versetzt. Die hierfür ermittelten Konzentrationen wurden als Referenzwert für die detektierte Konzentration in den mit rekombinantem Protein versetzten Proben (abzüglich der korrespondierend bestimmten Liquor-/Serum- oder Plasma-AQP4-Konzentration) zu Rate gezogen.

3.6.5.8 Probenaufbereitung

Serum- und Liquorproben wurden im Rahmen der Etablierungsphase des AQP4-Assays verschiedenen Methoden der Probenaufbereitung unterzogen. Diese Versuche dienten der Evaluation möglicher Einflüsse auf das Fluoreszenzsignal des Assays und damit auf die Sensitivität der Konzentrationsbestimmung.

Eine Möglichkeit der Beeinflussung der Proteindetektion besteht durch das Versetzen der Proben mit chemischen Detergenzien, welche Proteine denaturieren und damit Störeinflüsse auf die Konzentrationsbestimmung vermindern können. Durch Hinzufügen einer hochmolaren Natriumchlorid-Lösung können zudem ionische Wechselwirkungen beeinflusst werden. Die unterschiedlichen Methoden der Probenvorbereitung werden in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 9 – Durchgeführte Methoden der chemischen Probenvorbereitung
RIPA – Radioimmunopräzipitationsassay. BSA – bovinen Serumalbumin. DTT – Dithiothreitol. NaCl – Natriumchlorid.

	Konzentration	Inkubationszeit
Harnstoff (Urea)	0,05 M	10 min
	0,5 M	10 min
	1 M	10 min
RIPA-Puffer	0,5-fach	10 min
	0,5-fach	1 h
BSA + Tween20	1% BSA, 0,05% Tween20	1 h
NaCl	2 M	1 h
DTT	10 mM	1 h
	100 mM	1 h

Neben chemischen Denaturierungsmöglichkeiten sollten auch thermische Methoden und deren Einfluss auf die AQP4-Bestimmung evaluiert werden. Hierfür wurden native Serum- und Liquorproben vor der Messung für 10 min bei 60°C oder 90°C inkubiert. Alle mit den genannten Methoden vorbereiteten Proben sowie auch eine unvorbereitete Serum- und Liquorprobe wurden im Anschluss im Verhältnis 1:2 mit PBST-Puffer verdünnt und die AQP4-Konzentrationen in einem Versuchsdurchlauf am SIMOA-Analyser gemessen.

Bei einem beschriebenen Molekulargewicht eines AQP4-Monomers von etwa 32 bis 34 kDa je nach Isoform⁹⁹ wurden native Seren und Liquores unter der Hypothese einer so zu erreichenden Aufkonzentrierung von AQP4 in der Untersuchungsmatrix durch Entfernung höhermolekularer Proteine wie Albumin mit einem Molekulargewicht von 66 kDa¹⁰⁰ durch einen AMICON-50-kDa-Zentrifugalfilter aufbereitet. Die so generierten Filtrate wurden unverdünnt zusammen mit unfiltrierten Vergleichs-Liquor- und -Serumproben auf eine 96-Well-Platte verbracht und mittels des AQP-4-SIMOA untersucht.

In einem weiteren Experiment wurden zuvor mit 100mM- oder 10mM-DTT-Lösung oder 0,5-fachem RIPA-Puffer für 1h inkubierte Liquor- und Serumproben durch AMICON-Zentrifugalfilter filtriert und deren Aquaporin-4-Konzentration anschließend ebenfalls jeweils im Vergleich zur nativen und mit Detergens versetzten, aber nicht filtrierten Probe bestimmt. Weiterhin wurden verbleibende Überstände nach der Filtration als Probe auf die 96-well-Platte aufgetragen.

3.6.5.9 Methodenvergleich zwischen SIMOA- und ELISA-Assay

Beide im Rahmen dieses Promotionsprojektes zur Aquaporin-4-Messung verwendeten Assay-Methoden wurden anhand der durch sie detektierten Konzentrationswerte miteinander verglichen. Zur statistischen Untersuchung auf eine Korrelation der beiden Methoden fand eine Spearman-Analyse Verwendung. Darüber hinaus wurde eine lineare, nicht-parametrische Regression (Passing-Bablok-Regression) durchgeführt, um eine Umrechnung der Ergebnisse zwischen den Messmethoden zu ermöglichen.

3.6.6 Statistische Verfahren

Die Berechnung der im Folgenden aufgeführten statistischen Verfahren erfolgte unter Verwendung der Statistiksoftware GraphPad Prism 10.

Zur Detektion von Unterschieden zwischen zwei Kohorten fand der Mann-Whitney-U-Test für nicht-parametrische Variablen Verwendung. Ausgenommen hiervon ist der Vergleich der Geschlechtsverteilung in den diagnostischen Gruppen, für die ein Chi-Quadrat-Test zur Anwendung kam. Im Falle des Vergleichs von 3 oder mehr Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test und bei Detektion signifikanter Unterschiede der multiple Vergleichstest nach Dunn angewandt. Mithilfe eines Spearman-Rangtests wurden verschiedene Parameter der Kohorten auf eine mögliche Korrelation überprüft. Weiterhin wurden das diskriminative Potential des Biomarkers Aquaporin-4 und daraus resultierende optimale Cut-off-Werte über ROC-Analysen (*receiver operating characteristics*) und die Auswahl des höchsten Youden-Index ($YI = \text{Sensitivität} + \text{Spezifität} - 1$) ermittelt.

Für alle genannten Testverfahren wurden Ergebnisse mit einem p-Wert von $<0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Deskriptive Statistik der Kohorten der Pilotmessungen

Für die vorliegende Arbeit wurden 278 Proben von Patienten mit Narkolepsie Typ 1 (NT1) (N=133) sowie Kontrollen, die bei bestehender Hypersomnolenz-Symptomatik zum Ausschluss einer Narkolepsie Typ 1 lumbalpunktiert wurden, bei denen jedoch keine pathologische Erniedrigung des Hypocretin-1-Spiegels festgestellt werden konnte (N=145), eingeschlossen. Ein Patient der Kontrollgruppe erfüllte die klinischen ICSD-3-Kriterien für eine NT1, wurde jedoch aufgrund einer Hypocretin-1-Konzentration von 346 pg/mL der Kontrollgruppe zugeordnet. Bei den übrigen Patienten wurden nach abgeschlossener Diagnostik andere schlafmedizinische Differentialdiagnosen gestellt. Zwischen den Gruppen bestand kein Altersunterschied ($p=0,98$). Ein Chi-Quadrat-Test wies eine ausgeglichene Geschlechterverteilung zwischen den Gruppen nach ($p=0,27$). Für einen Teil der Patienten konnte der Body Mass Index (BMI) erhoben werden. NT1-Patienten (N=69) hatten einen höheren mittleren BMI von 29 kg/m^2 als Kontrollpatienten (N=71, $p = 0,006$). Die Hypocretin-1-Konzentration der NT1-Kohorte lag entsprechend der gewählten Kohortierungskriterien unterhalb des Cut-off-Wertes von 110 pg/mL ($33 \pm 30 \text{ pg/mL}$), verglichen mit einer mittleren Hypocretin-1-Konzentration von $305 \pm 102 \text{ pg/mL}$ in der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$). Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über statistische Kenndaten beider Kohorten.

Tabelle 10 - Deskriptive Statistik der NT1-Kohorte und schlafmedizinischer Kontrollen (Kontrollgruppe 1)

Für Alter, Hypocretin-1-Konzentration im Liquor und BMI sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung angegeben. *NT1 – Narkolepsie Typ 1. BMI – Body Mass Index. NT2 – Narkolepsie Typ 2.*

	NT1-Patienten (Hcrt-1 < 110 pg/mL)	Kontrollgruppe 1 (Hcrt-1 > 110 pg/mL)
Anzahl	133	145
Anzahl männlich	77	75
Anzahl weiblich	55	70
Alter in Jahren	$37,5 \pm 14,61$	$37,5 \pm 14,81$
Hypocretin-1 im Liquor	$33 \text{ pg/mL} \pm 31 \text{ pg/mL}$	$305 \text{ pg/mL} \pm 102 \text{ pg/mL}$
BMI	$29,1 \pm 7,7 \text{ kg/m}^2$	$25,4 \pm 5,2 \text{ kg/m}^2$

4.2 Klinische Daten

Durch die retrospektive Analyse der Epikrisen und Befunde der einsendenden Kliniken konnten für 86 Patienten mit NT1 sowie für 98 Kontrollen, die schlafmedizinisch evaluiert worden waren, weitere klinische Daten sowie apparativdiagnostische Befunde erhoben werden.

4.2.1 Anamnestische Daten

In den untersuchten Kohorten der Patienten mit NT1 1 sowie schlafmedizinisch evaluierter Kontrollen zeigte sich erwartungsgemäß eine hohe Prävalenz von Tagesmüdigkeit. Patienten mit NT1 klagten in 99% der dokumentierten Fälle über eine Tagesmüdigkeit und damit häufiger als die Patienten der Kontrollgruppe, die in 73% von einer Tagesmüdigkeit berichteten ($p < 0,0001$).

Eines der definierenden Kardinalsymptome einer NT1 ist die Kataplexie²⁹, welche auch in dieser Forschungsarbeit mit einer Prävalenz von 78 % häufiger in der Kohorte der NT1-Patienten mit korrespondierend niedrigen Hypocretin-1-Spiegeln im Liquor festzustellen war, verglichen mit einer Kataplexiehäufigkeit von 10% bei den Kontrollen ($p < 0,0001$). Am häufigsten berichteten NT1-Patienten von Kataplexien des Gesichts oder des Kiefers (69%), gefolgt von der unteren Extremität (63%). 24 % beschrieben das Auftreten generalisierter Kataplexien. 81% der von einer Kataplexie betroffenen NT1-Patienten konnten dabei emotionale Trigger der Kataplexie-Episoden wie Lachen oder Überraschung benennen. Nur bei 2% waren negative Emotionen und Weinen als Auslöser eruierbar.

Das Auftreten typischer Charakteristika der REM-Schlaf-Dissoziation, wie hypnagoge und hypnopompe Halluzinationen und Schlafparalysen, wurden im Rahmen der Erhebungen dieser Forschungsarbeit ebenfalls erfasst. 30% der Patienten mit NT1 konnten von schlafgebundenen Halluzinationen berichten, während diese im Kontrollkollektiv nur von 9% beschrieben wurden ($p = 0,001$). Auch Schlafparalysen waren bei Patienten mit niedrigen Hypocretin-1-Spiegeln mit 32% häufiger als bei Kontrollen (11 %, $p = 0,001$). Insgesamt seltener wurden von den Patienten auch REM-Schlaf-Verhaltensstörungen beschrieben, die bei 9% der Gesamtkohorte in der Anamnese geschildert wurden. Dabei war kein Unterschied zwischen den Gruppen auszumachen ($p = 0,24$).

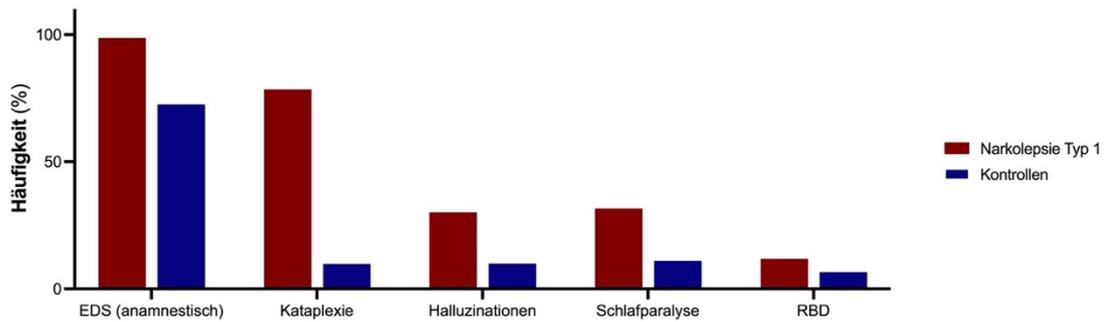


Abbildung 4 – Häufigkeit wichtiger Kardinalsymptome der Narkolepsie Typ 1 in den Kohorten

Abgebildet wird der Prozentsatz der an typischen klinischen Symptomen der NT1 betroffenen Patienten von NT1-Patienten (rot) und Kontrollen (blau). *EDS* – exzessive Tagesschläfrigkeit. *NT1* – Narkolepsie Typ 1. *RBD* – REM-Schlaf-Verhaltensstörung.

Die Epworth-Schläfrigkeitsskala (ESS), deren englischsprachige Variante 1990 von Young *et al.* erstbeschrieben, später überarbeitet und in verschiedene Sprachen übersetzt wurde, ist ein etabliertes Maß für die Erhebung von Tagesschläfrigkeit¹⁰¹. Über einen Fragebogen wird für 8 Situationen die vom Patienten eingeschätzte Wahrscheinlichkeit einzuschlafen anhand eines Punktwerts erhoben. Dabei wird ein ordinales Skalenniveau von 0 („würde niemals einnicken“) bis 3 („hohe Wahrscheinlichkeit einzunicken“) angewandt. Unter Addition der Werte für die Einzelsituationen wird ein Gesamt-ESS-Wert errechnet. Größere Punktwerte korrelieren mit einem größeren Ausmaß an Tagesmüdigkeit. Ab 16 Punkten spricht man von einer ausgeprägten Tagesmüdigkeit (EDS). Im Median zeigten die an NT1 erkrankten Patienten einen Punktwert von 19 in der ESS. Im Vergleich dazu fand sich für die Kontrollgruppe ein Median von 13 Punkten ($p < 0,0001$).

4.2.2 Polysomnographische Daten

Die Durchführung einer Polysomnographie dient im Rahmen der Narkolepsiediagnostik zur Evaluation der Schlafarchitektur sowie der Erueierung des Vorliegens von Differentialdiagnosen oder Komorbiditäten bei Patienten unter dem Verdacht auf NT1. Wichtige Bestandteile der Auswertung sind die Gesamtschlafdauer, die Schlafeffizienz, die definiert ist als Anteil der Gesamtschlafdauer an der Gesamtbettzeit, Anteile der Nicht-REM-Schlafstadien N1 bis N3 und des REM-Schlafes an der Gesamtschlafdauer sowie die Latenz bis zum Einschlafen und die REM-Latenz. Ferner werden über die Registrierung von Apnoen und Hypopnoen, die daraus folgende Berechnung des Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) und den PLMD-Index (periodic limb movement disorder) Rückschlüsse auf das Vorliegen eines Schlafapnoesyndroms oder periodischer Beinbewegungen im Schlaf als wichtige Differentialdiagnosen geschlossen.

In nachfolgender Tabelle werden die wichtigsten Polysomnographie-Befunde für NT1-Patienten und Kontrollen gegenübergestellt.

Tabelle 11 – Polysomnographie bei Narkolepsie Typ 1 und schlafmedizinischen Kontrollen

Die Einschlaf latenz ist als Zeit vom Zubettgehen bis zum Erreichen des Schlafstadiums N1 definiert. Die Unterscheidung der Schlafstadien N1 – N3 erfolgt über die Ableitung einer Elektroenzephalographie und Anwendung der jeweiligen Definitionskriterien. Es werden für alle Parameter Mittelwerte mit Standardabweichung genannt. NT1 – Narkolepsie Typ 1. Hcrt-1 – Hypocretin-1. ***: $p \leq 0.001$. **: $p \leq 0.01$.

	NT1-Patienten (Hcrt-1 < 110 pg/mL)	Kontrollgruppe 1 (Hcrt-1 > 110 pg/mL)	
Gesamtschlafdauer (min)	363 ± 73	385 ± 97,7	
Schlafeffizienz (%)	86,2 ± 10,6	84,8 ± 13,5	
N1-Anteil (%)	16,0 ± 9,7	10,6 ± 8,7	***
N2-Anteil (%)	50,1 ± 10,0	52,3 ± 9,3	
N3-Anteil (%)	17,3 ± 9,2	19,6 ± 10,72	
REM-Anteil (%)	16,4 ± 6,9	17,39 ± 6,6	
Einschlaf latenz (min)	15,3 ± 12,0	28 ± 47,7	
REM-Latenz (min)	72,8 ± 81,6	104 ± 72,6	**
Apnoe-Hypopnoe-Index (/min)	4,3 ± 6,0	3,6 ± 5,7	
PLMD-Index (/min)	3,4 ± 13,6	1,0 ± 3,4	

Zusammenfassend war eine verkürzte REM-Latenz auf im Mittel 72,8 min bei NT1-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen auffällig ($p=0,002$). Zudem zeigte sich im NT1-Kollektiv eine Erhöhung des Anteils des frühen N1-Stadiums in der PSG ($p=0,0006$). 22% der NT1-Patienten zeigten als Komorbidität ein obstruktives Schlaf-Apnoe-Syndrom (oSAS). Periodische Beinbewegungen im Schlaf (PLMD) traten bei 11,6% auf.

4.2.3 Multipler-Schlaf-Latenz-Test (MSLT)

Dem Multiplen-Schlaf latenz-Test kommt in der Diagnostik der Narkolepsie Typ 1 eine große Bedeutung zu. Hintergrund des in den 1970er Jahren durch Carskadon und Dement entwickelten Tests¹⁰² ist die Beobachtung, dass vermehrte Schläfrigkeit bei NT1 mit einer verkürzten Einschlaf latenz verbunden ist. Der Test erfolgt nach Anbringen der Elektroden für die Ableitung von Elektroenzephalographie, submentaler Elektromyographie sowie Elektrokulographie frühestens 1,5 h nach dem morgendlichen Erwachen in einem ruhigen, abgedunkelten Raum. Ein Testdurchgang,

in dem der Patient versuchen soll einzuschlafen, dauert 20 min, es schließen sich 3-4 Wiederholungen in zweistündigem Abstand an.

Leitbefunde im MSLT für eine Narkolepsie sind eine mittlere Einschlaf latenz von weniger als 8 min sowie das Auftreten von mindestens 2 REM-Schlaf-Phasen innerhalb von 15 min nach Schlafbeginn (*sleep onset REM period*, SOREMP)⁵. Diese Befunde müssen jedoch im klinischen Kontext interpretiert werden, da auch bei Gesunden Einschlaf latenzen von unter 5 min vorkommen können und SOREMPs auch im Rahmen von Depressionen oder nach Schlafdeprivation auftreten können¹⁰³.

In dieser Forschungsarbeit liegen für 75 Patienten mit NT 1 sowie 60 Kontrollen MSLT-Daten vor. NT1-Patienten wiesen eine reduzierte mittlere Einschlaf latenz von $4,5 \pm 3,1$ min im Vergleich zu $9,3 \pm 4,97$ min bei Kontrollen auf ($p < 0,0001$). Durchschnittlich traten $2,4 \pm 1,7$ SOREMPs im MSLT bei der NT1-Kohorte auf. Bei Kontrollen waren $1,11 \pm 1,3$ SOREMPs zu beobachten ($p < 0,0001$).

4.2.4 Laborbefunde

Eine starke Assoziation mit dem HLA-Haplotyp DQB1*06:02 ist typisch für die NT1 und unterstreicht die Autoimmunhypothese der Pathophysiologie²⁹. 82% der NT1-Patienten dieser Arbeit, für die Daten zum HLA-Status erhoben wurden (N=41), zeigten den erkrankungsprädisponierenden Haplotyp DQB1*06:02. In der Kontrollgruppe lag die Häufigkeit dieses Haplotyps bei 57,6% ($p = 0,01$). Auch der in der Regel korrespondierend vorliegende Haplotyp HLA DRB1*15 war häufiger in der NT1-Kohorte (92,6% vs. 44,8%, $p < 0,0001$).

Tabelle 12 - Basisdaten aus der Liquoranalyse von NT1-Patienten und Kontrollen
 Angegeben sind für Zellzahl und Gesamtproteinkonzentration im Liquor jeweils Mittelwert und Standardabweichung. Unter oligoklonalen Banden ist der Anteil der Kohorte in Prozent angegeben, der eine Typ-2- oder Typ-3-Reaktion und damit isolierte Liquorbanden in der vergleichenden isoelektrischen Fokussierung von Liquor und Serum zeigte. NT1 – Narkolepsie Typ 1. Hcrt-1 – Hypocretin-1.

	NT1-Patienten (Hcrt-1 < 110 pg/mL)	Kontrollgruppe 1 (Hcrt-1 > 110 pg/mL)
Zellzahl (μL)	$2,7 \pm 3,66$	$1,9 \pm 1,92$
Gesamtprotein im Liquor (g/L)	$0,36 \pm 0,14$	$0,35 \pm 0,13$
Albuminquotient ($\times 10^{-3}$)	$5,1 \pm 2,4$	$5,62 \pm 2,44$
Positive oligoklonale Banden	10,8%	8,2%

Bezüglich der Lumbalpunktion, die die Patienten dieser Kohorten zum Ausschluss entzündlicher oder neurodegenerativer Erkrankungen beziehungsweise zur Hypocretin-1-Bestimmung im Liquor erhalten hatten, wurden Basisdaten der neurochemischen Analyse erhoben, die Tabelle 12 entnommen werden können. Dabei konnten für keinen der aufgeführten Parameter Unterschiede zwischen den Kohorten festgestellt werden.

4.3 Etablierung und Validierung des Aquaporin-4-ELISA

Basierend auf den Forschungsergebnissen der Untersuchungen der Kollegen der Universitätsklinik für Neurologie Ulm wurde für die vorliegende Promotionsarbeit ein nicht-kommerzieller ELISA-Assay für die Detektion von Aquaporin-4 etabliert. Vor Verwendung des ELISAs zur AQP4-Messung in der Studienkohorte erfolgte die Bestimmung der Assaypräzision und der präanalytischen Einflussfaktoren.

4.3.1 Assaypräzision

Voraussetzung für eine gute Präzision eines Immunoassays ist eine qualitativ hochwertige Standardreihe. Für den hierorts etablierten ELISA deckte die Kalibrationskurve einen Konzentrationsbereich von 62,5 – 3500 pg/mL ab. Anhand der gemessenen optischen Dichte (OD) der Standards mit unterschiedlichen Konzentrationen des rekombinanten Proteins wurde die Eichkurve des Assays unter Zuhilfenahme einer 4-Parameter logistischen Regression (1/y) erstellt. Der mittlere Determinationskoeffizient der Regression (r^2) betrug 0,994.

