

Multiplexe Immunoassays zur Quantifizierung von biogenen Aminen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Nadja Baur
aus Sigmaringen

Tübingen
2013

Tag der mündlichen Qualifikation:

12.02.2014

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Stevanović

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Ulrich Rothbauer

Betreuer an der Eberhard Karls Universität Tübingen

Prof. Dr. Stefan Stevanović

**Betreuer am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut
an der Universität Tübingen**

Dr. Thomas Joos und Dr. Nicole Schneiderhan-Marra

Danksagung

Diese Arbeit wurde am NMI – Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der Universität Tübingen in Reutlingen in der Abteilung Biochemie angefertigt.

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denen recht herzlich bedanken, die mich während dieser Zeit bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Bei **Prof. Stefan Stevanović** möchte ich mich für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. **Prof. Ulrich Rothbauer** danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt **Dr. Thomas Joos** und **Dr. Nicole Schneiderhan-Marra** für die Bereitstellung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit am NMI, für hilfreiche Diskussionen, zahlreiche Ideen und die großartige Unterstützung in allen Situationen. Dr. Thomas Joos danke ich ebenfalls für die tolle Möglichkeit, einen Teil meiner Versuche bei Myriad RBM in den USA durchzuführen.

Ein großer Dank gilt **Dr. Bernhard Manz, Georg Manz und Esther Booltink** von der Firma Labor Diagnostika Nord in Nordhorn, die mir die Bearbeitung dieses Themas ermöglicht haben und mich mit hilfreichen Diskussionen und Materialien großartig unterstützt haben. Ich möchte mich bei ihnen auch besonders für die Möglichkeit bedanken, aufschlussreiche Versuche in Nordhorn durchführen zu können und war von der tollen Betreuung dort begeistert.

I would like to thank **Dr. Laurie Stephen** for giving me the chance to join her lab at Myriad RBM in Saranac Lake and for an exciting time abroad. In this context I also gratefully thank **Ellen and Bob Miller** for the possibility to stay at their home during this time and for many great trips in the Adirondacks.

Allen Projektpartnern danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung von Patientenproben. **Dr. med. Nadine Koch und Natalie Otto** von der Charité – Universitätsmedizin Berlin danke ich für die Bereitstellung der Urinproben von Phäochromozytom-Patienten sowie Patienten mit einer Nierenerkrankung. **Prof. Christoph Laske und Elke Stransky** vom Universitätsklinikum in Tübingen danke ich für die Bereitstellung von Urinproben von Patienten mit Gedächtnisstörungen. **Dr. med. Andreas Peter** vom Universitätsklinikum Tübingen danke ich für die Bereitstellung von

Patientenurin und der HPLC-Referenzwerte. **Suvi Ruohonen** von der Universität in Turku danke ich für die Bereitstellung der Mausurinproben.

Ein großer Dank gilt allen meinen Kollegen hier am NMI für ihre großartige und ständige Hilfsbereitschaft und die tolle Arbeitsatmosphäre. **Conny Sommersdorf** danke ich herzlich für die tolle Unterstützung im Labor und die aufmunternden Worte in allen Situationen. **Anna Mayer** danke ich sehr für die Unterstützung bei einigen Versuchen. **Dr. Oliver Pötz** und **Dr. Jens Göpfert** danke ich sehr für hilfreiche Diskussionen und tolle Ideen. **Dr. Stefanie Rimmele**, **Dr. Yvonne Heubach**, **Hannes Planatscher** und **Nico Weber** danke ich für die geduldige Hilfe bei allen Auswertungs- und Statistikfragen.

Ebenfalls möchte ich mich ganz besonders bei meinen **Freunden** für die tolle Ablenkung und für die motivierenden Worte während der ganzen Zeit bedanken.