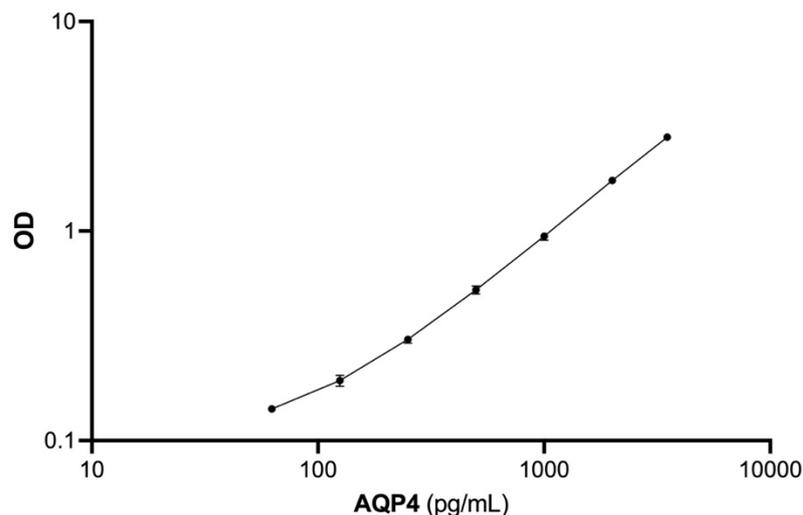


Abbildung 5 – Typische Kalibrationskurve für den Aquaporin-4-ELISA

Im Diagramm werden die gemessene optische Dichte (OD) gegen die Konzentrationen der Standardreihe doppelt-logarithmisch aufgetragen. Dabei fand eine 4-Parameter logistische Regression Anwendung ($r^2 = 0,994$).

Im Rahmen der Vierfachbestimmung einer Referenzprobe konnte eine mittlere Intra-Assay-Variabilität von 4,96% detektiert werden (2,4% – 7,0%). Zudem konnte anhand zwei aliquotierter und in mehreren Assay-Durchgängen bestimmter Liquorproben eine mittlere Inter-Assay-Variabilität von 14% (12% - 15%) nachgewiesen werden. In der weiteren Auswertung zeigte sich eine untere Quantifizierungsgrenze (lower limit of quantification, *LLOQ*) des ELISAs von 104 pg/mL. Als *LLOQ* wurde die Konzentration definiert, die bezogen auf die Kalibrationskurve der optischen Dichte (OD_{LLOQ}) entspricht, die sich aus der Addition des Mittelwerts der optischen Dichte einer Negativkontrolle ($mean_{OD\ Blank}$) in Mehrfachbestimmung mit der zehnfachen Standardabweichung dieser Werte ($sd_{OD\ Blank}$) ergibt.

$$OD_{LLOQ} = mean_{OD\ Blank} + sd_{OD\ Blank}$$

4.3.2 Präanalytische Einflussfaktoren auf die Proteinstabilität von Aquaporin-4 und Variabilität des Aquaporin-4-ELISAs

Zur Einschätzung der Beeinflussung der Messergebnisse des etablierten Aquaporin-4-ELISAs durch veränderte Lagerungsbedingungen der Proben in der präanalytischen Phase wurde eine der Liquorproben wiederholten Einfrier-Auftau-Zyklen ausgesetzt (wie unter 3.6.4 beschrieben). In den nachfolgend durchgeführten ELISA-Messungen ergaben sich in den Proben nach 2 bis 4 Einfrier-Auftauzyklen AQP4-Konzentrationen von 103%, 97% sowie 98% bezogen auf den Referenzwert einer lediglich einmal vor der Konzentrationsbestimmung aufgetauten Probe (100%, 4696 ± 73 pg/mL). Eine niedrige Assay-CV von 1,8% zeigt die hohe Stabilität des AQP4-Proteins in bis zu viermal aufgetauten Proben (siehe Abbildung 6).

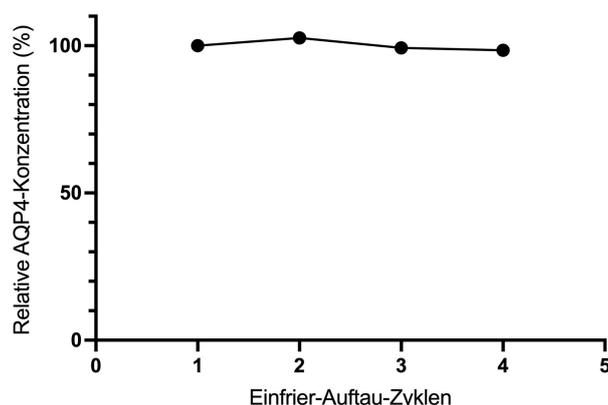


Abbildung 6 – Präanalytischer Einfluss wiederholter Einfrier-Auftau-Zyklen auf die Bestimmung der Aquaporin-4-Konzentration im Liquor

Dargestellt ist die prozentuale AQP4-Konzentrationen für Liquorproben, die 1-4 Einfrier-Auftau-Zyklen ausgesetzt waren, in Bezug auf die Referenzprobe nach einmaligem Auftauen. *AQP4* – *Aquaporin-4*.

4.4 Aquaporin-4-Liquorkonzentration bei Narkolepsie Typ 1

In den durchgeführten ELISA-Untersuchungen an den Pilotkohorten zeigte sich für die Patienten mit Narkolepsie Typ 1 und niedrigen Hypocretin-1-Konzentrationen im Liquor ein mittlerer Aquaporin-4-Spiegel im Liquor von 3585 ± 1140 pg/mL. Im Mann-Whitney-U-Test war für die korrespondierend betrachtete Kontrollgruppe mit schlafmedizinischen Differentialdiagnosen eine höhere mittlere Aquaporin-4-Liquorkonzentration von 4262 ± 1462 pg/mL festzustellen ($p < 0,0001$).

4.4.1 Validierung der Messergebnisse an weiteren Kontrollkohorten

Um die beschriebenen Ergebnisse der Pilotmessung zu validieren, erfolgte anschließend die Bestimmung der AQP4-Konzentration zusätzlicher Liquorproben aus der Biobank Halle, die von Patienten stammen, deren Liquores im Zeitraum von 2021 – 2024 im Rahmen der differentialdiagnostischen Evaluation von unklaren Kopfschmerzen, Schwindel und als funktionell gewerteten Beschwerdebildern per Lumbalpunktion gewonnen worden waren. Eine Auflistung der Diagnosen findet sich im Anhang (Tabelle 15). Bei allen Patienten dieser Gruppe konnte ein entzündliches Liquorsyndrom laborchemisch ausgeschlossen werden. Insgesamt wurden für die diese Kohorte Proben von 62 Patienten analysiert. Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich bezogen auf die Patienten mit Narkolepsie Typ 1 kein Altersunterschied ($p=0,4$) bei einem jedoch höheren Anteil an Patientinnen in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

Als weitere Vergleichsgruppe wurden zudem Liquorproben von Patienten mit Alzheimer-Demenz aus der Biomaterialbank der UMH rekrutiert. Alle Patienten erfüllten in der Liquoranalyse die biochemische Definition der Alzheimer-Demenz nach den Jack-Kriterien¹⁰⁴ (A+, T+, N+) mit mittleren p-Tau-Werten von $92,78 \pm 37,8$ pg/mL, einer mittleren t-Tau-Konzentration von $645,4 \pm 149,8$ pg/mL sowie einer Amyloid-Ratio ($A\beta$ 1-42 / $A\beta$ 1-40) von im Mittel $0,04 \pm 0,01$. Für das Kollektiv der Alzheimer-Patienten sind deutlich erhöhte AQP4-Konzentrationen im Liquor vorbeschrieben, sodass diese Gruppe als Krankheitskontrollkohorte in die Untersuchungen eingefügt wurde⁸⁹. Im Mittelwert waren die Alzheimer-Patienten zum Zeitpunkt der Liquordiagnostik 76,2 Jahre alt und damit älter als alle anderen Kohorten dieser Studie. Dabei wurden Gruppenunterschiede zu den übrigen Kohorten mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Dunn's-post-hoc-Test analysiert ($p < 0,0001$). Weitere Charakteristika der Hallenser Kontrollkohorten können Tabelle 15 im Anhang entnommen werden.

4.4.2 Aquaporin-4-Konzentration der unterschiedlichen diagnostischen Gruppen

In der Zusammenschau aller Untersuchungsergebnisse zeigten Patienten mit Narkolepsie Typ 1 unter Verwendung eines Kruskal-Wallis- und Dunn's-post-hoc-Tests niedrigere Aquaporin-4-Konzentrationen als die Patienten der initialen Kontrollgruppe mit nicht-pathologisch alterierten Hypocretin-1-Konzentration im Liquor ($p < 0,0001$), als Patienten der zweiten Kontrollkohorte ($p = 0,024$) sowie Patienten mit Alzheimer-Demenz ($p < 0,0001$). Die höchste mittlere Aquaporin-4-Konzentration von 7761 ± 2319 pg/mL konnte für das Kollektiv der Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden mit deutlichen Gruppenunterschieden nicht nur im Vergleich mit der NT1-Kohorte, sondern auch zu beiden anderen Kontrollkohorten ($p = 0,001$ und $p = 0,0006$). Zwischen den beiden Kontrollgruppen ließen sich keine Gruppenunterschiede detektieren ($p > 0,9999$).

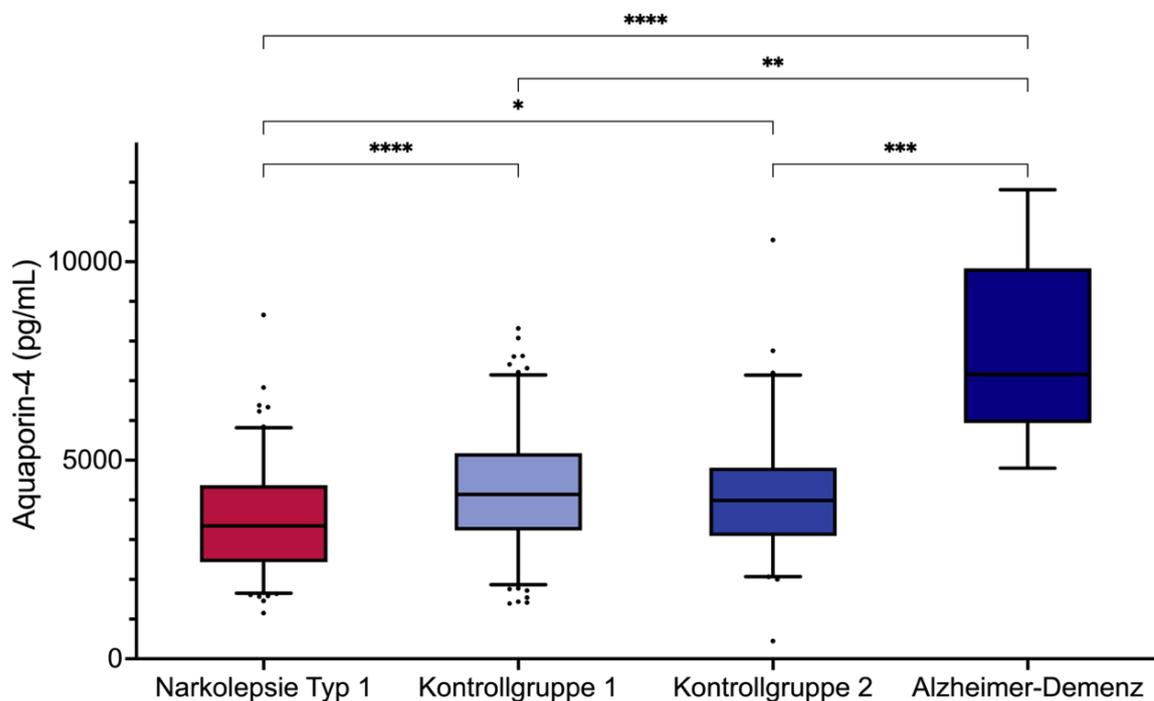


Abbildung 7 – Aquaporin-4-Konzentration im Liquor verschiedener diagnostischer Kohorten

Abgebildet werden Box-Whiskers-Plots der verschiedenen untersuchten Gruppen im Vergleich zueinander. Die Begrenzungen der Box repräsentieren jeweils den Median der AQP-4-Konzentration und die 25. und 75. Perzentile. Whiskers geben die 5. sowie 95. Perzentile an. Außerhalb dieser Grenzen liegende Werte sind als einzelne Punkte repräsentiert. Gruppenunterschiede wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis- und Dunn's-post-hoc-Tests determiniert. NT1-Patienten zeigen im Vergleich zu allen anderen Kohorten erniedrigte AQP4-Konzentrationen im Liquor. ****: $p \leq 0.0001$. ***: $p \leq 0.001$. **: $p \leq 0.01$. *: $p \leq 0.05$.

Tabelle 13 – Aquaporin-4-Konzentrationen der verschiedenen Kohorten im Vergleich

Für die Aquaporin-4-Konzentration werden Mittelwerte und Standardabweichung angegeben. *Hcrt-1* – *Hypocretin-1*. *AQP4* – *Aquaporin-4*.

	NT1-Patienten (Hcrt-1 < 110 pg/mL)	Kontrollen 1 (Hcrt-1 >110 pg/mL)	Kontrollen 2 (Biobank UMH)	Alzheimer-Kohorte
Probenanzahl	133	145	62	9
AQP4 (pg/mL)	3489 ± 1328	4272 ± 1463	4158 ± 1624	7761 ± 2319

Angesichts des höheren Alters der Alzheimer-Patienten im Vergleich zu den anderen untersuchten Gruppen wurden in einer weiteren Analyse die Konzentrationen der Alzheimerkohorte jeweils mit Patienten der NT1-Patienten, der initialen Kontrollkohorte mit nicht-pathologischen Hypocretin-1-Spiegeln sowie der 2. Kontrollkohorte verglichen, die am ehesten dem höheren Alter der Alzheimer-Kohorte entsprachen. Für die auf diese Weise zusammengestellten Gruppen fand sich im Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-post-hoc-Test eine niedrigere AQP4-Konzentration für NT1-Patienten im Vergleich zur Alzheimer-Kohorte ($p=0,03$) während für die anderen Gruppenvergleiche kein Unterschied festzustellen war. Unter Anwendung individueller Mann-Whitney-U-Tests zeigten die Alzheimer-Patienten höhere AQP4-Konzentrationen als NT1-Patienten ($p=0,008$), als die Kontrollen mit nicht-pathologisch veränderten Hypocretin-1-Spiegeln (Kontrollen 1, $p=0,04$) sowie im Vergleich zur Validierungskontrollkohorte (Kontrollen 2, $p=0,01$).

Unter Betrachtung der etablierten Biomarker für die Alzheimer-Demenz zeigte sich in der Spearman-Korrelationsanalyse eine Tendenz zu einer positiven Korrelation von Aquaporin-4-Konzentration und t-tau ($r=0,5$; $p=0,16$).

4.4.3 Korrelation der Liquor-Aquaporin-4-Konzentration mit Biomarkern der Narkolepsie

Für die 278 Patienten der NT1-Kohorte und der Gruppe mit schlafmedizinischen Differentialdiagnosen lagen Messwerte für Hypocretin-1 im Liquor vor. Unter isolierter Betrachtung der Kontrollkohorte mit nicht-pathologischen Hypocretin-1-Konzentrationen fand sich in der Spearman-Korrelationsanalyse ein positiver Zusammenhang moderater Stärke zwischen Aquaporin-4- und Hypocretin-1-Konzentration im Liquor ($r=0,33$, $p<0,0001$). Für die NT1-Kohorte konnte eine isolierte Betrachtung keine Korrelation nachweisen, da bei Auswertung der nativen Daten über 50% der Hypocretin-1-Werte dieser Patienten unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze (LLOQ) des Hypocretin-

1-RIA lagen, damit als <10 pg/mL ausgegeben wurden und nicht metrisch skaliert vorlagen ($r=-0,009$, $p=0,45$).

Für die Verwendung von Werten unterhalb des LLOQ gibt es unter anderem für pharmakokinetische Untersuchungen verschiedene Ansätze. Unter Anwendung des von Beal et al. eingeführten und von Keizer et al. postulierten Ansatzes, alle unterhalb des LLOQ liegenden Messwerte mit der Hälfte des LLOQ zu ersetzen^{105–107}, entsprechend einer Konzentration von 5 pg/mL für den Hypocretin-1-RIA, konnte für die Gesamtkohorte eine moderate positive Korrelation gezeigt werden ($r=0,35$, $p<0,0001$). Wenn diese subliminalen Werte aus der Korrelationsanalyse ausgeschlossen wurden, war ebenfalls eine schwache bis moderate Korrelation zwischen AQP4 und Hypocretin-1 für die Gesamtpopulation der Untersuchungen dieser Forschungsarbeit ersichtlich ($r=0,28$, $p<0,0001$).

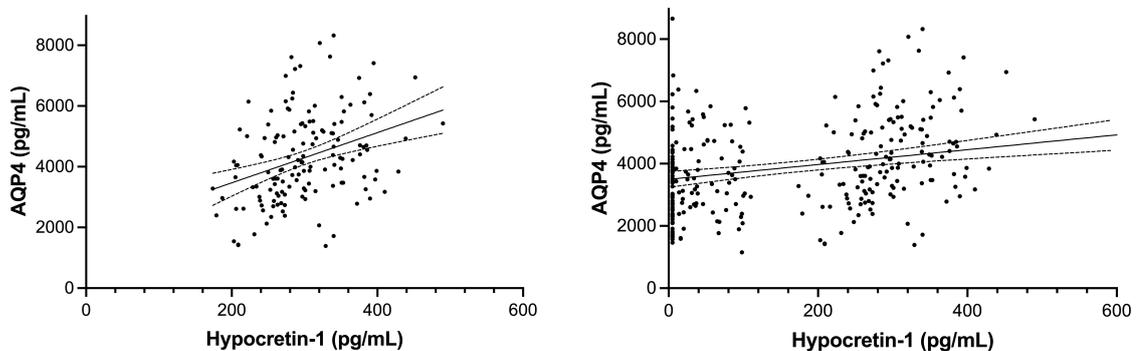


Abbildung 8 – Korrelation von Aquaporin-4 und Hypocretin-1

Linkes Diagramm: Dargestellt ist die moderate positive Korrelation von AQP4 und Hcrt-1 in der Kontrollkohorte mit nicht-pathologischen Hypocretin-1-Konzentrationen ($r=0,33$, $p<0,0001$). Rechtes Diagramm: Abgebildet ist die Spearman-Korrelationsanalyse für die gesamte Kohorte. Hypocretin-1-Werte unterhalb des LLOQ des Assays sind auf 5 pg/mL angepasst worden ($r=0,35$, $p<0,0001$). AQP4 – Aquaporin-4. Hcrt-1 – Hypocretin-1. LLOQ – unteres Quantifizierungslimit.

Neben der Korrelation mit dem einzigen etablierten diagnostischen laborchemischen Biomarker der Narkolepsie, Hypocretin-1, wurde auch ein Zusammenhang zwischen AQP4 und klinischen Biomarkern der Narkolepsie untersucht. So konnte für die Gesamtkohorte aus 349 Proben eine schwache bis moderate Korrelation zwischen Patientenalter bei Lumbalpunktion und AQP4 nachgewiesen werden ($r=0,26$, $p<0,0001$). Dieser Zusammenhang konnte für die isoliert betrachtete NT1-Kohorte ($r=0,25$, $p=0,004$) sowie die Kontrollgruppen reproduziert werden ($r=0,21$, $p=0,002$) und ist in Abbildung 9 dargestellt.

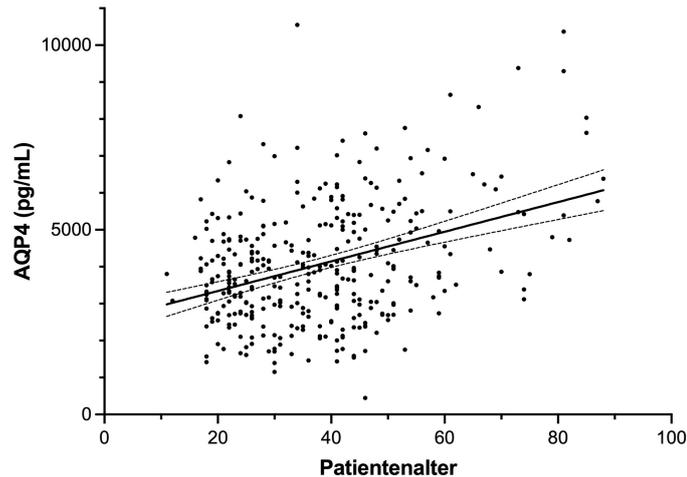


Abbildung 9 – Korrelation von Aquaporin-4-Konzentration und Patientenalter

Im Diagramm ist ein schwacher bis moderater Zusammenhang von AQP4-Konzentration und Patientenalter zum Zeitpunkt der Probenentnahme in der Gesamtkohorte (N=349) ersichtlich ($p < 0,0001$). Die Steigung der Gerade durch die als Punktwolke dargestellten Einzelwerte entspricht dem Spearman-Korrelationskoeffizienten ($r = 0,26$). Innerhalb der gestrichelten Linien befindet sich das 95%-Konfidenzintervall der Korrelation. *AQP4 – Aquaporin-4.*

Ein Unterschied zwischen den Geschlechtern hinsichtlich der AQP4-Konzentration konnte nicht festgestellt werden ($p = 0,47$). Ferner fand sich auch keine Korrelation von Body-Mass-Index und AQP4-Konzentration ($r = -0,07$, $p = 0,37$).

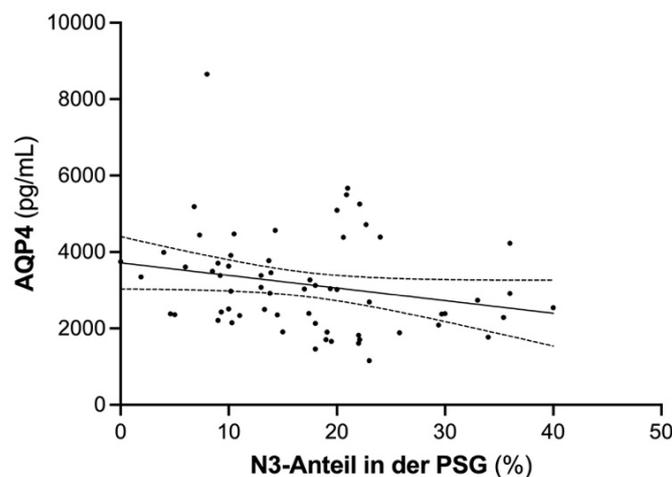


Abbildung 10 – Korrelation von Aquaporin-4-Konzentration im Liquor und N3-Anteil in der Polysomnographie

Zu sehen ist eine negative Korrelation von AQP4 und N3-Anteil bei NT1-Patienten ($r = -0,28$, $p = 0,03$). *AQP4 – Aquaporin-4. N3 – Schlafstadium 3. PSG – Polysomnographie.*

In der NT1-Kohorte konnte eine negative Korrelation von AQP4 im Liquor und N3-Anteil in der Polysomnographie detektiert werden ($r = -0,28$, $p = 0,03$). Das N3-Stadium entspricht dem Tiefschlafstadium, das durch langsame Delta-Wellen im EEG (0,1-4 Hz) gekennzeichnet ist¹⁰⁸. In der Kontrollgruppe oder bei Betrachtung der Gesamtpopulation der Untersuchungen konnte keine Korrelation von AQP4 und N3-Anteil festgestellt

werden ($r=-0,08$, $p=0,37$). Für die Gesamtpopulation konnte hingegen eine schwache, negative Korrelation von Schlafeffizienz und AQP4-Konzentration beobachtet werden ($r=-0,2$, $p=0,02$).

Hinsichtlich der Korrelation mit den Basisparametern der Liquoruntersuchung bestand in der Gesamtkohorte ein schwacher positiver Zusammenhang von AQP4-Konzentration und Albuminquotient ($r=0,25$, $p=0,02$). Zwischen DQB1*06:02-positiven und -negativen Patienten bestand kein Unterschied in der AQP4-Konzentration ($p=0,6$).

4.4.4 Untersuchung des differentialdiagnostischen Potentials des AQP4-ELISAs

Um das diskriminative Potenzial des mit dem ELISA gemessenen Biomarkers AQP4 zu determinieren, wurden ROC-Analysen (*receiver operating characteristics*) durchgeführt. Mit Hilfe des Youden-Index wurde für jeden Vergleich ein hinsichtlich Spezifität und Sensitivität optimierter Grenzwert berechnet.

Eine erste Analyse untersuchte die Abgrenzbarkeit von Patienten mit der Diagnose NT1 von der schlafmedizinischen Kontrollgruppe. Dabei wurde eine AUC (*area under the curve*) von 0,66 festgestellt ($p<0,0001$, 95%-KI=0,6-0,73). Für einen Grenzwert einer AQP4-Konzentration von 3856 wurde eine Sensitivität von 66,9% bei einer Spezifität von 58,6% für die Unterscheidung von NT1-Patienten und Kontrollen erreicht.

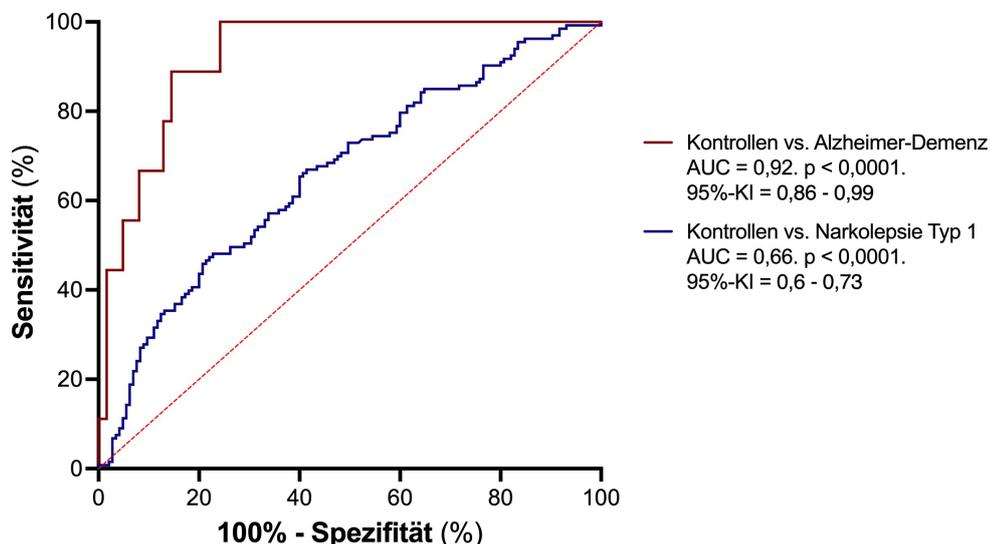


Abbildung 11 – ROC-Kurven für das diskriminative Potenzial des Aquaporin-4-ELISAs im Liquor

Dargestellt sind die ROC-Kurven und AUC mit 95%-Konfidenzintervall für Aquaporin-4 im Liquor für die Diskrimination von Alzheimer-Patienten und Kontrollen (rot) sowie Narkolepsiepatienten und Kontrollen (blau). AUC – *area under the curve*. ROC – *receiver operating characteristics*.

Weiterhin wurde eine ROC-Kurve für die Diskrimination von Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollen aufgetragen. Für die Unterscheidung dieser Gruppe zeigte sich

eine AUC von 0,92 ($p < 0,0001$, 95%-KI=0.86-0.99). Bei einem Cut-off-Wert von 5703 pg/mL wurde eine diagnostische Sensitivität von 88,9% bei einer Spezifität von 85% für die Diagnose Alzheimer-Demenz beobachtet.

4.5 Etablierung eines Aquaporin-4-SIMOA-Assays

Nach der erfolgreichen Etablierung des konventionellen ELISA-Assays an der UMH und der Anwendung an den im Voraus beschriebenen Kohorten sollte dessen Messprinzip auf die unter 3.6.5. beschriebene SIMOA-Plattform übertragen werden, um eine Senkung der unteren Quantifizierungsgrenze des Assays zu erreichen und das Messprinzip in Folge auf andere Messmatrices wie Serum übertragen zu können. Dabei wurde dieselbe Antikörperkombination wie im ELISA verwendet mit dem Unterschied, dass der Capture-Antikörper nicht auf einer Platte gebunden wird, sondern an paramagnetische Beads gekoppelt ist. Für die ersten Versuche kam hierfür ein sogenannter 2-Schritt-Assay zur Anwendung, bei dem die zu untersuchende Probe zeitgleich mit bead-gekoppelten Capture-Antikörpern sowie dem biotinylierten Detektor-Antikörper inkubiert wird. Hierfür wurde eine initiale Inkubationszeit von 37,5 min am Gerät (50 Kadenzen) gewählt. Nach einem Waschschrift erfolgte die Zugabe des SBG-Enzymkomplexes und des Enzymsubstrates RGP durch den SIMOA-Analyser.

4.5.1 Optimierung des Assay-Ablaufs: 2-Schritt-Assay und 3-Schritt-Assay

Nachdem der 2-Schritt-SIMOA-Assay mit dem analog zum ELISA-Assay verwendeten Antikörpersignal ein reproduzierbares Signal bei der Messung von Liquorproben hervorgebracht hatte, wurde das Assayformat auf einen 3-Schritt-Assay angepasst, um zu evaluieren, ob hierdurch eine Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses erreicht werden kann. Es erfolgte dabei die vergleichende Bestimmung einer für beide Formate identischen Kalibrationskurve, die für diesen Versuch einen Konzentrationsbereich von 5 – 3500 pg/mL abdeckte. Zusammenfassend konnte unter Verwendung eines 3-Schritt-Assayformates im Vergleich zum 2-Schritt-Assay ein im Mittel 1,44-fach höheres Signal-Rausch-Verhältnisses erreicht werden (Abbildung 12).

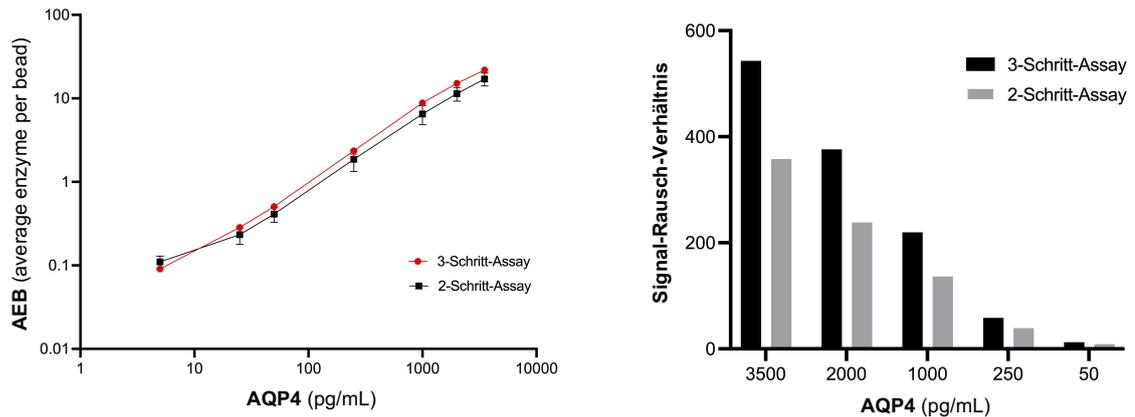


Abbildung 12 – Vergleich verschiedener Assayformate

Linkes Diagramm: Die Standardkurven für einen 3-Schritt- (rote Kurve) sowie 2-Schritt-SIMOA-Assay (schwarz) zur Aquaporin-4-Bestimmung sind vergleichend dargestellt. Die detektierten AEBs zu den Konzentrationen der Standards sind als Mittelwert mit Standardabweichung abgebildet. Rechtes Diagramm: Das Signal-Rausch-Verhältnis für verschiedene Konzentrationen an rekombinantem Aquaporin-4 kommt vergleichend für den 3-Schritt-Assay (schwarz) und den 2-Schritt-Assay zur Darstellung. *AEB – average enzyme per bead. AQP4 – Aquaporin-4.*

Nicht zuletzt resultierend aus einem verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis wurde für den 3-Schritt-Assay auch eine reduzierte untere Quantifizierungsgrenze (LLOQ) von 1,22 pg/mL (LLOQ) berechnet, welches analog zum ELISA-Assay als jene Konzentration definiert wurde, die dem AEB-Mittelwert einer Negativkontrolle in Mehrfachbestimmung addiert mit der zehnfachen Standardabweichung entspricht. Die LLOQ des 2-Schritt-Assays war mit 11,8 pg/mL fast zehnfach höher.

4.5.2 Variation der Bead-Konzentrationen und Einführung von Helper Beads

Die Anzahl der verwendeten Beads beeinflusst die Sensitivität eines SIMOA-Assays. Dabei geht eine Reduktion Antikörper-gekoppelter Beads durch eine Erhöhung des Verhältnisses von Analyten zu absoluter Bead-Anzahl mit einer Erhöhung der Sensitivität einher. Um die vom Hersteller empfohlene Bead-Konzentration von 500.000 beads/mL im Reaktionsansatz aufrechtzuerhalten, kommen sogenannte Helper Beads zum Einsatz. Diese sind ebenfalls paramagnetisch wirksam, weisen jedoch durch die fehlende Kopplung an den entsprechenden Capture-Antikörper keine spezifische Bindungsstelle für den jeweiligen Analyt auf. Verschiedene Anteile von AQP4-Antikörper-gekoppelten Beads und Helper Beads wurden im Rahmen dieser Arbeit evaluiert (Abbildung 13).

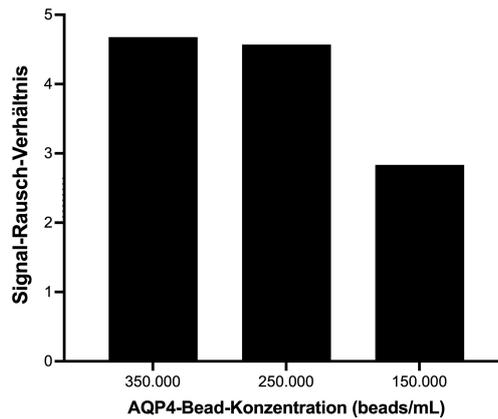


Abbildung 13 – Signal-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise ratio) verschiedener AQP-4-Bead-Konzentrationen

Dargestellt ist das Signal-Rausch-Verhältnis für vergleichende Messungen bei unterschiedlichen Anteilen an AQP4-Beads im Reaktionsansatz. Die Differenz zur vom Hersteller empfohlenen Gesamt-Bead-Konzentration von 500.000/μL im Reaktionsansatz wurde durch die Verwendung von Helper Beads ausgeglichen. *AQP 4 - Aquaporin-4*.

Dabei konnte für eine Anzahl von je 250.000 beads/mL funktionellen und Helper-Beads die beste Assay-Performance erreicht werden. Für geringere Anteile an AQP-4-Beads war ein reduziertes Signal-Rausch-Verhältnis ersichtlich. Eine Steigerung der Sensitivität konnte allein durch Verwendung von Helper Beads nicht erreicht werden, jedoch konnte dadurch die für die Messungen im Rahmen dieser Forschungsarbeit erforderliche Menge beadgekoppelter Aquaporin-4-Capture-Antikörper reduziert werden.

4.5.3 Vergleich unterschiedlicher Verdünnungsmedien

Sowohl die Kalibratoren des SIMOA-Assays als auch die aufgetragenen Proben werden in einem Puffer verdünnt. Die Eigenschaften der verwendeten Puffer können die Assay-Performance beeinflussen. Vergleichend erfolgte daher die Bestimmung der Standards der Kalibrationskurve, welche in PBST oder Sample Diluent der Firma Quanterix verdünnt worden waren. Dabei war eine günstige Beeinflussung des maximalen Fluoreszenzsignals durch Verwendung von PBST als Diluent des Assays ersichtlich (Abbildung 14).

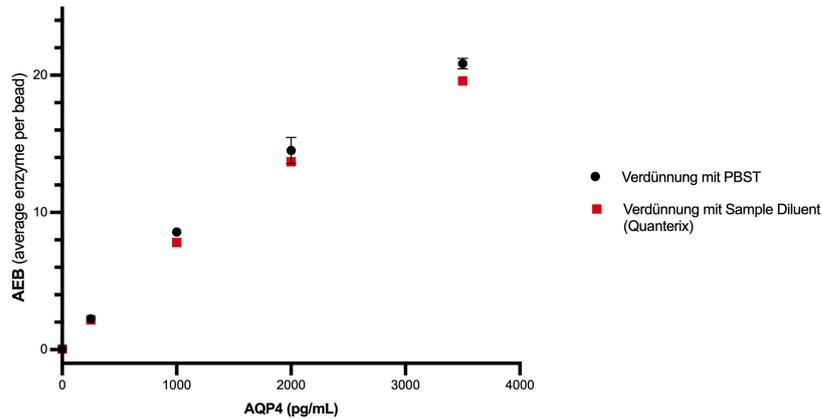


Abbildung 14 – Einfluss des Verdünnungsmediums auf die Signalintensität

Bei gleichen AEB-Werten für die Negativkontrolle (AEB = 0,04) wurden bei der Verwendung von PBST als Diluent höhere Signalintensitäten bei der Bestimmung von Aquaporin-4 beobachtet. *AEB – average number of enzyme labels per bead. PBST – phosphate buffered saline mit 0,05% Tween.*

4.5.4 Anpassung der Inkubationszeiten sowie der Probenvolumina des Assays

Anders als bei klassischen ELISAs benötigen SIMOA-Assays häufig geringere Inkubationszeiten, um das Detektionslimit zu überschreiten, jedoch beeinflusst die Wahl der Inkubationszeit im ersten Schritt eines SIMOA-Assays die Performanz der Messung. Daher wurden Negativkontrollen sowie Proben mit Konzentrationen an rekombinantem AQP4 von 250 pg/mL und 1000 pg/mL bei unterschiedlichen Inkubationszeiten gemessen. Dabei zeigte sich für beide gewählte Konzentrationen des rekombinanten Proteins eine Steigerung der AEB bei längerer Inkubationszeit. Trotz ansteigendem Hintergrundsignal war das Signal-Rausch-Verhältnis unter den untersuchten Konstellationen für eine Inkubationszeit von 75 min am günstigsten.

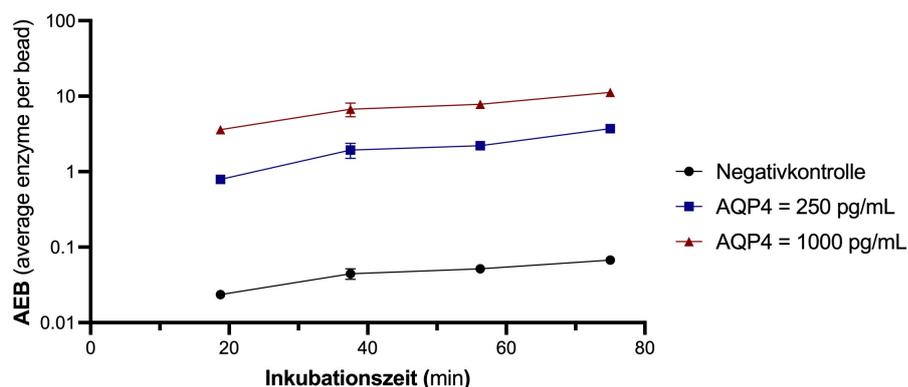


Abbildung 15 – Optimierung der Inkubationszeit des SIMOA-Assays

Die Abbildung zeigt die detektierte AEB bei unterschiedlichen Konzentrationen des rekombinanten Proteins und des Blanks unter Variation der Inkubationszeit. Rote Dreiecke entsprechen der detektierten AEB für Proben einer AQP4-Konzentration von 1000 pg/mL, blaue Quadrate der AEB bei einer Konzentration von 250 pg/mL. *AEB – average number of enzyme labels per bead. AQP4- Aquaporin-4.*

Auch von einer Anpassung des Probenvolumens kann die Assay-Performance profitieren. Bei vergleichender Bestimmung von AQP4 in einem Probenvolumen von 55µL, 65µL, 75µL, 100µL, 150µL oder 172µL wurde das höchste Signal-Rausch-Verhältnis bei Einsatz von 172µL Liquor und 150µL Serum erreicht (s. Anhang, Abb. 31).

4.6 Validierung des etablierten Aquaporin-4-SIMOA-Assays

Nach der Etablierung des Assays erfolgte die Validierung des 3-Schritt-SIMOA-Assay unter optimierten Assaybedingungen.

4.6.1 Bestimmung der Präzision des SIMOA-Assays

Analog zum ELISA-Assay basieren präzise Messungen der zu analysierenden Proben mit der SIMOA-Methode auf einer verlässlichen Kalibrationskurve des Assays. Diese wird unter Anwendung einer Vier-Parameter logistischen Regression ($1/y$) aus den detektierten AEB-Werten von Standards einer definierten Konzentration an rekombinanten Aquaporin-4 erstellt. Für den in dieser Arbeit untersuchten SIMOA-Assay deckte die Standardkurve final einen Konzentrationsbereich von 1 pg/mL bis 2000 pg/mL ab. Dabei war für die an die Standardkurve angepassten Konzentrationen eine Wiederfindungsrate von 88,5% bis 109,7% festzustellen. Der Determinationskoeffizient der Regression (r^2) betrug 0,992. Unter optimierten Assaybedingungen konnte für den 3-Schritt-Assay bei einer Inkubationszeit von 75 min ein LLOQ von 0,81 pg/mL determiniert werden.

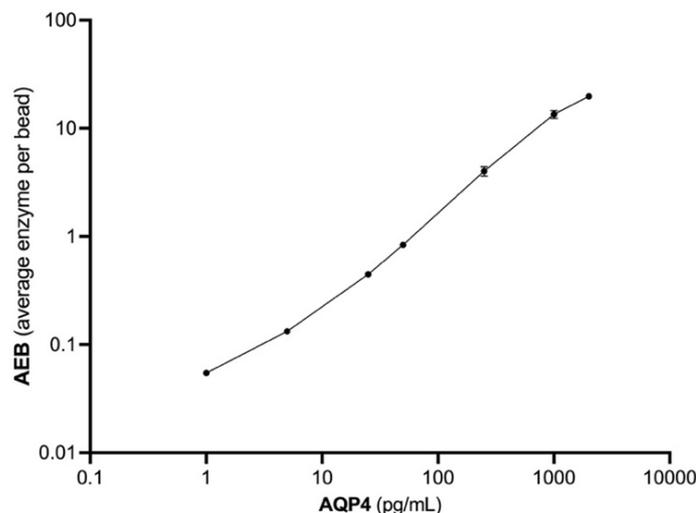


Abbildung 16 – Typische Kalibrationskurve für den Aquaporin-4-SIMOA-Assay

Die Kalibrationskurve wurde durch Mehrfachbestimmung der AEB einer seriellen Verdünnungsreihe rekombinanten Aquaporin-4-Proteins erstellt. Für jeden Punkt der Standardreihe im Bereich 1 – 2000 pg/mL sind Mittelwert und Standardabweichung in einem doppelt-logarithmischen Diagramm dargestellt. *AEB* – average number of enzyme labels per bead. *AQP4* – Aquaporin-4.

Für die Intra-Assay-Präzision wurde ein mittlerer Variationskoeffizient von 8,05% (6,7 – 10,3%) festgestellt. Zwischen unterschiedlichen Assay-Durchführungen (Inter-Assay-Präzision) wurden Abweichungen von im Mittel 8,13 % (5,07 – 11,1%) beobachtet.