Bei meinem Freund **Felix** möchte ich mich ganz herzlich für seine Unterstützung, sein Verständnis und seine Geduld, auch zum hundertsten Mal mit mir über meine Arbeit zu diskutieren und mich immer wieder aufzumuntern, bedanken und ganz besonders für die wundervolle Zeit, die wir zusammen verbringen.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei **meinen Eltern** und **meinem Bruder Michael** bedanken, die mich jederzeit unterstützt haben, mir stets mit allen Mitteln und Kräften zur Seite standen und immer für mich da waren.

Vielen Dank!

I Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
I Inhaltsverzeichnis	III
II Abbildungsverzeichnis	VII
III Tabellenverzeichnis	IX
IV Abkürzungsverzeichnis	XIII
1. Einleitung	1
1.1 Biogene Amine	1
1.1.1 Catecholamine und Metanephriene	3
1.1.2 Serotonin	11
1.2 Biogene Amine und Erkrankungen	14
1.2.1 Erkrankungen mit Veränderung der Konzentration von Catecholaminen und Metanephrienen	15
1.2.2 Erkrankungen mit Veränderung der Konzentration von Serotonin	21
1.3 Methoden zur Quantifizierung von biogenen Aminen in humanen Flüssigkeiten	24
1.3.1 Probenvorbereitung	26
1.3.2 Immunologische Nachweisverfahren	27
1.3.3 Chromatographische Nachweisverfahren	28
1.3.4 Weitere Nachweisverfahren	28
1.4 Microarrays	29
1.4.1 Das Bead-basierte Array-System	29
1.4.2 Multiplexe Immunoassays	30
1.4.3 Validierung von Immunoassays	31
2. Zielsetzung	35
3. Material und Methoden	37
3.1 Materialien	37
3.1.1 Urinproben	37
3.1.2 Antikörper	38
3.1.3 Proteinkonjugate zur Antikörperaufreinigung	38
3.1.4 Chemikalien und Reagenzien	39
3.1.5 Verbrauchsmaterialien	41
3.1.6 Kits	41
3.1.7 Puffer und Lösungen	42
3.1.8 Geräte	44
3.1.9 Software	45

3.2	Methoden	45
3.2.1	Biochemische Methoden	45
3.2.2	Sammeln von Urinproben	51
3.2.3	Probenvorbereitung für die Quantifizierung von Catecholaminen.....	52
3.2.4	Probenvorbereitung für die Quantifizierung von Metanephrinen und Serotonin	56
3.2.5	Multiplexe Immunoassays	57
3.2.6	Durchführung der kommerziell erhältlichen ELISAs der Firma LDN	69
3.2.7	Datenanalyse.....	70
4.	Ergebnisse	77
4.1	Machbarkeit nicht-kompetitiver, multiplexer Immunoassays für Catecholamine	77
4.1.1	Immobilisierung der Antikörper auf den Mikrosphären.....	77
4.1.2	Wahl eines geeigneten Acylierungsreagenzes	77
4.1.3	Aufbau des nicht-kompetitiven, multiplexen Immunoassays.....	79
4.2	Aufreinigung von Antikörpern aus den Kaninchen-Antiseren	80
4.3	Identifizierung geeigneter Antikörper	84
4.4	Optimierung der multiplexen Immunoassays	88
4.5	Auswahl von geeignetem Probenmaterial – Generierung von Qualitätskontrollen	96
4.5.1	Auswahl eines geeigneten Urinspenders	96
4.5.2	Qualitätskontrollen für die Validierung der multiplexen Immunoassays.....	98
4.6	Validierung der multiplexen Immunoassays	100
4.6.1	Ermittlung eines geeigneten Kalibrierkurvenmodells	100
4.6.2	Ermittlung der unteren Nachweisgrenze (Limit of detection)	103
4.6.3	Ermittlung der unteren Bestimmungsgrenze (Lower limit of quantification)	104
4.6.4	Ermittlung der oberen Bestimmungsgrenze (Upper limit of quantification).....	105
4.6.5	Dynamischer Bereich	107
4.6.6	Ermittlung der Intra- und Interassay Präzision sowie der Wiederfindungsrate	108
4.6.7	Bestimmung der Verdünnungslinearität	110
4.6.8	Ermittlung der Selektivität.....	112
4.6.9	Robustheit: Kurzzeitstabilität und Stabilität gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen ...	114
4.7	Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin aus Dry Urine Test-Filterkarten	117
4.8	Vergleich der multiplexen Immunoassays mit den gängigen Methoden zur Quantifizierung von Catecholaminen und Metanephrinen im Urin	120
4.9	Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Patienten	131
4.9.1	Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Patienten mit einem Phäochromozytom.....	132
4.9.2	Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Patienten mit Gedächtnisstörungen	135
4.9.3	Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Patienten mit verschiedenen Nierenerkrankungen	139
4.10	Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Alpha-Adrenozeptor-Knockout-Mäusen	144