4.6.2 Evaluation der Wiederfindungsrate des Aquaporin-4-SIMOA-Assays

Zur Beurteilung eines Matrixeffektes wurde die Wiederfindungsrate bestimmt in mit 500 pg/mL bzw 1000pg/mL rekombinatem AQP4 gespiketen Liquorproben. Abzüglich der liquoreigenen Konzentration konnte bei einer 1:2-Verdünnung des Liquors für eine Konzentration von 1000 pg/mL eine Wiederfindungsrate von 100,5% in Bezug auf eine gleiche Konzentration rekombinanten Proteins in PBST festgestellt werden. Für die mit 500 pg/mL versetzten Proben war eine reduzierte Wiederfindungsrate von 47% festzustellen. Durch Dilution der Licores konnte bei einer 1:8-Verdünnung eine Wiederfindungsrate von 97% - 104% erreicht werden. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden auch Serumproben hinsichtlich der Wiederfindungsrate untersucht. Hier konnte bei Zugabe von rekombinatem Protein einer Konzentration von 1000 pg/mL erst ab einer 1:128- fachen Verdünnung des Serums in PBST eine Wiederfindungsrate von 83% erreicht werden, welche innerhalb der gängigen Akzeptanzkriterien für die Wiederfindungsrate in Immunoassays liegt⁹⁸.

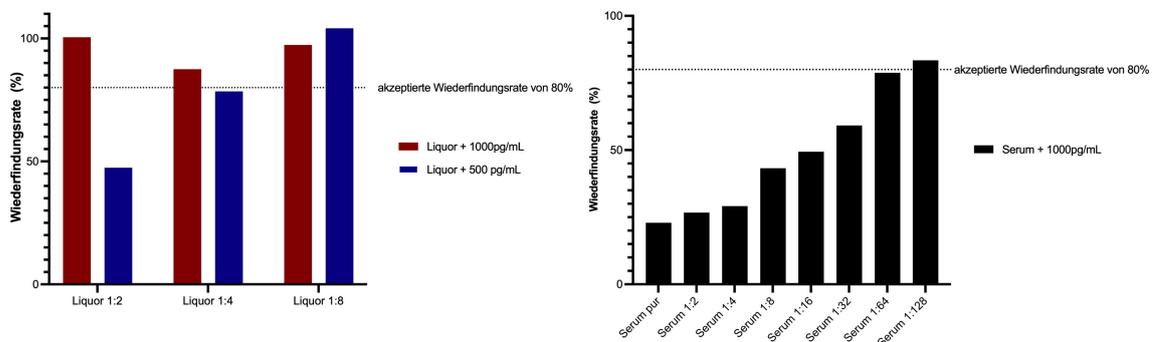


Abbildung 17 – Überprüfung der Assay-Wiederfindungsrate in Liquor- und Serumproben

Seriell verdünnte Liquorproben wurden mit zwei Konzentrationen rekombinanten Aquaporin-4-Proteins versetzt. Zu einer seriellen Serum-Verdünnungsreihe wurden 1000 pg/mL rekombinantes Aquaporin-4 hinzugefügt. Erst bei einer Serumverdünnung von 1:128 konnte eine Wiederfindungsrate innerhalb der Akzeptanzkriterien⁹⁸ beobachtet werden.

4.6.3 Assay-Parallelismus

Eine serielle Verdünnungsreihe von Liquorproben wurde zur Bestimmung des Assayparallelismus erstellt und bei Inkubationszeiten von 37,5 min und 75 min untersucht. Für die Messungen mit kürzerer Inkubationszeit war eine kontinuierliche Abnahme der kalkulierten Konzentration adjustiert nach Verdünnung in Bezug auf die

Referenzprobe festzustellen (Abbildung 18). Bei einer gewählten Inkubationszeit von 75 min verblieben die ermittelten AQP4-Konzentrationen aus bis zu 1:4-verdünnten Liquorproben innerhalb des in der Literatur beschriebenen Akzeptanzbereichs von 75% – 125%¹⁰⁹ in Bezug auf die unverdünnte Referenzprobe. Bei einer 1:6-Verdünnung betrug die rückgerechnete Konzentration 75,3% im Vergleich zur Referenzprobe. Eine weitere Verdünnung führte zu weit außerhalb der Akzeptanzkriterien berechneten Werten von 44% und 27% im Verhältnis zur unverdünnten Probe.

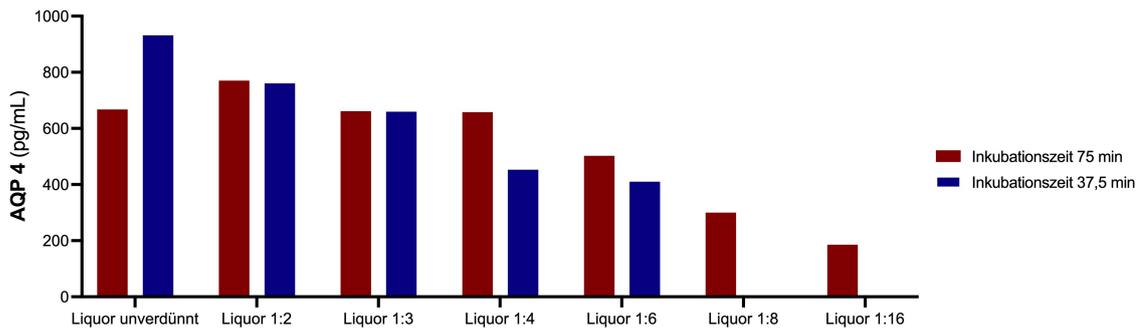


Abbildung 18 – Untersuchung des Assay-Parallelismus im Liquor

AQP-4-Konzentration wurden in Liquorproben einer seriellen Verdünnungsreihe mit PBST detektiert. Nur bei einer längeren Inkubationszeit von 75 min, dargestellt in roten Balken, lagen die rückgerechneten Konzentrationen in Bezug auf die unverdünnte Referenzprobe bis zu einer Verdünnung von 1:6 im Akzeptanzbereich von 75% - 125%. *AQP4 - Aquaporin-4*

Auch Serumproben sollten in gleicher Weise auf Parallelismus untersucht werden. Aufgrund der geringen detektierten Konzentration in Nativseren, welche sich nahe des LLOQ und unterhalb des niedrigsten Standards der Kalibrationskurve befand, konnte nur eine Verdünnung der Proben bis 1:4 evaluiert werden. Hierbei lagen die rückgerechneten Konzentrationen in einem Bereich von 98% - 111% verglichen mit dem unverdünnten Serum, was einem Variationskoeffizienten von 7,1% entspricht.

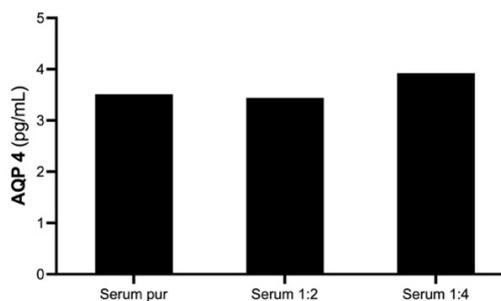


Abbildung 19 – Untersuchung des Assay-Parallelismus im Serum

Seriell mit PBST verdünnte Serumproben wurden auf ihre Aquaporin-4-Konzentration untersucht. Bis zu einer untersuchbaren Verdünnung von 1:4 entsprachen die rückgerechneten Konzentrationen 98-111% der Referenzkonzentration eines unverdünnten Serums.

4.6.4 Einfluss verschiedener Methoden der Probenvorbereitung auf die Aquaporin-4-Bestimmung

Wie unter 3.6.5.8 beschrieben wurden Liquor- und Serumproben verschiedenen Arten der thermisch- und chemisch-denaturierenden Probenvorbereitung unterzogen, um zu untersuchen, ob sich hierdurch eine Steigerung der Signalintensität erreichen lässt. Zudem sollte durch die Inkubation der Proben mit 2M NaCl-Lösung untersucht werden, ob die Beeinflussung ionischer Wechselwirkungen die Konzentrationsbestimmung beeinflussen kann. Die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen sollten insbesondere die AQP4-Bestimmung im Serum durch den etablierten Assay verbessern, welche in nativen Proben nur inkonsistent gelang, da die detektierten AEB-Werte unterhalb der LLOQ, teilweise unterhalb des AEB-Wertes der Negativkontrolle lagen.

Im Vergleich zu einer nativen Liquorprobe in 1:2 Verdünnung mit PBST zeigte sich, dass eine Vorbehandlung der Proben mit RIPA-Puffer die gemessene AEB der Proben erhöhen kann. Dabei ergaben sich leichte Vorteile für eine Inkubation der Probe für 1 h im Vergleich zur 10-minütigen Inkubation. Ferner zeigten das Versetzen der Probe mit 1% BSA und 0,5% Tween sowie eine Inkubation der Probe bei 90°C für 10 min einen AEB-erhöhenden Effekt. Die alternativen Denaturierungsverfahren zeigten hingegen verglichen mit der Referenz-Liquorprobe ein unverändertes oder erniedrigtes Fluoreszenz-Signal.

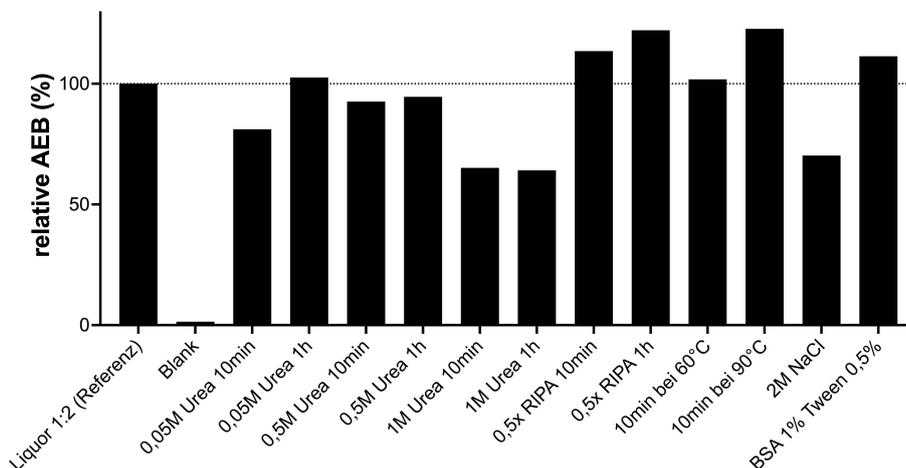


Abbildung 20 – Einfluss verschiedener Arten der Probenvorbereitung auf die Messung der Aquaporin-4-Konzentration im Liquor

Dargestellt sind die prozentualen AEB-Werte im Vergleich zu einer nativen Referenz-Liquorprobe in 1:2-Verdünnung. Durch die Inkubation mit RIPA-Puffer, 1% BSA und 0,5% Tween sowie die thermische Aufbereitung bei 90°C für 10 min konnten erhöhte AEB-Werte erreicht werden. AEB – average number of enzyme labels per bead. Blank – Negativkontrolle. RIPA – Radioimmunopräzipitationsassay-Puffer. BSA – bovines Serumalbumin.

Für die anschließend erfolgte Untersuchung der Serumproben, welche diesen unterschiedlichen Präparationsmethoden unterzogen worden waren, zeigten sich positive Einflüsse im Sinne einer Erhöhung der AEB lediglich für die mit RIPA-Puffer inkubierten Proben unabhängig von der gewählten Inkubationsdauer. Andere Verfahren zeigten keine oder adverse Effekte auf die Intensität des Fluoreszenzsignals.

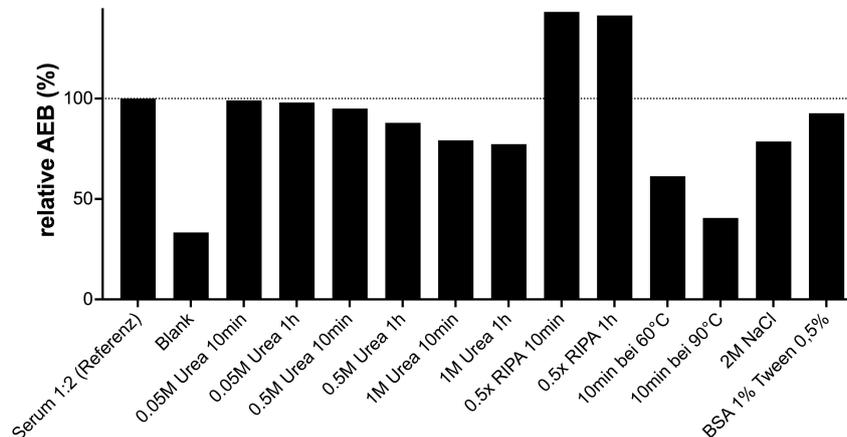


Abbildung 21 – Einfluss verschiedener Arten der Probenvorbereitung auf die Bestimmung der Aquaporin-4-Konzentration im Serum

Dargestellt sind die relativen AEB-Werte in Bezug auf ein Referenzserum ohne Probenvorbehandlung in 1:2-Verdünnung. Durch die Inkubation mit RIPA-Puffer für 10 min oder 1 h konnten erhöhte AEB-Werte generiert werden. *AEB – average number of enzyme labels per bead. Blank – Negativkontrolle. RIPA – Radioimmunoprecipitationsassay-Puffer. BSA – bovines Serumalbumin.*

Insbesondere für die Messung der Serum-Konzentration von AQP4 waren die evaluierten Aufbereitungsmethoden nicht ausreichend, um in allen untersuchten Seren eine für die Konzentrationsbestimmung ausreichendes Fluoreszenzsignal zu generieren. Unter dem Verdacht, dass höher abundante Proteine, wie beispielsweise Albumin, die Detektion von AQP4 im Serum stören könnten, wurden Serum- und Liquorproben durch 50-kDa-Amiconfilter zentrifugiert.

Für die Bestimmung der Serumproben entsprachen alle gemessenen AEBs Konzentrationen unterhalb der unteren Quantifikationsgrenze des Assays, sodass die Aussagekraft dieser Ergebnisse eingeschränkt ist. Für native Liquorproben war hingegen durch die erwähnte Präparation der Proben im Zentrifugalfilter eine deutliche Reduktion des Fluoreszenzsignals bei Bestimmung des Filtrats ersichtlich, welches in der Messung der nicht filtrierte Probe einer Konzentration von 667 pg/mL entsprach und damit im Messbereich des Assays lag (Abbildung 22).

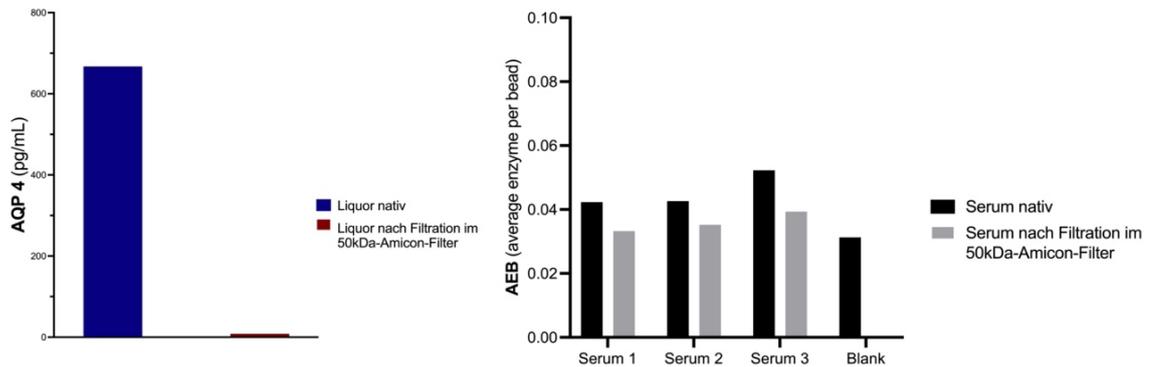


Abbildung 22 – Vorbehandlung von Liquor- und Serumproben durch Filtration im 50kDa-Amicon-Filter

Linkes Diagramm: Effekt der Filtration einer nativen Liquorprobe auf die Detektion der Aquaporin-4-Konzentration. Im Vergleich zur nativen Probe (blau) einer AQP4-Konzentration von 667 pg/mL wird im Filtrat (rot) nur eine rückgerechnete Konzentration von 8,24 pg/mL erreicht. Rechtes Diagramm: Die dargestellten detektierten AEBs für native Serumproben (schwarz) und Seren nach Filtration (grau) entsprechen Konzentrationen unterhalb des LLOQ und sind daher nicht sicher verwertbar. AQP4 – Aquaporin-4. AEB – average enzyme per bead. Blank – Negativkontrolle. LLOQ – untere Quantifikationsgrenze.

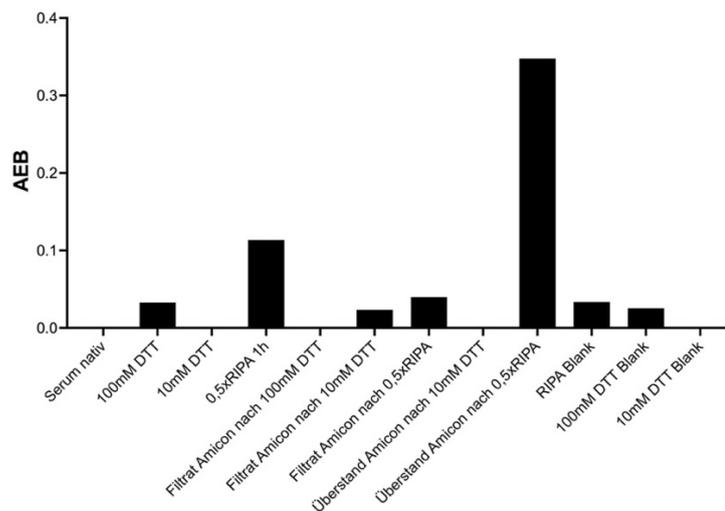


Abbildung 23 – Effekt der Aufbereitung von Seren durch RIPA-Puffer, DTT und Filtration im Amicon-Filter auf das Fluoreszenzsignal des SIMOA-Assays

Zur Darstellung kommen die nach verschiedenen Methoden der Probenaufbereitung generierten AEB-Signale desselben Serums. Bereits am nicht filtrierten Serum nach einstündiger Inkubation mit RIPA-Puffer, jedoch insbesondere im Überstand dieses mit RIPA inkubierten Serums nach Filtration im 50kDa-Amicon-Filter sind deutlich erhöhte AEBs detekierbar. Diese Erhöhung der Signalintensität geht deutlich über die AEB des RIPA-Blanks hinaus. AEB – average number of enzyme labels per bead. Blank – Negativkontrolle. DTT – Dithiothreitol. RIPA – Radioimmunopräzipitationsassay-Puffer.

Auch mit RIPA-Puffer oder DTT-vorbehandelte Serumproben wurden durch Amicon-Filter zentrifugiert und im resultierenden Filtrat eine AQP4-Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Zusätzlich erfolgte in diesem Zusammenhang auch eine Aquaporin-4-Bestimmung im Überstand des Filters. Wie auch in den vorherigen Untersuchungen zur

Wirkung denaturierender Agenzien auf die Fluoreszenzstärke war nach Probenaufbereitung mit 0,5-fachem RIPA-Puffer bereits an den nicht filtrierten Proben eine Steigerung der AEB im Vergleich zur nativen Serumprobe zu beobachten, die über das leicht erhöhte Hintergrundsignal des RIPA-Blanks hinausging. Viel deutlicher konnte eine Steigerung des AEB-Signals im Überstand nach Filtration im Amicon-Zentrifugalfilter erreicht werden (Abbildung 23). Eine Behandlung der Proben mit 10mM oder 100 mM DTT-Lösung bewirkte keine Steigerung des Fluoreszenzsignals.

4.6.5 Anwendung des SIMOA-Assays an der Pilotkohorte zur Detektion der Aquaporin-4-Konzentration im Liquor

Mit dem entwickelten SIMOA-Assay konnten für Liquoruntersuchungen in den Validierungsmessungen stets erfolgreiche Konzentrationsbestimmungen für AQP4 erfolgen, sodass er an Proben der bereits für den ELISA verwendeten Kohorten der NT1-Patienten und schlafmedizinischer Kontrollen angewendet werden konnte. Da in dieser Forschungsarbeit in Serumproben nur inkonstant ein AEB-Signal detektierbar war und dieses meist unterhalb oder nahe der LLOQ lag, konnte eine korrespondierende Bestimmung von AQP4 im Serum nicht erfolgen.

Es wurden Liquorproben von 36 Patienten mit NT1 und 35 Kontrollen untersucht. Die AQP4-Liquorkonzentration von NT1-Patienten war mit im Mittel $657,5 \pm 276,8$ pg/mL niedriger als die der Kontrollgruppe, welche $875,6 \pm 513,8$ pg/mL betrug ($p=0,035$).

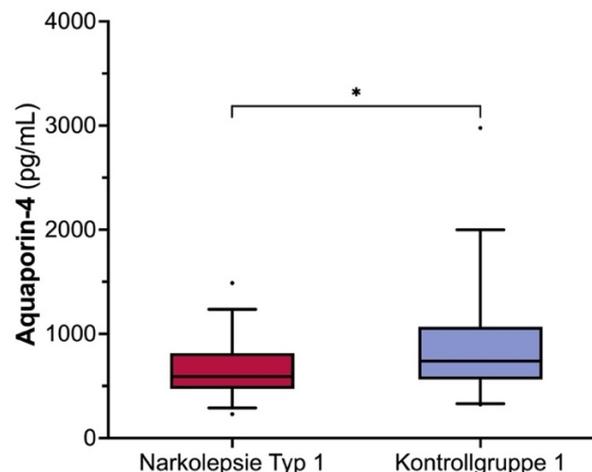


Abbildung 24 – Im SIMOA-Assay determinierte Aquaporin-4-Konzentration im Liquor von NT1-Patienten und Kontrollen

Dargestellt sind Box-Whiskers-Plot, die jeweils die 5., 25., 75. und 95. Perzentile und den Median der AQP4-Konzentration in den Kohorten angeben. Einzelwerte repräsentieren außerhalb dieser Grenzen liegende Werte. AQP4 – Aquaporin-4. SIMOA – single molecule array.

4.6.6 Vergleich der Aquaporin-4-Konzentrationsbestimmung im SIMOA- und ELISA-Assay

Die Spearman-Korrelationsanalyse, in der korrespondierend mit dem SIMOA-Assay und ELISA determinierte AQP4-Konzentrationen in Liquorproben verglichen wurden, offenbarte eine sehr hohe positive Korrelation zwischen den durch die beiden Messmethoden detektierten Analysewerten ($r=0,94$; 95%-KI=0,9-0,96; $p<0,0001$).

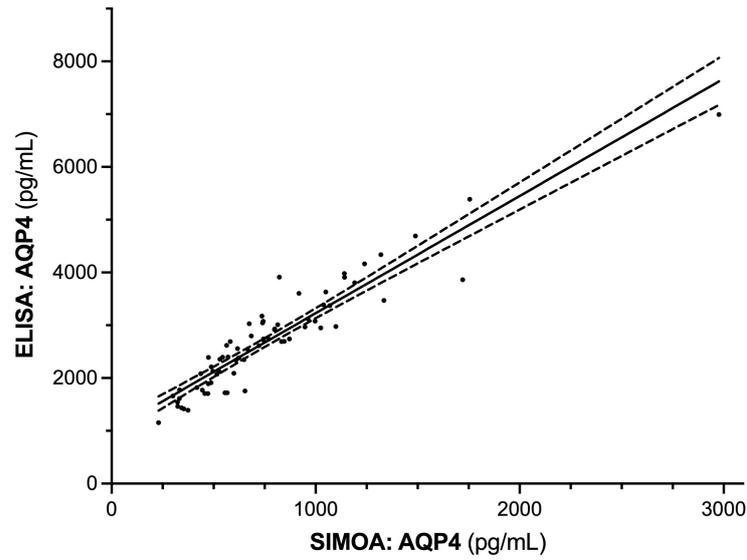


Abbildung 25 – Korrelation zwischen der AQP4-Konzentration nach Bestimmung mit der ELISA- und SIMOA-Methode

Dargestellt sind die Werte von korrespondierend in beiden Assayvarianten gemessenen Liquorproben unterschiedlicher Aquaporin-4-Konzentrationen. In der Spearman-Korrelationsanalyse zeigt sich eine sehr hohe positive Korrelation der Werte zueinander. ($r=0,94$, $p<0,0001$). AQP4 – Aquaporin-4.

Die absoluten Analysewerte zeigten jedoch zwischen den Verfahren deutliche Unterschiede, sodass eine lineare Passing-Bablok-Regression zur Ermittlung eines Umrechnungsfaktors durchgeführt wurde. Im Folgenden werden Formeln aufgeführt, welche die Umrechnung zwischen den durch beide Verfahren detektierten Konzentrationen erlauben.

$$Konzentration_{ELISA} \left(\frac{pg}{mL} \right) = 2,222 \times Konzentration_{SIMOA} \left(\frac{pg}{mL} \right) + 1006$$

$$Konzentration_{SIMOA} \left(\frac{pg}{mL} \right) = 0,396 \times Konzentration_{ELISA} \left(\frac{pg}{mL} \right) - 306,1$$

4.7 Untersuchung der Liquor-GFAP-Konzentration bei NT1-Patienten

Als weiterer, bereits etablierter astrozytärer Marker wurde im Rahmen der Experimente dieser Promotionsarbeit die GFAP-Liquor-Konzentration von Patienten mit Narkolepsie Typ 1 sowie Kontrollen ohne pathologische Erniedrigung des Hypocretin-1-Spiegels im

Liquor untersucht. Dafür fand ein kommerziell verfügbarer ELISA der Firma BioVendor Anwendung.

Insgesamt wurden Liquorproben von 107 Patienten mit NT1 sowie 114 alters- und geschlechtsadaptierter Kontrollen aus den neurologischen und schlafmedizinischen Kliniken Schwalmstadt-Treysa, Leer, Westerstede und Bremen-Ost untersucht. Diese Proben waren im Vorfeld einmalig für die Bestimmung der Aquaporin-4-Konzentration im ELISA verwendet und zwischen den Proben bei -80°C gelagert worden. Zusammenfassend konnte zwischen den beiden Kohorten kein Unterschied in der GFAP-Konzentration im Liquor ermittelt werden bei einer Konzentration von $0,63\text{ ng/mL}$ für die NT1-Kohorte und $0,69\text{ ng/mL}$ für die Kontrollen ($p=0,11$).

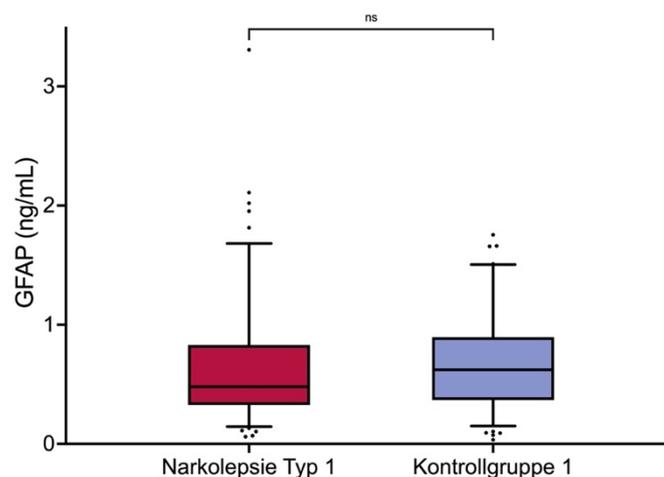


Abbildung 26 – GFAP-Liquorkonzentration der diagnostischen Kohorten

Die Ergebnisse sind als Box-Plots abgebildet. Dargestellt werden jeweils der Median und die 25. und 75. Perzentile der GFAP-Konzentration der Gruppen. Whiskers entsprechen der 5. und 95. Perzentile. Außerhalb der 5. bis 95. Perzentile liegende Werte sind als einzelne Punkte aufgeführt. Zwischen den beiden untersuchten Gruppen fand sich kein Unterschied in der GFAP-Konzentration ($p = 0,11$). *GFAP – glial fibrillary acidic protein.*

Unter Betrachtung aller Proben in Zusammenschau mit den zur Verfügung stehenden klinischen Daten konnte eine schwache, positive Korrelation von GFAP-Konzentration im Liquor und Patientenalter bei Entnahme des lumbalen Liquors festgestellt werden ($r=0,24$, $p=0,0003$). Auch bei isolierter Betrachtung der Kontrollkohorte korrelierten GFAP-Konzentration und Patientenalter ($r=0,25$, $p=0,008$). Für die NT1-Kohorte bestand keine Korrelation (Spearman $r=0,19$, $p=0,054$).

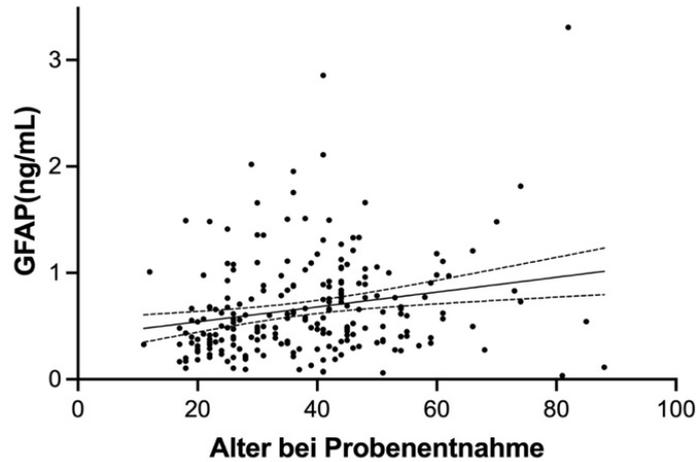


Abbildung 27 – Korrelation von GFAP-Konzentration und Patientenalter bei Probenentnahme

Dargestellt sind die Werte von insgesamt 221 Proben, bei denen GFAP im Liquor bestimmt wurde. Mit zunehmendem Patientenalter bei Probenentnahme zeigen sich steigende GFAP-Konzentrationen (Spearman $r = 0,24$, $p = 0,0003$). *GFAP – glial fibrillary acidic protein.*

Eine positive Korrelation von GFAP-Konzentration im Liquor und Body Mass Index (BMI) war in allen Kohorten festzustellen. Der stärkste Zusammenhang ließ sich in der Kontrollgruppe feststellen ($r=0,31$, $p=0,008$).

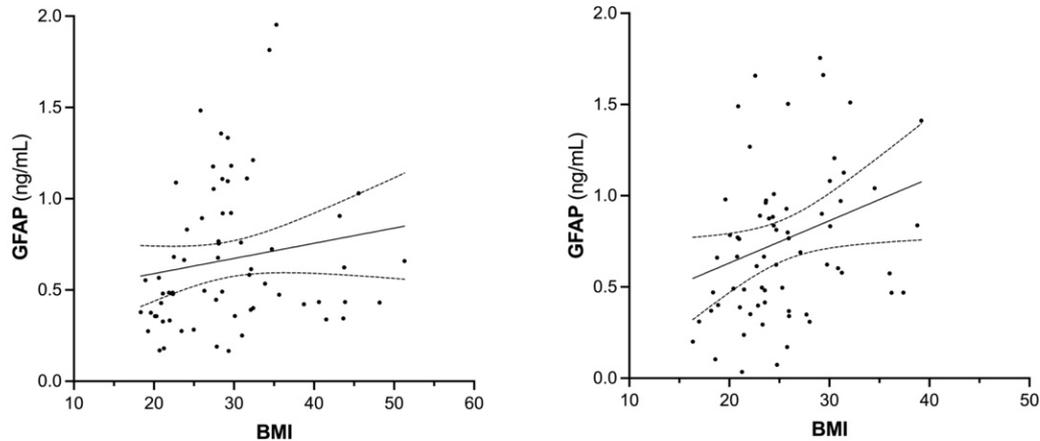


Abbildung 28 – Zusammenhang von GFAP-Konzentration im Liquor und BMI in NT1-Patienten und Kontrollen.

Dargestellt ist jeweils die Korrelation von GFAP im Liquor und BMI, links für NT1-Patienten ($r=0,26$, $p=0,03$), rechts für die Kontrollkohorte ($r=0,31$, $p=0,008$). *BMI – Body-Mass-Index. GFAP – glial fibrillary acidic protein.*

Eine weitere Spearman-Analyse konnte in dieser Arbeit für die Gesamtkohorte keine Korrelation von gemessener AQP4-Konzentration und GFAP-Konzentration im Liquor ($r=0,018$, $p=0,8$) nachweisen. Gleiches gilt für die isolierte Untersuchung der NT1- oder Kontrollgruppe auf eine Korrelation zwischen AQP4- und GFAP-Konzentration.

4.7.1 Präanalytische Einflussfaktoren auf die Probenstabilität bei der GFAP-Messung

Um für den in dieser Arbeit eingesetzten kommerziellen ELISA der Firma BioVendor präanalytische Einflussfaktoren auf die Probenstabilität einschätzen zu können und damit eine bessere Beurteilbarkeit der Ergebnisse in den untersuchten Kohorten zu ermöglichen, wurden Liquorproben aliquotiert und entweder wiederholten Einfrier-Auftau-Zyklen unterzogen oder über eine definierte Dauer bei Raumtemperatur gelagert (siehe Abschnitt 3.6.4).

Für Liquorproben, die einer wiederholten Einfrier-Auftau-Serie ausgesetzt waren, war eine kontinuierliche Abnahme der relativen GFAP-Konzentration in Bezug auf die Konzentration in der Referenzprobe, die einmalig aufgetaut wurde, festzustellen. Nach zweifachem Einfrieren und Auftauen, wie für die Messung der NT1-Proben und Kontrollliquores zutreffend, konnte eine Abnahme der relativen GFAP-Konzentration auf $90 \pm 7\%$ detektiert werden. Nach 6 Einfrier-Auftau-Vorgängen betrug die Konzentration noch $58 \pm 11\%$ des Ausgangswertes.

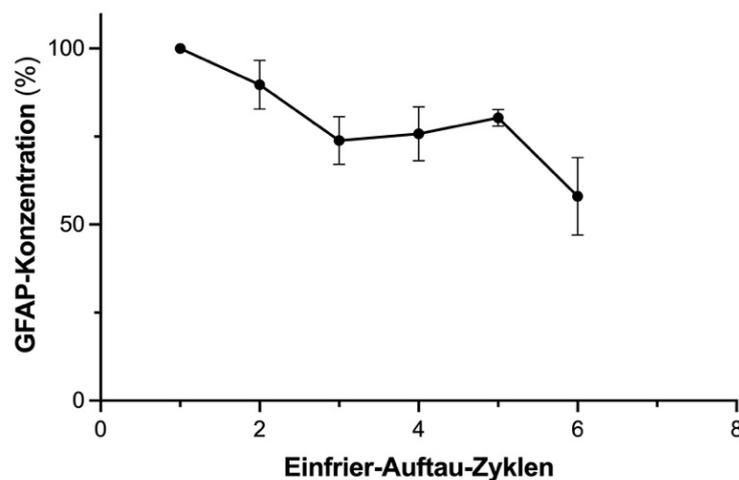


Abbildung 29 – Einfluss wiederholter Einfrier-Auftau-Zyklen auf die GFAP-Konzentration im Liquor

Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung der prozentualen GFAP-Konzentrationen für Liquorproben, die 1-6 Einfrier-Auftau-Zyklen ausgesetzt waren, in Bezug auf ihre jeweilige Referenzprobe nach einmaligem Auftauen. Nach 2 Einfrier-Auftau-Zyklen beträgt die GFAP-Konzentration $90 \pm 7\%$ der Referenzkonzentration, nach 6 Zyklen wird eine relative GFAP-Konzentration von $58 \pm 11\%$ erreicht. *GFAP – glial fibrillary acidic protein.*

Eine Lagerung der Proben bei Raumtemperatur für bis zu 7 Tage zeigte hingegen keinen wesentlichen Einfluss auf die GFAP-Konzentration. Für die Liquorprobe, welche für 7 Tage bei Raumluft gelagert worden war, konnte eine relative GFAP-Konzentration von 123% in Bezug auf die Referenzprobe ohne Lagerung bei Raumtemperatur detektiert

werden. Für die übrigen untersuchten Proben wurden relative GFAP-Konzentration von 97 – 126% gemessen. Die Schwankung der GFAP-Konzentration dieser Proben (CV = 10,7%) liegt im Bereich der Intra-Assay-Variabilität eines Versuchsdurchlaufs, welche anhand der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Qualitätskontrollen ermittelt wurde.

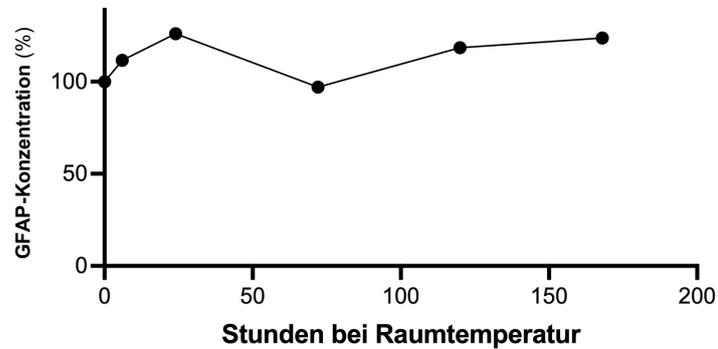


Abbildung 30 – Liquor-GFAP-Konzentration nach unterschiedlich langer Probenlagerung bei Raumtemperatur

Als GFAP-Konzentration ist die prozentuale Konzentration in Bezug auf die Referenzprobe ohne Lagerung bei Raumtemperatur angegeben. *GFAP – glial fibrillary acidic protein.*

5. Diskussion

Der autoimmune Charakter der Entstehung der NT1 ist durch verschiedene neuropathologische und epidemiologische Hinweise mittlerweile weitestgehend akzeptiert^{21,22,28}, jedoch ist das Verständnis über genaue pathophysiologische Mechanismen aktuell begrenzt. Zudem fehlen vielen Studien klinisch gut charakterisierte Patientenkohorten. Diese Arbeit konnte durch retrospektive Datenerhebung an einer großen Kohorte von NT1-Patienten aussagekräftige klinische Daten zu diesem seltenen Patientenkollektiv sammeln, die nicht nur für diese Arbeit, sondern auch für zukünftige Forschungsprojekte Verwendung finden können.

Die Etablierung eines sensitiven ELISAs für die Bestimmung von AQP4 ermöglichte an dieser Kohorte die erstmalige Untersuchung der Hypothese einer Veränderung der glymphatischen Clearance anhand eines Biomarkers des Liquors bei Patienten mit Schlafstörungen. Die beobachtete Erniedrigung der AQP4-Konzentration bei NT1-Patienten im Vergleich zu Kontrollen und als Krankheitskontrollen betrachtete Alzheimer-Patienten spricht zwar gegen die Hypothese einer reduzierten glymphatischen Clearance bei NT1-Patienten, jedoch für eine Beteiligung von AQP4-Kanälen in der Pathophysiologie der Erkrankung. Ferner konnten durch die durchgeführten Messungen anhand einer Kohorte von Alzheimer-Patienten die Ergebnisse anderer Forschungsarbeiten bestätigt werden, die passend zu einer glymphatischen Dysfunktion sind, welche die Akkumulation von Amyloidpeptiden fördert^{89,91}.

Das erfolgreiche Messprinzip des ELISAs konnte im Folgenden auch auf die SIMOA-Plattform übertragen werden. Im Rahmen der Validierung des neuen SIMOA-Assays konnte eine gute Präzision mit einer durch den Plattformwechsel gelungenen 100-fachen Senkung der unteren Quantifizierungsgrenze im Vergleich zum ELISA gezeigt werden. Eine erneute Messung von Liquorproben aus der Kohorte der NT1-Patienten und Kontrollen konnte einerseits eine hohe Korrelation von ELISA- und SIMOA-Assay nachweisen und zum anderen die Ergebnisse erniedrigter AQP4-Liquorkonzentrationen bei NT1-Patienten bestätigen.

Die GFAP-Konzentrationen im Liquor unterschieden sich hingegen zwischen NT1-Patienten und Kontrollen nicht, im Gegensatz zu den Ergebnissen einer vorherigen Studie⁹².

Eine Diskussion der individuellen Ergebnisse schließt sich in den folgenden Abschnitten an.

5.1 Klinische Charakterisierung der Patienten mit Narkolepsie Typ 1

Die Evaluation der klinischen Daten der NT1-Patienten dieser Studie bestätigen eine hohe Prävalenz von Tagesmüdigkeit, sowohl anamnestisch als auch in der Auswertung der Epworth-Schläfrigkeitsskala, und Kataplexie als Kardinalsymptome der NT1²⁹. Kataplexien traten bei NT1-Patienten wesentlich häufiger auf als bei Kontrollen. Dieser Befund stützt die Stellung der Kataplexie als definierendes Diagnosekriterium in der ICSD-3, das im Beisein eines pathologischen MSLT-Befundes die Hypocretin-1-Bestimmung ersetzen kann⁵. Die erhobenen MSLT-Befunde vieler Patienten dieser Studienkohorte zeigen weiterhin, dass eine verkürzte Einschlaf latenz charakteristisch ist für NT1-Patienten.

Als eine von wenigen Studien⁵⁰ beschäftigte sich diese Arbeit auch mit einer polysomnographischen Charakterisierung des Schlafprofils von NT1-Patienten. Dabei war eine deutliche Verkürzung der REM-Latenz im Vergleich zu den Kontrollen ersichtlich. Ferner passt die in dieser Arbeit nachgewiesene Erhöhung des N1-Anteils, also früher Schlafstadien in der PSG, zu einer Schlaffragmentierung mit gestörtem Nachtschlaf und bestätigt damit die Erkenntnisse aus einer Vorarbeit⁵⁰. Eine Reduktion des tiefen Schlafstadiums N3 konnte hingegen, ebenfalls in Einklang mit der Vorpublikation, nicht gezeigt werden. Diese fehlende Reduktion des Tiefschlafanteils, der ein wichtiger Einflussfaktor für die glymphatische Clearance ist⁷⁹, könnte eine Erklärung dafür sein, dass NT1-Patienten keine Erhöhung der AQP4-Konzentration als Zeichen einer glymphatischen Dysfunktion zeigen.

5.2 Etablierung und Validierung des Aquaporin-4-ELISA

Der im Rahmen einer Studie des Universitätsklinikums Ulm erstbeschriebene, nicht-kommerzielle AQP4-ELISA⁹¹ konnte im Rahmen dieses Projekts erfolgreich vor Ort etabliert werden. In einem Konzentrationsbereich von 62,5 – 3500 pg/mL konnten reliable AQP4-Konzentrationsbestimmungen mit einer niedrigen Intra- und Inter-Assay-CV von 5% respektive 14% durchgeführt werden. Die LLOQ von 104 pg/mL lag deutlich unterhalb der niedrigsten Konzentrationswerte der in 1:6-Verdünnung bestimmten Liquorproben (192 pg/mL – 1442 pg/mL).

Die Validierung wichtiger Assayparameter sollte neben der Präzision der Konzentrationsbestimmung insbesondere die Probenstabilität beim Umgang mit Biobankmaterial überprüft werden. Für bis zu 4 Einfrier-Auftau-Zyklen zeigte sich in diesen Untersuchungen dabei eine hohe Probenstabilität für die AQP4-Bestimmung im Liquor. Das ist insbesondere vorteilhaft, da viele moderne Forschungsprojekte mit eingefrorenen Biobankproben arbeiten, die zuvor unter Umständen bereits für andere

Analysen aufgetaut worden waren, aber nach diesen Ergebnissen weiterhin eine valide AQP4-Bestimmung zulassen. Da Veränderungen der detektierten Konzentration durch andere präanalytische Faktoren (Lagerungsgefäße, Gesamtlagerdauer, etc.) nicht ausgeschlossen werden können, sollte dennoch auf eine möglichst uniforme Behandlung der Proben einer Kohorte geachtet werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein sensitiver ELISA für die Bestimmung von AQP4 im Liquor etabliert werden. Vorteile des Assays sind die hohe Präzision, hohe Probenstabilität sowie ein nur geringes benötigtes Probenvolumen von 20µL Liquor, die den Assay damit einfach und zuverlässig anwendbar machen.