5. Diskussion	149
5.1 Machbarkeit nicht-kompetitiver, multiplexer Immunoassays für Catecholamine	151
5.2 Aufreinigung von Antikörpern aus den Kaninchen-Antiseren	153
5.3 Entwicklung der multiplexen Immunoassays	155
5.4 Probenmaterial	159
5.5 Validierung der multiplexen Immunoassays.....	164
5.6 Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin aus <i>Dry Urine Test</i> -Filterkarten	170
5.7 Vergleich der multiplexen Immunoassays mit den gängigen Methoden zur Quantifizierung von Catecholaminen und Metanephrinen im Urin.....	171
5.8 Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Patienten	173
5.9 Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Alpha- Adrenozeptor-Knockout-Mäusen.....	177
6. Zusammenfassung und Ausblick	181
7. Referenzen	185
8. Anhang	193
9. Lebenslauf	197
10. Wissenschaftliche Arbeiten	199

II Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1:</i> Strukturformeln der Catecholamine..	3
<i>Abbildung 2:</i> Biosynthese der Catecholamine.	5
<i>Abbildung 3:</i> Abbau der Catecholamine.....	7
<i>Abbildung 4:</i> Abbau von Dopamin.....	8
<i>Abbildung 5:</i> Über Adrenozeptoren vermittelte Wirkungen von Noradrenalin und Adrenalin.	10
<i>Abbildung 6:</i> Biosynthese von Serotonin.	12
<i>Abbildung 7:</i> Abbau von Serotonin.....	13
<i>Abbildung 8:</i> Die xMAP-Technologie der Firma Luminex.	30
<i>Abbildung 9:</i> Sammeln von Urinproben mit Hilfe von DUT-Filterkarten der Firma LDN.	52
<i>Abbildung 10:</i> Probenvorbereitung für die Quantifizierung von Catecholaminen.	55
<i>Abbildung 11:</i> Aufbau des Versuchs zur Demonstration der prinzipiellen Realisierbarkeit eines nicht-kompetitiven, multiplexen Immunoassays für Catecholamine..	60
<i>Abbildung 12:</i> Multiplexer Immunoassay für Catecholamine.	61
<i>Abbildung 13:</i> Multiplexer Immunoassay für Metanephrin, Normetanephrin, 3-Methoxytyramin und Serotonin.	62
<i>Abbildung 14:</i> Interpretation des Box-Whisker-Plots.	73
<i>Abbildung 15:</i> Vorversuch zur Ermittlung eines geeigneten Acylierungsreagenzes.....	78
<i>Abbildung 16:</i> Vorversuch zur Demonstration der prinzipiellen Realisierbarkeit eines nicht-kompetitiven, multiplexen Immunoassays für Catecholamine..	79
<i>Abbildung 17:</i> Ergebnis der Aufreinigung der Kaninchen-Antiseren.....	82
<i>Abbildung 18:</i> Test der α -3-Methoxytyramin-AK im nicht-kompetitiven Assay zur Identifizierung eines geeigneten Antikörpers.....	84
<i>Abbildung 19:</i> Test der α -Metanephrin-AK im nicht-kompetitiven Assay zur Identifizierung eines geeigneten Antikörpers.	85
<i>Abbildung 20:</i> Test der α -Normetanephrin-AK im nicht-kompetitiven Assay zur Identifizierung eines geeigneten Antikörpers.....	86
<i>Abbildung 21:</i> Test der α -Serotonin-AK im nicht-kompetitiven Assay zur Identifizierung eines geeigneten Antikörpers.	87
<i>Abbildung 22:</i> Test verschiedener Acylierungsreagenzien im multiplexen Assay.	89
<i>Abbildung 23:</i> Test verschiedener Konzentrationen des Acylierungsreagenzes am Beispiel Adrenalin.	91