5.3 Etablierung und Validierung des Aquaporin-4-SIMOA-Assays

Zur Verbesserung der analytischen Sensitivität erfolgte der Transfer des AQP4-Assays auf die SIMOA-Plattform. Unter den verschiedenen evaluierten Assaybedingungen konnten beste Ergebnisse für einen 3-Schritt-Assay mit jeweils 250.000/µL funktionellen und Helper-Beads erzielt werden. Auch konnte durch die Verlängerung der Inkubationszeit der Proben mit den beadgekoppelten Antikörpern im 3-Schritt-Format eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses erreicht werden. Für Liquor- und Serumproben wurden 150µL bzw. 172µL als optimales Probenvolumen sowie die Verwendung von PBST unter den evaluierten Diluenten als günstig identifiziert.

In Analogie zur Validierung des ELISAs wurde für den optimierten Assay das LLOQ bestimmt, welches 0,81 pg/mL betrug. Damit konnte eine über 100-fache Steigerung der analytischen Sensitivität im Vergleich zum ELISA-Assay erreicht werden. Darüber hinaus deckt der entwickelte Assay einen großen Konzentrationsbereich von 1 – 2000 pg/mL ab, was insbesondere angesichts deutlich höherer AQP4-Konzentrationen bei Alzheimer-Patienten, wie im ELISA gezeigt, im Vergleich zu beispielsweise NT1-Patienten vorteilhaft ist. Mit Variationskoeffizienten von jeweils unter 15% für Intra- und Inter-Assay-Variabilität konnte eine hohe Präzision sowie Reliabilität bei der AQP4-Bestimmung im Liquor gezeigt werden. Damit wurde in dieser Arbeit der erste zuverlässige, bead-basierte Immunoassay zur Bestimmung von AQP4 entwickelt.

Mit der seriellen Verdünnung von Proben konnte für den SIMOA-Assay unter den finalen Bedingungen dieser Arbeit der Parallelismus der Konzentrationsbestimmungen für Liquorproben im Bereich 1:2 – 1:6, für Serumproben im Bereich 1:2 – 1:4 sowie native Proben nachgewiesen werden. Da eine Verdopplung der Inkubationszeit von Probe und bead-gekoppelten Antikörpern bereits eine Verbesserung des Parallelismus hervorgerufen hat, sollten zukünftige Arbeiten die Auswirkungen noch längerer Inkubationszeiten evaluieren.

Bei der Untersuchung der Wiederfindungsrate konnte für Liquor, der mit 1000 pg/mL rekombinantem AQP4 gespiket wurde eine Wiederfindungsrate von 100%, 87% und 97% für die Verdünnungsstufen 1:2, 1:4 und 1:8 festgestellt werden, die damit innerhalb publizierter Akzeptanzkriterien für Immunoassays liegen⁹⁸. Bei niedrigeren Spike-Konzentrationen von 500pg/mL war die Wiederfindungsrate bei einer 1:2-Verdünnung deutlich unterhalb, bei einer 1:4-Verdünnung des Liquors mit 79% nur grenzwertig unterhalb der Akzeptanzkriterien⁹⁸. Angesichts einer identischen Probenlagerung sowie -aufbereitung für alle gemessenen Liquores ist dadurch jedoch nicht von einer relevanten Beeinflussung der Ergebnisse dieser Studie auszugehen, zumal andere entwickelte SIMOA-Assays trotz reduzierter Wiederfindungsrate akkurate Messungen erlauben^{110,111}. Für Serumproben konnten die Akzeptanzkriterien⁹⁸ erst ab einer 1:128-Verdünnung (83% Wiederfindungsrate) erfüllt werden, womit ein relevanter Matrixeffekt im Serum nachgewiesen werden konnte. Die sukzessive Verbesserung der Wiederfindungsrate durch Verdünnung spricht für nicht-spezifische Bindungen als Ursache des Matrixeffektes¹¹². Diese können durch eine Veränderung der Zusammensetzung des Probenpuffers oder stärkere Verdünnungen beeinflusst werden, was die Wiederfindungsrate verbessern kann¹¹².

Da in den Messungen nativer Serumproben kein zuverlässig reproduzierbarer AEB-Wert im SIMOA-Assay detektiert werden konnte, wurden verschiedene Untersuchungen zur Probenaufbereitung durchgeführt. Dabei wurde eine Denaturierung von Proteinen entweder durch die Anlagerung an polare und unpolare Seitenketten, wie es für Harnstoff beschrieben ist, durch die Reduzierung von Disulfid-Brücken (DTT) oder thermische Beeinflussung der intramolekularen Bindungen erreicht. Durch die Wirkung von Tween20 als Detergenz, das störende Adhäsionen des Analyten an die Probengefäßwand reduzieren kann, in Kombination mit BSA, das unspezifische Bindestellen blockt, konnten für die Liquorproben nur minimal verbesserte AEB-Werte detektiert werden, für die anderen beschriebenen Substanzen konnte eine Reduktion der AEB beobachtet werden. In den Versuchen war jedoch insbesondere für mit RIPA-Puffer aufbereitete Proben eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses bei Serum- und Liquorproben festzustellen. Als Zellysepuffer enthält RIPA-Puffer verschiedene ionische und nicht-ionische Detergenzien, die hier störende Interaktionen mit anderen Matrixproteinen reduziert und so die Detektion verbessert haben könnten. Basierend auf diesen Effekten schloss sich eine Versuchsreihe an, die durch Zentrifugation der Proben durch Amicon-Filter eine Verbesserung der Detektierbarkeit insbesondere für Serumproben erreichen sollte. Hintergrund war die Hypothese, dass das im nativen Zustand 34 kDa-große AQP4 diesen Filter passieren könnte, der

gleichzeitig störende höher abundante Proteine zurückhält. Entgegen dieser Vorstellung konnte in den Versuchen eine Reduktion des AEB-Signals im Filtrat festgestellt werden, während insbesondere nach Probenaufbereitung mit RIPA-Puffer ein deutlich höheres AEB-Signal im Retentat nach Filtration als in der nativen Probe zu detektieren war. Dieses Ergebnis suggeriert, dass AQP4 nicht in seiner nativen, monomeren Form im Liquor oder Serum vorliegen kann, in der es den Filter passieren müsste. Eine mögliche Erklärung dafür wären posttranslationale Modifikationen des Proteins, wie z.B. Glykolysierungen, welche zu einem erhöhten Molekulargewicht und Proteindurchmesser führen können. Zum anderen wird AQP4 auf der astrozytären Membran als Heterotetramer exprimiert⁵⁷, was dazu führen könnte, dass es auch in nicht-monomerer Form im Liquor zu finden ist. Eine dritte Option wäre die Bindung an Trägerproteine. Um diese Umstände näher zu eruieren, sollten zukünftige Studien durch Gelelektrophorese, Western-Blot oder kapillarbasierte isoelektrische Fokussierung (CIEF) untersuchen, in welcher Form AQP4 im Liquor vorliegt. Auch hinsichtlich der Erkenntnis eines ausgeprägten Matrixeffektes im Serum sollten sich zukünftige Studien daher zusätzlich der Verbesserung der Probenpuffereigenschaften, z.B. durch Zusatz von Detergenzien, für die Ermöglichung der AQP4-Bestimmung im Serum widmen.

Ein deutlicher Vorteil des entwickelten digitalen AQP4-Immunoassays ist eine Reduktion der Durchführungsdauer der AQP4-Messung und die automatische Messung im SIMOA-Analyser. Erste Ergebnisse können bereits nach 2 h abgelesen werden. Im Vergleich dazu benötigen ELISA-Assays eine Inkubation über Nacht zum Coating der Platten, sowie eine aktive Labortätigkeit über mehrere Stunden, bis Ergebnisse detektiert werden können.

In der SIMOA-Messung eines Teils der Pilotkohorte aus NT1-Patienten (N=36) und schlafmedizinischen Kontrollen (N=35), die auch im ELISA gemessen worden waren, konnte das Ergebnis reduzierter AQP4-Konzentrationen im Liquor bei NT-Patienten bestätigt werden. Zudem wurde eine sehr hohe positive Korrelation von ELISA- und SIMOA-AQP4-Werten nachgewiesen ($r=0,94$; 95%-KI=0,9-0,96; $p<0,0001$), welche die Verlässlichkeit der Konzentrationsbestimmung am SIMOA unterstreicht. Niedrigere absolute Konzentrationen im SIMOA-Assay verglichen mit dem ELISA könnten durch kinetische Eigenschaften von SIMOA-Assays bedingt sein¹¹³. Die über Passing-Bablok-Analysen ermittelten Umrechnungsformeln können prinzipiell die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ermöglichen, wenngleich zukünftige Studien zur AQP4-Konzentration im Liquor nur ein Verfahren in den jeweiligen Kohorten anwenden sollten, um zuverlässige, vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

5.4 Aquaporin-4 als Biomarker für glymphatische Dysfunktion

Erstmalig wurde im Rahmen dieser Studie AQP4 als Biomarker für eine glymphatische Dysfunktion an einem Kollektiv aus NT1-Patienten untersucht. Dabei zeigten sich im Vergleich zu allen Kontrollkohorten erniedrigte AQP4-Spiegel bei NT1-Patienten. Diese Beobachtung spricht gegen die Forschungshypothese einer gestörten glymphatischen Clearance bei NT1-Patienten, wirft jedoch die Frage nach einer Beteiligung der AQP4-Kanäle an der Pathophysiologie der Erkrankung auf.

Insgesamt wurden bis dato nur wenige Studien zur in-vivo-Expression von AQP4 durchgeführt, keine davon zur Expression bei NT1. Dabei konnten insgesamt nur drei neuropathologische Studien eine reduzierte AQP4-Expression für verschiedene psychiatrische Erkrankungen aufzeigen. So konnte bei Patienten mit schweren depressiven Störungen eine signifikant reduzierte Immunoreaktivität der perivaskulären Astrozytenfortsätze gegenüber AQP4 festgestellt werden¹¹⁴. Jeweils eine Untersuchung liegt zu Schizophrenie und Patienten mit Autismus-Spektrum-Störung vor^{115,116}. Korrespondierende Untersuchungen der Liquor-AQP4-Konzentration zu diesen Erkrankungen, für die eine reduzierte Expression beschrieben ist, existieren zum aktuellen Zeitpunkt nicht. Weiterhin handelte es sich bei den Untersuchungen der Proteinexpression um postmortale Untersuchungen an medikamentös behandelten Patienten, sodass die veränderte Proteinexpression auch durch die Medikation bedingt sein könnte. Eine reduzierte in-vivo-Proteinexpression ist jedoch eine mögliche Erklärung reduzierter AQP4-Konzentrationen im Liquor von Patienten mit NT1.

Neben allgemeinen genetischen Regulationsmechanismen der Proteinexpression, die das Verhältnis von Proteinbildung und -abbau steuern, kann auch der Untergang solcher Zellen, welche das jeweilige Membranprotein präferiert exprimieren, eine reduzierte Expression bedingen. So zeigt der Hypothalamus eine im Vergleich zu anderen Gehirnarealen hohe AQP4-Expression¹¹⁷. Ein Verlust der AQP4-exprimierenden Astrozyten im Hypothalamus könnte also eine mögliche Erklärung für die in dieser Arbeit detektierten erniedrigten AQP4-Konzentrationen bei NT1 sein. Bei NT1 konnten durch volumetrische Untersuchungen reduzierte Volumina der grauen Substanz im Hypothalamus aber auch der inferioren Temporallappen und präfrontaler Cortexareale detektiert werden, welche im Rahmen der erwähnten Hypothese eine Reduktion der AQP4-Expression bedingen könnten¹¹⁸.

Ein alternativer Erklärungsansatz für eine Reduktion von AQP4-Kanälen auf der Membran hypothalamischer Astrozyten bei NT1-Patienten wäre eine immunologisch vermittelte Depletion, deren Mechanismen für andere neurologische Krankheitsentitäten

wie die Myasthenia gravis (MG) mit Acetylcholinrezeptorantikörpern gut beschrieben ist^{119,120}. Neben einer antikörpervermittelten Aktivierung des Komplementsystems ist dabei auch ein Crosslinking mit konsekutiver Proteininternalisierung ein bekannter pathophysiologischer Mechanismus¹¹⁹. Das Vorliegen eines Antikörpers gegen AQP4 könnte somit dessen reduzierte Expression bedingen. Der serologische Nachweis von AQP4-Antikörpern vom IgG-Typ ist mit den Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen (NMOSD) assoziiert, in deren Diagnosekriterien er eine wichtige Rolle spielt¹²¹. Auch für die NMOSD sind ähnliche pathophysiologische Mechanismen wie für die MG beschrieben¹²². Es konnte zudem eine reduzierte immunhistochemische Anfärbbarkeit von AQP4 in NMOSD-Läsionen gezeigt werden, welche als Resultat der direkten antikörpervermittelten Komplementaktivierung und Restrukturierungsprozesse der Proteinexpression auf der Zellmembran gewertet werden kann¹²³. Dabei führt die oben erwähnte hohe Dichte von AQP4-Kanälen, gegen die der krankheitsspezifische Antikörper gerichtet ist, im Hypothalamus dazu, dass eine hypothalamische Manifestation im Sinne einer sekundären Narkolepsie eine typische Krankheitsvariante der NMOSD darstellt¹²⁴. Nur eine Studie hat bisher die Seren von NT1-Patienten auf die Expression von AQP4-Antikörpern über einen RIA untersucht, ohne Anti-AQP4-Antikörper nachweisen zu können¹²⁵. Eine Untersuchung einer größeren Studienkohorte mit neueren Nachweisverfahren sollte das Vorkommen von Anti-AQP4-AK angesichts der Erniedrigung der AQP4-Konzentration im Liquor erneut untersuchen. Zudem wäre zu evaluieren, ob analog zur NMDA-Rezeptor-Enzephalitis der Antikörpernachweis im Liquor von NT1-Patienten sensitiver sein könnte als im Serum¹²⁶.

In dieser Arbeit zeigte sich eine positive Korrelation von AQP4-Konzentration und Patientenalter. Diese Ergebnisse decken sich mit denen aus einer früheren Studie, in der höheres Alter ebenfalls mit höheren AQP4-Spiegeln assoziiert war⁹¹. Auch neuropathologische Untersuchungen konnten in einer früheren Arbeit mit zunehmendem Patientenalter eine erhöhte AQP4-Expression im frontalen Cortex nachweisen⁸⁸. Für das alternde Gehirn wird eine reduzierte Effektivität des glymphatischen Systems postuliert⁸⁶. Dabei konnte am Mausmodell bei älteren Individuen eine reduzierte perivaskuläre AQP4-Expression festgestellt werden, die insbesondere die Clearance höhermolekularer Stoffe aus dem zentralen Nervensystem negativ beeinflusst^{81,86}. Steigende Liquorkonzentrationen von AQP4 mit zunehmendem Alter bestärken die Hypothese einer reduzierten glymphatischen Clearance in höherem Alter und könnten ein Grund für die höhere Prävalenz kognitiver Störungen mit steigendem Lebensalter sein.

In der NT1-Gruppe fand sich eine negative Korrelation von AQP4 und N3-Stadium in der Polysomnographie. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass eine ausreichende Schlafdauer und besonders ein ausreichender Anteil des Tiefschlafstadiums N3 Voraussetzungen für eine effiziente glymphatische Funktion sind.

In Konkordanz mit den Resultaten früherer Publikationen konnte in dieser Arbeit an einer kleinen Kohorte festgestellt werden, dass Alzheimer-Patienten höhere Aquaporin-4-Konzentrationen im Liquor als Kontrollen aufweisen⁹¹. Das stützt nicht nur die Evidenz für einen Nutzen von AQP4 als Biomarker bei Alzheimer-Demenz, sondern unterstreicht auch die gute Performance des etablierten AQP4-ELISA. Pathophysiologisch könnte die Erhöhung der Liquorkonzentrationen Ausdruck der bei Alzheimer-Patienten neuropathologisch beobachteten diffusen Aquaporin-4-Überexpression^{127,128} auf der Astrozytenmembran sein, die unter Verlust der physiologischen selektiven Kanallokalisierung auf den perivaskulären Astrozytenfortsätzen stattfindet⁸⁸. Durch diese Umbauprozesse scheint insbesondere die Clearance höhermolekularer Substanzen, zu denen auch β -Amyloid-Plaques zählen, aus dem zerebralen Interstitium eingeschränkt zu sein⁸¹.

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist zudem die positive Korrelation von Hypocretin-1 und AQP4. In erster Linie unterstreicht dieses Resultat die in dieser Studie detektierten reduzierten AQP4-Konzentrationen bei NT1-Patienten mit Erniedrigung der Hypocretin-1-Spiegel im Liquor. Zum anderen gibt diese Arbeit damit einen Hinweis auf eine mögliche Verbindung von Hypocretin-System und glymphatischem System, welche durch eine Förderung der Akkumulation pathologischer Peptide kognitive Störungen begünstigen könnte. Zu einem Zusammenhang von Liquor-Hypocretin-1-Konzentration und Amyloidakkumulation passend, konnte eine Studie bei NT1-Patienten eine reduzierte zerebrale Amyloidlast im ¹⁸F-Fluorbetapir-PET nachweisen⁵¹. Hinsichtlich der etablierten Liquor-Biomarker für die Alzheimer-Pathologie bei NT1-Patienten liegen konkurrierende Ergebnisse aus mehreren Studien vor, die jedoch nur kleine Kohorten untersucht haben und nie alzheimerartige Biomarkerveränderungen zeigen konnten^{52,53}. Da in der Vergangenheit auch die Koinzidenz der beiden Erkrankungen beschrieben wurde¹²⁹, sollten zukünftige Studien an größeren Kohorten von NT1-Patienten den Zusammenhang von Hypocretin-1-Konzentration und Alzheimer-Pathologie untersuchen. Die Ergebnisse dieser Studie würden, angesichts niedriger AQP4-Konzentrationen bei erniedrigten Hypocretin-1-Spiegeln, einen eher protektiven Effekt der NT1-Pathologie auf die Entstehung einer Alzheimer-Pathologie unterstützen.

Ebenfalls für einen Zusammenhang von Hypocretin-1 und Alzheimer-Demenz, möglicherweise mediiert durch Veränderungen im glymphatischen System, sprechen ein hypocretinassoziierter reduzierter Abbau von β -Amyloid-Fibrillen⁵⁶, eine positive Korrelation von Hypocretin-1 und p181-Tau in einer Gruppe älterer Menschen ohne apparente kognitive Defizite⁵⁵ sowie eine Abnahme der Ratio von phosphoryliertem zu nicht-phosphoryliertem p-Tau-181 im Liquor nach Einnahme des Orexin-Rezeptor-Antagonisten Suvorexant¹³⁰. Auch wenn im Tiermodell ein Zusammenhang von Hypocretin-1 und interstitieller Amyloidablagerung im Hirn gezeigt werden konnte¹³¹, konnten mehrere Studien keinen Zusammenhang zwischen Hypocretin-1-Konzentration und Konzentration der Amyloidpeptide im Liquor feststellen^{44,132}. Die Autoren einer Studie begründen dies mit dem Erreichen eines Plateaus niedriger A β 42-Konzentrationen im Erkrankungsverlauf, während Hypocretin-1-Konzentrationen erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien gegenüber gesunden Kontrollen signifikant erhöht seien⁴⁴. Eine Metaanalyse konnte abweichend von dieser Studie keine signifikante Veränderung der Hypocretin-1-Konzentrationen bei Alzheimer-Patienten feststellen, wenngleich in dieser keine Stratifizierung nach Krankheitsstadium vorgenommen wurde⁵⁴. Daher sollten eine Untersuchung der Hypocretin-1-Konzentration an einer großen Kohorte an Alzheimerpatienten, gesunden Kontrollen sowie möglicherweise auch NT1-Patienten sowie die Bestimmung der Demenzparameter (t-Tau, p-Tau, A β 40, A β 42, Amyloid-Ratio) Inhalt zukünftiger Studien sein, um den pathophysiologischen Zusammenhängen von Hypocretin-System und kognitiven Störungen weiter nachzugehen.

5.5 GFAP-Bestimmung bei Narkolepsie Typ 1 und Kontrollen

Ergänzend zur Bestimmung der AQP4-Konzentration bei Patienten mit NT1 wurde der etablierte astrozytäre Marker GFAP in dieser Arbeit untersucht. Eine Studie hatte im Vorfeld erhöhte Liquorkonzentrationen von GFAP bei NT1 im Vergleich zu Kontrollen ohne pathologisch erniedrigten Hypocretinspiegel festgestellt⁹². Im Gegensatz dazu konnte die vorliegende Arbeit keine Unterschiede in den Liquor-GFAP-Spiegeln zwischen NT1-Patienten und Kontrollen detektieren. Vorteile der aktuellen Untersuchungen sind eine deutlich größere Fallzahl sowie eine gute Charakterisierung der Kohorten, die eine Korrelation mit klinischen Parametern ermöglicht. Nicht alterierte GFAP-Konzentrationen im Liquor bei NT1-Patienten sprechen gegen ausgeprägte astroglotische Veränderungen im Hypothalamus bei NT1-Patienten, die von einigen Studien postuliert wurden²⁶, wenngleich anhand des kleinen bei NT1 betroffenen Hirnvolumens subliminale Veränderungen der GFAP-Konzentration nicht ausgeschlossen werden können.

In Bezug auf die erhobenen biometrischen Daten zeigte die GFAP-Konzentrationen eine positive Korrelation mit Alter und BMI. Der Befund steigender Liquor-GFAP-Konzentrationen mit zunehmendem Alter deckt sich mit den Ergebnissen früherer Publikationen^{133,134}.

Bereits mehrere Forschungsarbeiten berichteten über eine reduzierte Proteinstabilität von GFAP in Liquorproben nach wiederholten Einfrier-Auftau-Zyklen^{94,135}. Die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit bestätigen diese Vorberichte. In unserer Kohorte sahen wir nach 6 Einfrier-Auftau-Zyklen eine mittlere Abnahme der GFAP-Konzentration relativ zum Ausgangswert um 42%. Absolute Konzentrationswerte von GFAP sollten daher immer im Kontext des präanalytischen Probenumgangs interpretiert werden. Da in der vorliegenden Untersuchung der GFAP-Konzentration nur Proben verwendet wurden, die zuvor bereits einmalig aufgetaut wurden und somit einem identischen Probenumgang unterlagen, erscheint ein Vergleich der Gruppen dennoch valide. Die Angabe der Zahl der Einfrier-Auftau-Zyklen und die Beachtung der Verwendung von Proben, die den gleichen präanalytischen Einflussfaktoren ausgesetzt sind, sind jedoch für zukünftige Studien, welche GFAP-Konzentrationen über den vorliegenden ELISA bestimmen, zu fordern.

Eine Lagerung der Proben bei Raumtemperatur für eine unterschiedlich lange Zeitspanne hatte in dieser Arbeit keinen Effekt auf die Proteinstabilität von GFAP in den untersuchten Liquorproben. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine noch längere Lagerung bei Raumtemperatur zu einer Beeinflussung der gemessenen GFAP-Konzentration führt.

5.6 Stärken und Limitationen

Eine Stärke der Studie ist die hohe verwendete Probenanzahl bei den durchgeführten Experimenten in Bezug auf die niedrige Prävalenz der Erkrankung. Ferner konnte durch die retrospektive Datenerhebung eine gute Charakterisierung der zugehörigen Patienten erreicht werden. Diese Forschungsarbeit ist zudem die erste, die Biomarker AQP4 am Kollektiv von Patienten mit NT1 untersucht. Dafür kommen sowohl ein neu etablierter nicht-kommerzieller ELISA als auch ein neu entwickelter und validierter SIMOA-Assay zum Einsatz. Verglichen mit anderen verfügbaren Immunoassays^{89,91} zur Bestimmung von AQP4 konnte dabei die niedrigste LLOQ und damit die beste analytische Sensitivität erreicht werden. Ferner belegen die sehr hohe Korrelation zwischen beiden Detektionsmethoden, sowie niedrige Variationskoeffizienten die Verlässlichkeit der AQP4-Konzentrationsbestimmung durch beide Methoden.

Nicht unerwähnt bleiben sollen Limitationen der vorliegenden Ergebnisse. Zum einen konnten nicht für alle Patienten der Kohorten klinische Daten gesammelt werden, was die statistische Auswertung möglicherweise beeinflusste. Insbesondere lagen keine Daten zu kognitiven Störungen im Kollektiv von NT1-Patienten vor. Angesichts der positiven Korrelation von Hypocretin-1 und AQP4 wäre zudem die Bestimmung der Hcrt-1-Konzentration im Liquor der Alzheimer-Patienten interessant, um den Zusammenhang zwischen hypocretinerg Neurotransmission und glymphatischer Clearance weiter untersuchen zu können. Auch die geringe Probenzahl der Alzheimerpatienten ist eine Limitation der vorliegenden Forschungsarbeit, wenngleich die Messung der Liquores dieser Patientengruppe insbesondere unter der Maßgabe erfolgte, die Ergebnisse früherer Publikationen mit den hiesigen Messungen zu bestätigen (proof of concept), was die Aussagekraft der AQP4-Untersuchungen bei NT1-Patienten stärkt.

Die Bestätigung der Ergebnisse dieser Untersuchungen an einer anderen, noch größeren Kohorte aus NT1-Patienten und Kontrollen sollte Bestandteil zukünftiger Forschungsprojekte sein.

Hinsichtlich der GFAP-Messung ist auf die geringe Proteinstabilität von GFAP unter veränderten präanalytischen Bedingungen hinzuweisen. Ein Einfluss des erfolgten zweifachen Auftauens der Proben aus NT1- und Kontrollgruppe auf die gemessene GFAP-Konzentration lässt sich letztlich nicht ausschließen, auch wenn alle verwendeten Liquorproben derselben Anzahl an Einfrier-Auftau-Vorgängen vor der GFAP-Bestimmung unterlagen.

6. Literaturverzeichnis

1. Fischer F. Epileptoide Schlafzustände. Arch Für Psychiatr Nervenkrankh. 1878;8(1):200-203. doi:10.1007/BF01791317
2. Westphal C. Eigenthümliche mit Einschlafen verbundene Anfälle. 1877 7, 631–635.; Arch Psychiatr Nervenkr. 1877;(7):631-635.
3. Gelineau E. De la narcolepsie. Gaz Hôp. 1880;53:626-628.
4. Loewenfeld L. Über Narkolepsie. Münch Med Wochenschr. Published online 1902.
5. American Academy of Sleep Medicine, ed. The International Classification of Sleep Disorders, Third Edition (ICSD-3).; 2014.
6. Bixler EO, Kales A, Soldatos CR, Kales JD, Healey S. Prevalence of sleep disorders in the Los Angeles metropolitan area. Am J Psychiatry. 1979;136(10):1257-1262. doi:10.1176/ajp.136.10.1257
7. Silber MH, Krahn LE, Olson EJ, Pankratz VS. The epidemiology of narcolepsy in Olmsted County, Minnesota: a population-based study. Sleep. 2002;25(2):197-202. doi:10.1093/sleep/25.2.197
8. Longstreth WT, Koepsell TD, Ton TG, Hendrickson AF, van Belle G. The epidemiology of narcolepsy. Sleep. 2007;30(1):13-26. doi:10.1093/sleep/30.1.13
9. Ohayon MM, Duhoux S, Grieco J, Côté ML. Prevalence and incidence of narcolepsy symptoms in the US general population. Sleep Med X. 2023;6:100095. doi:10.1016/j.sleepx.2023.100095
10. Kallweit U, Nilius G, Trümper D, Vogelmann T, Schubert T. Prevalence, incidence, and health care utilization of patients with narcolepsy: a population-representative study. J Clin Sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med. 2022;18(6):1531-1537. doi:10.5664/jcsm.9910
11. Wijnans L, Lecomte C, de Vries C, et al. The incidence of narcolepsy in Europe: Before, during, and after the influenza A(H1N1)pdm09 pandemic and vaccination campaigns. Vaccine. 2013;31(8):1246-1254. doi:10.1016/j.vaccine.2012.12.015
12. Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, et al. Reduced Number of Hypocretin Neurons in Human Narcolepsy. Neuron. 2000;27(3):469-474. doi:10.1016/S0896-6273(00)00058-1
13. Peyron C, Faraco J, Rogers W, et al. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. Nat Med. 2000;6(9):991-997. doi:10.1038/79690
14. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell. 1998;92(5):1 page following 696. doi:10.1016/s0092-8674(02)09256-5
15. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(1):322-327. doi:10.1073/pnas.95.1.322
16. Burgess CR, Scammell TE. Narcolepsy: Neural Mechanisms of Sleepiness and Cataplexy. J Neurosci. 2012;32(36):12305-12311. doi:10.1523/JNEUROSCI.2630-12.2012

17. Lin L, Faraco J, Li R, et al. The Sleep Disorder Canine Narcolepsy Is Caused by a Mutation in the Hypocretin (Orexin) Receptor 2 Gene. *Cell*. 1999;98(3):365-376. doi:10.1016/S0092-8674(00)81965-0
18. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, et al. Narcolepsy in orexin Knockout Mice. *Cell*. 1999;98(4):437-451. doi:10.1016/S0092-8674(00)81973-X
19. Saitoh T, Sakurai T. The present and future of synthetic orexin receptor agonists. *Peptides*. 2023;167:171051. doi:10.1016/j.peptides.2023.171051
20. Mayer G, Lattermann A, Meier-Ewert K, Mueller-Eckhardt G. Genetische und immungenetische Aspekte der Narkolepsie. *Somnologie*. 1997;1(3):126-131. doi:10.1007/s11818-997-0023-3
21. Nohynek H, Jokinen J, Partinen M, et al. AS03 adjuvanted AH1N1 vaccine associated with an abrupt increase in the incidence of childhood narcolepsy in Finland. *PLoS One*. 2012;7(3):e33536. doi:10.1371/journal.pone.0033536
22. Liblau RS, Latorre D, Kornum BR, Dauvilliers Y, Mignot EJ. The immunopathogenesis of narcolepsy type 1. *Nat Rev Immunol*. 2024;24(1):33-48. doi:10.1038/s41577-023-00902-9
23. Aran A, Lin L, Nevsimalova S, et al. Elevated anti-streptococcal antibodies in patients with recent narcolepsy onset. *Sleep*. 2009;32(8):979-983. doi:10.1093/sleep/32.8.979
24. Hallmayer J, Faraco J, Lin L, et al. Narcolepsy is strongly associated with the T-cell receptor alpha locus. *Nat Genet*. 2009;41(6):708-711. doi:10.1038/ng.372
25. Pedersen NW, Holm A, Kristensen NP, et al. CD8+ T cells from patients with narcolepsy and healthy controls recognize hypocretin neuron-specific antigens. *Nat Commun*. 2019;10(1):837. doi:10.1038/s41467-019-08774-1
26. Thannickal TC, Siegel JM, Nienhuis R, Moore RY. Pattern of Hypocretin (Orexin) Soma and Axon Loss, and Gliosis, in Human Narcolepsy. *Brain Pathol*. 2003;13(3):340-351. doi:10.1111/j.1750-3639.2003.tb00033.x
27. Erlich SS, Itabashi HH. Narcolepsy: a neuropathologic study. *Sleep*. 1986;9(1 Pt 2):126-132. doi:10.1093/sleep/9.1.126
28. Barateau L, Liblau R, Peyron C, Dauvilliers Y. Narcolepsy Type 1 as an Autoimmune Disorder: Evidence, and Implications for Pharmacological Treatment. *CNS Drugs*. 2017;31(10):821-834. doi:10.1007/s40263-017-0464-6
29. Dauvilliers Y, Arnulf I, Mignot E. Narcolepsy with cataplexy. *The Lancet*. 2007;369(9560):499-511. doi:10.1016/S0140-6736(07)60237-2
30. Ohayon MM. Prevalence of hallucinations and their pathological associations in the general population. *Psychiatry Res*. 2000;97(2-3):153-164. doi:10.1016/S0165-1781(00)00227-4
31. Bonakis A, Howard RS, Ebrahim IO, Merritt S, Williams A. REM sleep behaviour disorder (RBD) and its associations in young patients. *Sleep Med*. 2009;10(6):641-645. doi:10.1016/j.sleep.2008.07.008
32. Sansa G, Iranzo A, Santamaria J. Obstructive sleep apnea in narcolepsy. *Sleep Med*. 2010;11(1):93-95. doi:10.1016/j.sleep.2009.02.009

33. Jennum PJ, Plazzi G, Silvani A, Surkin LA, Dauvilliers Y. Cardiovascular disorders in narcolepsy: Review of associations and determinants. *Sleep Med Rev.* 2021;58:101440. doi:10.1016/j.smrv.2021.101440
34. Barateau L, Lopez R, Franchi JAM, Dauvilliers Y. Hypersomnolence, Hypersomnia, and Mood Disorders. *Curr Psychiatry Rep.* 2017;19(2):13. doi:10.1007/s11920-017-0763-0
35. Mayer G, Kotterba S. Narkolepsie: Diagnose und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt.* February 2, 2001. Zuletzt abgerufen am 06.12.2024, zuletzt geprüft am 06.12.2024. <https://www.aerzteblatt.de/archiv/25878/Narkolepsie-Diagnose-und-Therapie>
36. Mignot E, Lammers GJ, Ripley B, et al. The Role of Cerebrospinal Fluid Hypocretin Measurement in the Diagnosis of Narcolepsy and Other Hypersomnias. *Arch Neurol.* 2002;59(10):1553-1562. doi:10.1001/archneur.59.10.1553
37. Dauvilliers Y, Baumann CR, Carlander B, et al. CSF hypocretin-1 levels in narcolepsy, Kleine-Levin syndrome, and other hypersomnias and neurological conditions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74(12):1667-1673. doi:10.1136/jnnp.74.12.1667
38. Ripley B, Overeem S, Fujiki N, et al. CSF hypocretin/orexin levels in narcolepsy and other neurological conditions. *Neurology.* 2001;57(12):2253-2258. doi:10.1212/wnl.57.12.2253
39. Bassetti CLA, Kallweit U, Vignatelli L, et al. European guideline and expert statements on the management of narcolepsy in adults and children. *Eur J Neurol.* 2021;28(9):2815-2830. doi:10.1111/ene.14888
40. Roth T, Dauvilliers Y, Guinta D, Alvarez-Horine S, Dynin E, Black J. Effect of sodium oxybate on disrupted nighttime sleep in patients with narcolepsy. *J Sleep Res.* 2017;26(4):407-414. doi:10.1111/jsr.12468
41. Westermann J, Lange T, Textor J, Born J. System consolidation during sleep - a common principle underlying psychological and immunological memory formation. *Trends Neurosci.* 2015;38(10):585-597. doi:10.1016/j.tins.2015.07.007
42. Irwin MR, Vitiello MV. Implications of sleep disturbance and inflammation for Alzheimer's disease dementia. *Lancet Neurol.* 2019;18(3):296-306. doi:10.1016/S1474-4422(18)30450-2
43. Lucey BP. It's complicated: The relationship between sleep and Alzheimer's disease in humans. *Neurobiol Dis.* 2020;144:105031. doi:10.1016/j.nbd.2020.105031
44. Liguori C, Romigi A, Nuccetelli M, et al. Orexinergic System Dysregulation, Sleep Impairment, and Cognitive Decline in Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* 2014;71(12):1498-1505. doi:10.1001/jamaneurol.2014.2510
45. Spira AP, Gamaldo AA, An Y, et al. Self-reported sleep and β -amyloid deposition in community-dwelling older adults. *JAMA Neurol.* 2013;70(12):1537-1543. doi:10.1001/jamaneurol.2013.4258
46. Brzecka A, Leszek J, Ashraf GM, et al. Sleep Disorders Associated With Alzheimer's Disease: A Perspective. *Front Neurosci.* 2018;12. doi:10.3389/fnins.2018.00330

47. Carpi M, Fernandes M, Mercuri NB, Liguori C. Sleep Biomarkers for Predicting Cognitive Decline and Alzheimer's Disease: A Systematic Review of Longitudinal Studies. *J Alzheimers Dis JAD*. 2024;97(1):121-143. doi:10.3233/JAD-230933
48. Implications of sleep disturbance and inflammation for Alzheimer's disease dementia - ScienceDirect. Zuletzt abgerufen am 06.12.2024, zuletzt geprüft am 06.12.2024.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1474442218304502>
49. Liu DX, He X, Wu D, et al. Continuous theta burst stimulation facilitates the clearance efficiency of the glymphatic pathway in a mouse model of sleep deprivation. *Neurosci Lett*. 2017;653:189-194. doi:10.1016/j.neulet.2017.05.064
50. Zhang Y, Ren R, Yang L, et al. Comparative polysomnography parameters between narcolepsy type 1/type 2 and idiopathic hypersomnia: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Med Rev*. 2022;63:101610. doi:10.1016/j.smrv.2022.101610
51. Gabelle A, Jausset I, Bouallègue FB, et al. Reduced brain amyloid burden in elderly patients with narcolepsy type 1. *Ann Neurol*. 2019;85(1):74-83. doi:10.1002/ana.25373
52. Jennum PJ, Østergaard Pedersen L, Czarna Bahl JM, et al. Cerebrospinal Fluid Biomarkers of Neurodegeneration Are Decreased or Normal in Narcolepsy. *Sleep*. 2017;40(1). doi:10.1093/sleep/zsw006
53. Baiardi S, Pizza F, Polischi B, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers of neurodegeneration in narcolepsy type 1. *Sleep*. 2020;43(2):zsz215. doi:10.1093/sleep/zsz215
54. Treu SP, Plante DT. Cerebrospinal fluid orexin in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Sleep Med*. 2021;85:230-238. doi:10.1016/j.sleep.2021.07.007
55. Osorio RS, Ducca EL, Wohlleber ME, et al. Orexin-A is Associated with Increases in Cerebrospinal Fluid Phosphorylated-Tau in Cognitively Normal Elderly Subjects. *Sleep*. 2016;39(6):1253-1260. doi:10.5665/sleep.5846
56. An H, Cho MH, Kim DH, Chung S, Yoon SY. Orexin Impairs the Phagocytosis and Degradation of Amyloid- β Fibrils by Microglial Cells. *J Alzheimers Dis JAD*. 2017;58(1):253-261. doi:10.3233/JAD-170108
57. Verkman AS, Anderson MO, Papadopoulos MC. Aquaporins: important but elusive drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(4):259-277. doi:10.1038/nrd4226
58. Huang P, Åbacka H, Wilson CJ, et al. Molecular basis for human aquaporin inhibition. *Proc Natl Acad Sci*. 2024;121(7):e2319682121. doi:10.1073/pnas.2319682121
59. Boone M, Deen PMT. Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption. *Pflugers Arch*. 2008;456(6):1005-1024. doi:10.1007/s00424-008-0498-1
60. Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*. 1992;256(5055):385-387. doi:10.1126/science.256.5055.385

61. Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, Agre P. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91(26):13052-13056. doi:10.1073/pnas.91.26.13052
62. Hasegawa H, Ma T, Skach W, Matthay MA, Verkman AS. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J Biol Chem.* 1994;269(8):5497-5500.
63. Hiroaki Y, Tani K, Kamegawa A, et al. Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and cell adhesion. *J Mol Biol.* 2006;355(4):628-639. doi:10.1016/j.jmb.2005.10.081
64. Rossi A, Pisani F, Nicchia GP, Svelto M, Frigeri A. Evidences for a leaky scanning mechanism for the synthesis of the shorter M23 protein isoform of aquaporin-4: implication in orthogonal array formation and neuromyelitis optica antibody interaction. *J Biol Chem.* 2010;285(7):4562-4569. doi:10.1074/jbc.M109.069245
65. Furman CS, Gorelick-Feldman DA, Davidson KGV, et al. Aquaporin-4 square array assembly: Opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(23):13609-13614. doi:10.1073/pnas.2235843100
66. Landis DM, Reese TS. Membrane structure in mammalian astrocytes: a review of freeze-fracture studies on adult, developing, reactive and cultured astrocytes. *J Exp Biol.* 1981;95:35-48. doi:10.1242/jeb.95.1.35
67. Smith AJ, Verkman AS. Superresolution Imaging of Aquaporin-4 Cluster Size in Antibody-Stained Paraffin Brain Sections. *Biophys J.* 2015;109(12):2511-2522. doi:10.1016/j.bpj.2015.10.047
68. Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. Specialized Membrane Domains for Water Transport in Glial Cells: High-Resolution Immunogold Cytochemistry of Aquaporin-4 in Rat Brain. *J Neurosci.* 1997;17(1):171-180. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-01-00171.1997
69. Adams ME, Mueller HA, Froehner SC. In vivo requirement of the alpha-syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin-4. *J Cell Biol.* 2001;155(1):113-122. doi:10.1083/jcb.200106158
70. Frigeri et al. Aquaporin-4 deficiency in skeletal muscle and brain of dystrophic mdx mice. Zuletzt abgerufen am 06.12.2024, zuletzt geprüft am 06.12.2024. <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1096/fj.00-0260com>
71. Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P, Noell S, Mack AF. Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2011;287:1-41. doi:10.1016/B978-0-12-386043-9.00001-3
72. Tani K, Mitsuma T, Hiroaki Y, et al. Mechanism of aquaporin-4's fast and highly selective water conduction and proton exclusion. *J Mol Biol.* 2009;389(4):694-706. doi:10.1016/j.jmb.2009.04.049
73. Ho JD, Yeh R, Sandstrom A, et al. Crystal structure of human aquaporin 4 at 1.8 Å and its mechanism of conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(18):7437-7442. doi:10.1073/pnas.0902725106
74. Prydz A, Stahl K, Zahl S, et al. Pro-Inflammatory Role of AQP4 in Mice Subjected to Intrastratial Injections of the Parkinsonogenic Toxin MPP+. *Cells.* 2020;9(11):2418. doi:10.3390/cells9112418

75. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med*. 2012;4(147):147ra111. doi:10.1126/scitranslmed.3003748
76. Rasmussen MK, Mestre H, Nedergaard M. The glymphatic pathway in neurological disorders. *Lancet Neurol*. 2018;17(11):1016. doi:10.1016/S1474-4422(18)30318-1
77. Hablitz LM, Nedergaard M. The Glymphatic System: A Novel Component of Fundamental Neurobiology. *J Neurosci*. 2021;41(37):7698-7711. doi:10.1523/JNEUROSCI.0619-21.2021
78. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2015;523(7560):337-341. doi:10.1038/nature14432
79. Christensen J, Yamakawa GR, Shultz SR, Mychasiuk R. Is the glymphatic system the missing link between sleep impairments and neurological disorders? Examining the implications and uncertainties. *Prog Neurobiol*. 2021;198:101917. doi:10.1016/j.pneurobio.2020.101917
80. Lee H, Xie L, Yu M, et al. The Effect of Body Posture on Brain Glymphatic Transport. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2015;35(31):11034-11044. doi:10.1523/JNEUROSCI.1625-15.2015
81. Bojarskaite L, Nafari S, Ravnanger AK, et al. Role of aquaporin-4 polarization in extracellular solute clearance. *Fluids Barriers CNS*. 2024;21:28. doi:10.1186/s12987-024-00527-7
82. Sun H, Liang R, Yang B, et al. Aquaporin-4 mediates communication between astrocyte and microglia: Implications of neuroinflammation in experimental Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2016;317:65-75. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.01.003
83. Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res*. 1992;587(2):250-256. doi:10.1016/0006-8993(92)91004-x
84. Tamtaji OR, Behnam M, Pourattar MA, Jafarpour H, Asemi Z. Aquaporin 4: A key player in Parkinson's disease. *J Cell Physiol*. 2019;234(12):21471-21478. doi:10.1002/jcp.28871
85. Hoshi A, Tsunoda A, Tada M, Nishizawa M, Ugawa Y, Kakita A. Expression of Aquaporin 1 and Aquaporin 4 in the Temporal Neocortex of Patients with Parkinson's Disease. *Brain Pathol Zurich Switz*. 2017;27(2):160-168. doi:10.1111/bpa.12369
86. Iliff JJ, Chen MJ, Plog BA, et al. Impairment of glymphatic pathway function promotes tau pathology after traumatic brain injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2014;34(49):16180-16193. doi:10.1523/JNEUROSCI.3020-14.2014
87. Moftakhar P, Lynch MD, Pomakian JL, Vinters HV. Aquaporin expression in the brains of patients with or without cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(12):1201-1209. doi:10.1097/NEN.0b013e3181fd252c
88. Zeppenfeld DM, Simon M, Haswell JD, et al. Association of Perivascular Localization of Aquaporin-4 With Cognition and Alzheimer Disease in Aging Brains. *JAMA Neurol*. 2017;74(1):91-99. doi:10.1001/jamaneurol.2016.4370