<i>Abbildung 24:</i> Test verschiedener Inkubationszeiten für die Acylierung und enzymatische Umwandlung im Dopamin-Assay.	92
<i>Abbildung 25:</i> Test unterschiedlicher Puffersysteme für Mikrosphären und Streptavidin im multiplexen Catecholamin-Assay..	93
<i>Abbildung 26:</i> Test verschiedener Streptavidine.	94
<i>Abbildung 27:</i> Abstoppen der Acylierungsreaktion im Metanephrin/Serotonin-Assay.	95
<i>Abbildung 28:</i> Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin aus <i>Dry Urine Test</i> -Filterkarten.	119
<i>Abbildung 29:</i> Vergleich zwischen den multiplexen Immunoassays und kommerziell erhältlichen ELISAs der Firma LDN.	121
<i>Abbildung 30:</i> Korrelationsdiagramme für den Vergleich zwischen den multiplexen Immunoassays und kommerziell erhältlichen kompetitiven ELISAs bzw. HPLC-Messungen.	124
<i>Abbildung 31:</i> Vergleich der im multiplexen Assay und im ELISA quantifizierten Menge an Noradrenalin.	127
<i>Abbildung 32:</i> Vergleich der im multiplexen Assay und im ELISA quantifizierten Menge an Noradrenalin bei Verwendung unterschiedlicher Stereoisomere des Noradrenalins.	129
<i>Abbildung 33:</i> Quantifizierung von Noradrenalin im multiplexen Immunoassay nach saurer Hydrolyse und Vergleich mit ELISA- und HPLC-Messungen.	130
<i>Abbildung 34:</i> Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin in humanem Patientenurin.	133
<i>Abbildung 35:</i> Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Patienten mit Gedächtnisstörungen.	136
<i>Abbildung 36:</i> Box-Whisker-Plots für die Ergebnisse der Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Patienten mit verschiedenen Nierenerkrankungen. ...	140
<i>Abbildung 37:</i> Hierarchische Clusteranalyse zur Identifizierung von Analyten mit unterschiedlichen Konzentrationen bei Patienten und gesunden Probanden.	143
<i>Abbildung 38:</i> Box-Whisker-Plots für die Ergebnisse der Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Mäusen mit einem Adrenozeptor-Knockout.	145

III Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i> Übersicht über einige der wichtigsten biogenen Amine.	2
<i>Tabelle 2:</i> Sensitivität und Spezifität der Bestimmung verschiedener biogener Amine für die Diagnose von Phäochromozytomen.	25
<i>Tabelle 3:</i> Verwendete Antiseren.	38
<i>Tabelle 4:</i> Proteinkonjugate zur Antikörperaufreinigung.	38
<i>Tabelle 5:</i> Verwendete Chemikalien und Reagenzien.	39
<i>Tabelle 6:</i> Verwendete Verbrauchsmaterialien.	41
<i>Tabelle 7:</i> Verwendete Kits.	41
<i>Tabelle 8:</i> Verwendete Puffer und Lösungen.	42
<i>Tabelle 9:</i> Verwendete Geräte.	44
<i>Tabelle 10:</i> Verwendete Software.	45
<i>Tabelle 11:</i> Abfolge der Wasch- und Blockierungsschritte nach der Kopplung der Proteinkonjugate auf das Sepharosematerial.	47
<i>Tabelle 12:</i> Verwendete Acylierungsreagenzien für die Acylierung von Catecholaminen.	54
<i>Tabelle 13:</i> Konzentrationen der für die Assaykalibrierung verwendeten Standards in ng/mL.	65
<i>Tabelle 14:</i> In den Validierungs- und Qualitätskontrollen eingesetzte finale Konzentrationen der Analyten im <i>gespikten</i> Urin.	66
<i>Tabelle 15:</i> Konzentrationen der zur Bestimmung des ULOQ eingesetzten zusätzlichen Standards F1 und F2.	67
<i>Tabelle 16:</i> <i>Gespikte</i> Konzentration der Analyten im Urin für die Bestimmung der Verdünnungslinearität.	68
<i>Tabelle 17:</i> Aufreinigungsstrategien für die Aufreinigung spezifischer Antikörper aus den polyklonalen Kaninchen-Antiseren.	81
<i>Tabelle 18:</i> Ergebnisse der Proteinbestimmung für die Gesamt-Eluate.	83
<i>Tabelle 19:</i> Hintergrundsignale bei der Verwendung verschiedener Acylierungsreagenzien im multiplexen Assay.	89
<i>Tabelle 20:</i> Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin in Urinproben von gesunden Spendern sowie in synthetisch hergestelltem Urin zur Identifizierung einer geeigneten Urinprobe für die Generierung von Qualitätskontrollen.	97
<i>Tabelle 21:</i> Wiederfindungsrate in den <i>gespikten</i> Urinproben.	99
<i>Tabelle 22:</i> Ergebnisse der Kurvenanpassung für die Catecholamine.	101
<i>Tabelle 23:</i> Ergebnisse der Kurvenanpassung für die Metanephrine und Serotonin.	102

<i>Tabelle 24:</i> Untere Nachweisgrenze (LOD) für die Catecholamine, Metanephrine und Serotonin im multiplexen Immunoassay.	103
<i>Tabelle 25:</i> Untere Bestimmungsgrenze (LLOQ) für die Catecholamine, Metanephrine und Serotonin im multiplexen Immunoassay.	105
<i>Tabelle 26:</i> Obere Bestimmungsgrenze (ULOQ) für die Catecholamine, Metanephrine und Serotonin im multiplexen Immunoassay.	106
<i>Tabelle 27:</i> Obere Bestimmungsgrenze (ULOQ) für den Dopamin-, Adrenalin- und 3-Methoxytyramin-Assay.	107
<i>Tabelle 28:</i> Dynamischer Bereich für die einzelnen Analyten im multiplexen Immunoassay.	108
<i>Tabelle 29:</i> Intraassay-Präzision im multiplexen Immunoassay.	108
<i>Tabelle 30:</i> Interassay-Präzision im multiplexen Immunoassay.	109
<i>Tabelle 31:</i> Verdünnungslinearität der einzelnen Analyten im multiplexen Catecholamin-Assay.	110
<i>Tabelle 32:</i> Verdünnungslinearität der einzelnen Analyten im multiplexen Metanephrin/Serotonin-Assay.	111
<i>Tabelle 33:</i> Kreuzreaktivität der Antikörper in % zu strukturell ähnlichen Substanzen.	113
<i>Tabelle 34:</i> Ermittlung der Kurzzeitstabilität und der Stabilität gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen für die Catecholamine im multiplexen Immunoassay.	115
<i>Tabelle 35:</i> Ermittlung der Kurzzeitstabilität und der Stabilität gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen für die Metanephrine und Serotonin im multiplexen Immunoassay.	116
<i>Tabelle 36:</i> Wiederfindungsrate in % für die Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin aus <i>Dry Urine Test</i> -Filterkarten.	118
<i>Tabelle 37:</i> Korrelationskoeffizienten nach Spearman und Pearson sowie die Ergebnisse der linearen Regression für den Vergleich zwischen multiplexem Immunoassay, kompetitivem ELISA und den HPLC-Messungen des Universitätsklinikums in Tübingen.	125
<i>Tabelle 38:</i> Patienten mit einer höheren (>) oder niedrigeren (<) Konzentration der Analyten im Urin als der Mittelwert der Konzentration $\pm 3x$ SD bei gesunden Spendern.	138
<i>Tabelle 39:</i> p-Werte für den Vergleich der Analytkonzentrationen bei Patienten mit einer Nierenerkrankung und gesunden Probanden.	141
<i>Tabelle 40:</i> p-Werte für den Vergleich zwischen normaler und fettreicher Kost für die beiden Adrenozeptor-Knockout-Stämme sowie den Wildtyp-Stamm.	146
<i>Tabelle 41:</i> p-Werte für den Vergleich zwischen den drei Mausstämmen für die Ernährung mit normaler oder fettreicher Kost.	147
<i>Tabelle 42:</i> Finale Parameter für den multiplexen Catecholamin- und Metanephrin/Serotonin-Immunoassay.	159
<i>Tabelle 43:</i> Konzentration der Catecholamine, Metanephrine und Serotonin im Plasma und im Urin von gesunden Personen.	161
<i>Tabelle 44:</i> Vergleich der Grenzen der multiplexen Immunoassays mit den Grenzen der LDN ELISAs.	166
<i>Tabelle 45:</i> Ergebnisse der Proteinbestimmung nach Bradford für die Eluate der Antikörperaufreinigung.	193