89. Arighi A, Arcaro M, Fumagalli GG, et al. Aquaporin-4 cerebrospinal fluid levels are higher in neurodegenerative dementia: looking at glymphatic system dysregulation. *Alzheimers Res Ther.* 2022;14(1):135. doi:10.1186/s13195-022-01077-6
90. Wang Y, Huang C, Guo Q, Chu H. Aquaporin-4 and Cognitive Disorders. *Aging Dis.* 2022;13(1):61-72. doi:10.14336/AD.2021.0731
91. José NG de S, Halbgebauer S, Steinacker P, et al. Aquaporin-4 as an early cerebrospinal fluid biomarker of Alzheimer's disease. Published online June 11, 2024:2024.06.11.24308689. doi:10.1101/2024.06.11.24308689
92. Feneberg E, Steinacker P, Lehnert S, Böhm B, Mayer G, Otto M. Elevated glial fibrillary acidic protein levels in the cerebrospinal fluid of patients with narcolepsy. *Sleep Med.* 2013;14(7):692-694. doi:10.1016/j.sleep.2013.04.013
93. Desjardins P, Hansen JB, Allen M. Microvolume Protein Concentration Determination using the NanoDrop 2000c Spectrophotometer. *J Vis Exp JoVE.* 2009;(33):1610. doi:10.3791/1610
94. Fazeli B, Huss A, Gómez de San José N, Otto M, Tumani H, Halbgebauer S. Development of an ultrasensitive microfluidic assay for the analysis of Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in blood. *Front Mol Biosci.* 2023;10. doi:10.3389/fmolb.2023.1175230
95. Simrén J, Weninger H, Brum WS, et al. Differences between blood and cerebrospinal fluid glial fibrillary Acidic protein levels: The effect of sample stability. *Alzheimers Dement.* 2022;18(10):1988-1992. doi:10.1002/alz.12806
96. Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol.* 2010;28(6):595-599. doi:10.1038/nbt.1641
97. Wilson DH, Rissin DM, Kan CW, et al. The Simoa HD-1 Analyzer: A Novel Fully Automated Digital Immunoassay Analyzer with Single-Molecule Sensitivity and Multiplexing. *J Lab Autom.* 2016;21(4):533-547. doi:10.1177/2211068215589580
98. Andreasson U, Perret-Liaudet A, van Waalwijk van Doorn LJC, et al. A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. *Front Neurol.* 2015;6:179. doi:10.3389/fneur.2015.00179
99. Moe SE, Sorbo JG, Sogaard R, Zeuthen T, Petter Ottersen O, Holen T. New isoforms of rat Aquaporin-4. *Genomics.* 2008;91(4):367-377. doi:10.1016/j.ygeno.2007.12.003
100. Mishra V, Heath RJ. Structural and Biochemical Features of Human Serum Albumin Essential for Eukaryotic Cell Culture. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8411. doi:10.3390/ijms22168411
101. Johns MW. A New Method for Measuring Daytime Sleepiness: The Epworth Sleepiness Scale. *Sleep.* 1991;14(6):540-545. doi:10.1093/sleep/14.6.540
102. Carskadon MA. Guidelines for the Multiple Sleep Latency Test (MSLT): A Standard Measure of Sleepiness. *Sleep.* 1986;9(4):519-524. doi:10.1093/sleep/9.4.519

103. Multipler Schlaflatenztest und Multipler Wachbleibetest - Enzyklopädie der Schlafmedizin - eMedpedia. springermedizin.de. Zuletzt abgerufen am 06.12.2024, zuletzt geprüft am 06.12.2024. https://www.springermedizin.de/emedpedia/detail/enzyklopaedie-der-schlafmedizin/multipler-schlaflatenztest-und-multipler-wachbleibetest?epediaDoi=10.1007%2F978-3-642-54672-3_131
104. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, et al. A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. *Neurology*. 2016;87(5):539-547. doi:10.1212/WNL.0000000000002923
105. Keizer RJ, Jansen RS, Rosing H, et al. Incorporation of concentration data below the limit of quantification in population pharmacokinetic analyses. *Pharmacol Res Perspect*. 2015;3(2):e00131. doi:10.1002/prp2.131
106. Beal SL. Ways to Fit a PK Model with Some Data Below the Quantification Limit. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2001;28(5):481-504. doi:10.1023/A:1012299115260
107. Irby DJ, Ibrahim ME, Dauki AM, et al. Approaches to handling missing or "problematic" pharmacology data: Pharmacokinetics. *CPT Pharmacomet Syst Pharmacol*. 2021;10(4):291-308. doi:10.1002/psp4.12611
108. Patel AK, Reddy V, Shumway KR, Araujo JF. Physiology, Sleep Stages. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2024. Zuletzt abgerufen am 06.12.2024, zuletzt geprüft am 06.12.2024. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526132/>
109. Valentin MA, Ma S, Zhao A, Legay F, Avrameas A. Validation of immunoassay for protein biomarkers: Bioanalytical study plan implementation to support pre-clinical and clinical studies. *J Pharm Biomed Anal*. 2011;55(5):869-877. doi:10.1016/j.jpba.2011.03.033
110. Petersen ERB, Olsen DA, Christensen H, Hansen SB, Christensen C, Brandslund I. Rhodopsin in plasma from patients with diabetic retinopathy - development and validation of digital ELISA by Single Molecule Array (Simoa) technology. *J Immunol Methods*. 2017;446:60-69. doi:10.1016/j.jim.2017.03.022
111. Njemini R, Verhaeghen K, Mets T, Weets I, Bautmans I. A Novel Bead-Based Immunoassay for the Measurement of Heat Shock Proteins 27 and 70. *Pathogens*. 2020;9(11):863. doi:10.3390/pathogens9110863
112. Tu J, Bennett P. Parallelism Experiments to Evaluate Matrix Effects, Selectivity and Sensitivity in Ligand-Binding Assay Method Development: Pros and Cons. *Bioanalysis*. 2017;9(14):1107-1122. doi:10.4155/bio-2017-0084
113. Chang L, Rissin DM, Fournier DR, et al. Single molecule enzyme-linked immunosorbent assays: Theoretical considerations. *J Immunol Methods*. 2012;378(1):102-115. doi:10.1016/j.jim.2012.02.011
114. Rajkowska G, Hughes J, Stockmeier CA, Miguel-Hidalgo JJ, Maciag D. COVERAGE OF BLOOD VESSELS BY ASTROCYTIC ENDFEET IS REDUCED IN MAJOR DEPRESSIVE DISORDER. *Biol Psychiatry*. 2013;73(7):613-621. doi:10.1016/j.biopsych.2012.09.024
115. Katsel P, Byne W, Roussos P, Tan W, Siever L, Haroutunian V. Astrocyte and Glutamate Markers in the Superficial, Deep, and White Matter Layers of the Anterior Cingulate Gyrus in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(6):1171-1177. doi:10.1038/npp.2010.252

116. Fatemi SH, Folsom TD, Reutiman TJ, Lee S. Expression of astrocytic markers aquaporin 4 and connexin 43 is altered in brains of subjects with autism. *Synap N Y N*. 2008;62(7):501-507. doi:10.1002/syn.20519
117. Venero JL, Vizuete ML, Ilundáin AA, Machado A, Echevarria M, Cano J. Detailed localization of aquaporin-4 messenger RNA in the CNS: preferential expression in periventricular organs. *Neuroscience*. 1999;94(1):239-250. doi:10.1016/s0306-4522(99)00182-7
118. Mahoney CE, Cogswell A, Korálnik IJ, Scammell TE. The neurobiological basis of narcolepsy. *Nat Rev Neurosci*. 2019;20(2):83-93. doi:10.1038/s41583-018-0097-x
119. Verschuuren JJGM, Huijbers MG, Plomp JJ, et al. Pathophysiology of myasthenia gravis with antibodies to the acetylcholine receptor, muscle-specific kinase and low-density lipoprotein receptor-related protein 4. *Autoimmun Rev*. 2013;12(9):918-923. doi:10.1016/j.autrev.2013.03.001
120. Gilhus NE. Myasthenia Gravis. *N Engl J Med*. 2016;375(26):2570-2581. doi:10.1056/NEJMra1602678
121. Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology*. 2015;85(2):177-189. doi:10.1212/WNL.0000000000001729
122. Carnero Contentti E, Correale J. Neuromyelitis optica spectrum disorders: from pathophysiology to therapeutic strategies. *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):208. doi:10.1186/s12974-021-02249-1
123. Misu T, Fujihara K, Kakita A, et al. Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain*. 2007;130(5):1224-1234. doi:10.1093/brain/awm047
124. Pittock SJ, Weinshenker BG, Lucchinetti CF, Wingerchuk DM, Corboy JR, Lennon VA. Neuromyelitis Optica Brain Lesions Localized at Sites of High Aquaporin 4 Expression. *Arch Neurol*. 2006;63(7):964-968. doi:10.1001/archneur.63.7.964
125. Tanaka S, Kawashima M, Honda M. Absence of anti-aquaporin-4 antibodies in narcolepsy. *Sleep Biol Rhythms*. 2009;7(2):66-70. doi:10.1111/j.1479-8425.2009.00387.x
126. Rössling R, Prüss H. SOP: antibody-associated autoimmune encephalitis. *Neurol Res Pract*. 2020;2:1. doi:10.1186/s42466-019-0048-7
127. Vizuete ML, Venero JL, Vargas C, et al. Differential upregulation of aquaporin-4 mRNA expression in reactive astrocytes after brain injury: potential role in brain edema. *Neurobiol Dis*. 1999;6(4):245-258. doi:10.1006/nbdi.1999.0246
128. Hamby ME, Sofroniew MV. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurother J Am Soc Exp Neurother*. 2010;7(4):494-506. doi:10.1016/j.nurt.2010.07.003
129. Scammell TE, Matheson JK, Honda M, Thannickal TC, Siegel JM. Coexistence of narcolepsy and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2012;33(7):1318-1319. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.12.008

130. Lucey BP, Liu H, Toedebusch CD, et al. Suvorexant Acutely Decreases Tau Phosphorylation and A β in the Human CNS. *Ann Neurol*. 2023;94(1):27-40. doi:10.1002/ana.26641
131. Kang JE, Lim MM, Bateman RJ, et al. Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science*. 2009;326(5955):1005-1007. doi:10.1126/science.1180962
132. Schmidt FM, Kratzsch J, Gertz HJ, et al. Cerebrospinal fluid melanin-concentrating hormone (MCH) and hypocretin-1 (HCRT-1, orexin-A) in Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2013;8(5):e63136. doi:10.1371/journal.pone.0063136
133. Axelsson M, Malmeström C, Nilsson S, Haghghi S, Rosengren L, Lycke J. Glial fibrillary acidic protein: a potential biomarker for progression in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2011;258(5):882-888. doi:10.1007/s00415-010-5863-2
134. Liu T, Zuo H, Ma D, Song D, Zhao Y, Cheng O. Cerebrospinal fluid GFAP is a predictive biomarker for conversion to dementia and Alzheimer's disease-associated biomarkers alterations among de novo Parkinson's disease patients: a prospective cohort study. *J Neuroinflammation*. 2023;20(1):167. doi:10.1186/s12974-023-02843-5
135. Simrén J, Weninger H, Brum WS, et al. Differences between blood and cerebrospinal fluid glial fibrillary Acidic protein levels: The effect of sample stability. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc*. 2022;18(10):1988-1992. doi:10.1002/alz.12806

7. Thesen

- (1) Durch den im Rahmen dieser Forschungsarbeit etablierten Aquaporin-4-ELISA ist eine zuverlässige quantitative Aquaporin-4-Bestimmung im Liquor möglich.
- (2) Auch der etablierte SIMOA-Assay ist zur Konzentrationsbestimmung von AQP4 im Liquor geeignet und zeigt eine hohe Korrelation zu den Konzentrationen im ELISA.
- (3) Erniedrigte AQP4-Konzentrationen im Liquor von NT1-Patienten sprechen gegen eine ausgeprägte glymphatische Dysfunktion bei diesen Patienten, können jedoch Ausdruck einer astrozytären Pathologie sein und deuten damit eine Beteiligung der AQP4-Proteinkanäle an der Pathophysiologie der Erkrankung an.
- (4) Eine positive Korrelation von AQP4-Konzentration und Patientenalter bei Probengewinnung ist ein Hinweis auf ein alteriertes glymphatisches System im höheren Lebensalter und kann eine Erklärung für die in diesem Patientenkollektiv betrachtete Rate an kognitiven Störungen sein, die mit einer gestörten glymphatischen Clearance assoziiert ist.
- (5) Eine negative Korrelation des Anteils des Schlafstadiums N3 mit der AQP4-Konzentration betont die Bedeutung von Tiefschlaf für die Funktion des glymphatischen Systems.
- (6) Die positive Korrelation von Hypocretin-1 und AQP4 legt eine Assoziation von hypocretinergener Neurotransmission und glymphatischer Funktion nahe.
- (7) Eine Erhöhung des Anteils des frühen Schlafstadiums N1 bei NT1-Patienten im Vergleich zu Kontrollen ist Korrelat einer Schlaffragmentation bei diesem Patientenkollektiv.
- (8) Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit, welche eine verkürzte Einschlaf latenz und erhöhte Anzahl von SOREMPs im MSLT sowie eine erhöhte Rate an Kataplexie im Vergleich zu Kontrollen, die ebenfalls unter Tagesmüdigkeit litten, zeigen konnten, stützen die Bedeutung des MSLT und der Kataplexie als klinisch-definierende Kriterien der Narkolepsie Typ 1.
- (9) Es besteht kein Unterschied in der Liquor-GFAP-Konzentration von NT1-Patienten und Kontrollen.

8. Anhang

Tabelle 14 – Diagnosekriterien Narkolepsie Typ 1 und 2 nach ICSD-3

Tabelle in Anlehnung an: American Academy of Sleep Medicine (Hrsg.): *The International Classification of Sleep Disorders, Third Edition (ICSD-3)*. 2014. ISBN 978-0-9915434-1-0. SOREMP: *sleep onset REM period*; MSLT: *Multipler-Schlaflatenz-Test*.

Narkolepsie Typ 1 (Beide Kriterien müssen erfüllt sein.)	
a)	Tägliche Episoden von chronischer Tagesschläfrigkeit (EDS), nicht unterdrückbarem Schlafbedürfnis oder Schlafattacken über mehrere Tage für mindestens 3 Monate.
b)	Vorhandensein von Kataplexie und einer mittleren Einschlafatenz von ≤ 8 min und ≥ 2 SOREMPs im standardisierten MSLT oder Hypocretin-Konzentration im Liquor < 110 pg/mL oder $< 1/3$ der Mittelwerte gesunder Pat. im selben Assay
Narkolepsie Typ 2 (Alle Kriterien müssen erfüllt sein.)	
a)	Tägliche Episoden von chronischer Tagesschläfrigkeit (EDS), nicht unterdrückbarem Schlafbedürfnis oder Schlafattacken über mehrere Tage für mindestens 3 Monate.
b)	Nachweis einer mittleren Einschlafatenz von ≤ 8 min und ≥ 2 SOREMPs im standardisierten MSLT.
c)	Kein Vorliegen einer Kataplexie.
d)	Hypocretin-Konzentration im Liquor > 110 pg/mL oder $> 1/3$ der Mittelwerte von gesunden Pat. mit demselben Assay oder nicht gemessen.
e)	Ausschluss anderer Ursachen (insb. obstruktives Schlafapnoesyndrom, Syndrom der verzögerten Schlafphase, unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen, Schlafdefizit) für Tagesschläfrigkeit und/oder MSLT-Ergebnisse.

Tabelle 15 – Deskriptive Statistik der zusätzlichen Kontrollkohorten im Vergleich zur NT1-Kohorte

Für das Alter werden jeweils Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Unter sonstigen Kopfschmerzen werden Patienten mit Beschwerden subsummiert, bei denen typische Ursachen primärer oder sekundärer Kopfschmerzen ausgeschlossen wurden bzw. die keiner Diagnosegruppe der Internationalen Kopfschmerzklassifikation (ICHD-3) zugeordnet werden konnte. Für die Diagnose funktioneller Beschwerden sowie unklaren Schwindels wurden relevante Differentialdiagnosen bildmorphologisch und laborchemisch ausgeschlossen. *NT1 – Narkolepsie Typ 1. BMI – Body Mass Index.*

	NT1-Patienten (Hcrt-1 < 110 pg/mL)	Kontrollgruppe 2 (Biobank UMH)	Alzheimer- Kohorte
Anzahl	133	62	9
Anzahl männlich	77	18	4
Anzahl weiblich	55	48	5
Alter in Jahren	37,5 ± 14,61	34,8 ± 11,23	76,2 ± 9,6
Diagnosen			
<i>Narkolepsie Typ 1</i>	133	0	0
<i>Kopfschmerzen (KS)</i>	0	47	0
Migräne		21	
Parainfektiöser KS		3	
Clusterkopfschmerz		2	
Neuralgien der kranialen Nerven		4	
KS durch Medikamenten- übergebrauch		1	
Kopfschmerz vom Spannungstyp		4	
Postpunktionelles Syndrom		1	
Sonstige Kopfschmerzen		11	
<i>Funktionelle Symptomatik</i>	0	12	0
Dys-/Hypästhesien		8	
Belastungsintoleranz		2	
Unklare Schmerzen		2	
<i>Schwindel</i>	0	3	0
<i>Alzheimer-Demenz</i>	0	0	9

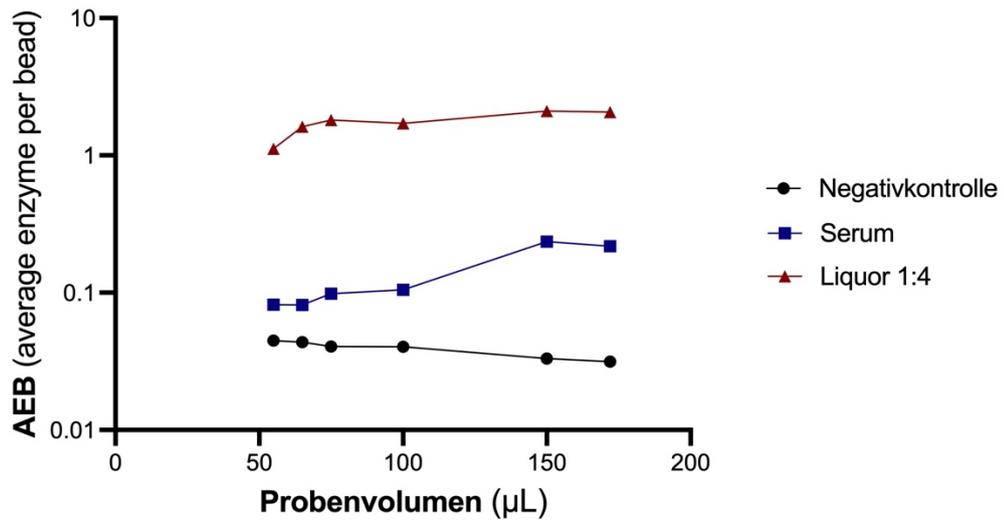


Abbildung 31 – Einfluss des Probenvolumens auf die Bestimmung der AEB

In diesem Diagramm werden die bei verschiedenen verwendeten Probenvolumina detektierten AEBs identischer Liquorproben und Serumproben im Verhältnis zu einem Blank (Negativkontrolle) dargestellt. Das beste Signal-Rausch-Verhältnis der AQP4-Bestimmung wird bei 172µL Liquor und 150 µL Serum erreicht. *AEB – average number of enzyme labels per bead. AQP4 – Aquaporin-4.*

Danksagung

Im Rahmen dieser Dissertationsschrift möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die mich auf unterschiedlichste Weise während der Entstehungszeit meiner Promotion unterstützt, beraten und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen BetreuerInnen, Herrn Prof. Dr. med. Markus Otto und Frau Prof. Dr. rer. nat. Petra Steinacker, deren fortwährende Unterstützungsbereitschaft, fachliche Expertise und wissenschaftliche Erfahrung ein Fundament meiner wissenschaftlichen Arbeit darstellten. Ihre Ideen, konstruktive Kritik und beratenden Worte waren für die Anfertigung der Promotionsarbeit eine essenzielle Bereicherung. Zudem möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, im Rahmen der Forschungstätigkeit von Fortbildungen und Kongressteilnahmen profitieren zu können.

Ich danke weiterhin den Kolleginnen und Kollegen aus dem Neurologisch-Neurochemischen Labor der Universitätsmedizin Halle (Saale), insbesondere Frau Lisa Habeck, Frau Katrin Schulz, Herrn Ilyas Al-Ali, Frau Emily Gönzheimer, Frau Jana Bentrup und Herrn Alexander-Timofei Tarabuko, für ihre Unterstützung während der Durchführung meiner Experimente.

Für die Bereitstellung der klinischen Daten und Befunde möchte ich stellvertretend für alle Kolleginnen und Kollegen der einsendenden Kliniken Herrn Prof. Dr. med. Geert Mayer und Frau Prof. Dr. med. Sylvia Kotterba meine Dankbarkeit ausdrücken. Durch Ihre freundliche Mitarbeit haben Sie einen wesentlichen Beitrag zum Erfolg dieses Projektes geliefert.

Ich danke ferner allen Patientinnen und Patienten, die durch die Bereitstellung von Biomaterial und klinischen Informationen das Fundament dieser Arbeit sind und einen immanenten Beitrag zum wissenschaftlichen Fortschritt leisten.

Abschließend bin ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester, sowie allen Freundinnen und Freunden dankbar, die auf meinem Weg immer an mich geglaubt haben und mir beratend und bestärkend zur Seite standen.

Mit herzlichem Dank

Jonas Ranke

Erklärung über frühere Promotionsversuche und Selbstständigkeitserklärung

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), den 06.12.2024

Jonas Ranke