<i>Tabelle 46:</i> Kreuzreaktivität in % im Catecholamin-Assay.....	193
<i>Tabelle 47:</i> Messergebnisse für die einzelnen Methoden des Vergleichs zwischen multiplexem Catecholamin-Immunoassay, ELISA und HPLC in den Referenz-Urinproben aus dem Zentrallabor des Universitätsklinikums in Tübingen.....	194
<i>Tabelle 48:</i> Messergebnisse für die einzelnen Methoden des Vergleichs zwischen multiplexem Metanephrin/Serotonin-Immunoassay, ELISA und HPLC in den Referenz-Urinproben aus dem Zentrallabor des Universitätsklinikums in Tübingen.....	195

IV Abkürzungsverzeichnis

α	anti
AK	Antikörper
AU	willkürliche Einheiten (<i>arbitrary units</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CV	Variationskoeffizient (<i>coefficient of variation</i>)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dk- α -rb-PE	Esel-anti-Kaninchen-Antikörper markiert mit Phycoerythrin (<i>donkey-anti-rabbit-PE</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOMA	3,4-Dihydroxymandelsäure
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
DOPAL	3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd
DOPEG	3,4-Dihydroxyphenylglycol
DSM-V	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i> , Auflage 5
DUT	<i>Dry Urine Test</i>
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
et al.	et alii
Fc	<i>fragment, crystallizable</i>
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FSGS	fokal segmentale Glomerulosklerose
g	Erdbeschleunigung
GIT	Gastrointestinaltrakt
GN	Glomerulonephritis
GTP	Guanosintriphosphat
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)

HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
5-HT	5-Hydroxytryptamin
ICD-10	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i> , Ausgabe 10
IgG	Immunglobulin G
k. A.	keine Angabe
KLH	Schlitzschnecken-Hämocyanin (<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>)
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LOD	untere Nachweisgrenze (<i>lower limit of detection</i>)
LLOQ	untere Bestimmungsgrenze (<i>lower limit of quantification</i>)
MAO-A	Monoaminoxidase-A
MAO-B	Monoaminoxidase-B
MB-COMT	membrangebundene (<i>membrane-bound</i>) COMT
MDC	geringste nachweisbare Konzentration (<i>minimum detectable concentration</i>)
MEN	Multiple endokrine Neoplasie
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MFI	<i>Median fluorescence intensity</i>
MN	Metanephrin
MOPEG	3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol
3-MT	3-Methoxytyramin
MW	Molekulargewicht
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMN	Normetanephrin
NP	Nephropathie
Ova	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PE	Phycoerythrin
PG	Prüfgröße
RIA	Radioimmunoassay
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SERO	Serotonin
S-COMT	lösliche (<i>soluble</i>) COMT

TG	Thyroglobulin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
ULOQ	obere Bestimmungsgrenze (<i>upper limit of quantification</i>)
VG	Vergleichsgröße
WFR	Wiederfindungsrate
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Biogene Amine

Biogene Amine werden im Stoffwechsel von Menschen, Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen durch enzymatische Decarboxylierung von Aminosäuren gebildet. Demnach sind biogene Amine Substanzen mit einer oder mehreren Aminogruppen und reagieren daher als Protonenakzeptoren basisch. Sie übernehmen dabei vielfältige und wichtige Funktionen im Organismus. Zum einen können biogene Amine selbst physiologische Wirkungen entfalten, indem sie als Hormone oder Neurotransmitter fungieren. Wichtige Neurotransmitter sind hierbei die aus der Aminosäure Tyrosin gebildeten biogenen Amine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin sowie die aus der Aminosäure Glutaminsäure gebildete γ -Aminobuttersäure. Des Weiteren dienen biogene Amine als Bausteine für die Synthese von verschiedenen Vitaminen, Coenzymen und Phospholipiden. Beispielsweise sind β -Alanin und Cysteamin Bestandteile von Coenzym A, Ethanolamin dient als Baustein für Phospholipide und Aminopropanol ist in Vitamin B₁₂ enthalten. Ebenso können Polyamine, die aus den Aminosäuren Arginin und Ornithin gebildet werden, zu den biogenen Aminen gezählt werden. Aufgrund ihrer stark positiven Ladung können Polyamine mit Molekülen mit negativer Ladung, wie DNA und RNA, Proteinen und Phospholipidmembranen, interagieren. Sie übernehmen dabei verschiedene Funktionen im Stoffwechsel und sind bei der Synthese anderer Makromoleküle oder der Zellproliferation sowie Genregulation beteiligt [1]. So sind die Polyamine Spermidin, Spermin und Putrescin an der Chromatin-Kondensation, dem Erhalt der DNA Struktur, der RNA-Prozessierung, der Translation sowie der Aktivierung von Proteinen beteiligt [2].

Es wird zudem zwischen endogenen und exogenen biogenen Aminen differenziert. Endogene biogene Amine werden im Organismus in verschiedenen Geweben selbst gebildet und entfalten dort lokal, über das Nervensystem oder das Blutsystem ihre Wirkung. Exogene biogene Amine hingegen werden von außen mit der Nahrung aufgenommen und über die Darmschleimhaut resorbiert. Mit Ausnahme der Polyamine, die aus Arginin und Ornithin in allen proliferierenden Zelltypen gebildet werden, werden die meisten biogenen Amine nur von speziellen Zelltypen gebildet, beispielsweise wird Histamin vorwiegend in Mastzellen gebildet, Adrenalin in adrenergen Neuronen und den

chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks und Serotonin hauptsächlich in den enterochromaffinen Zellen der Darmschleimhaut.

Biogene Amine und Polyamine spielen ebenfalls bei vielen Erkrankungen eine Rolle, wie beispielsweise bei der Karzinogenese und Tumorinvasion, bei neurologischen Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer, Depressionen und Schizophrenie sowie bei Allergien [3]. In Nahrungsmitteln enthaltene biogene Amine können bei Personen, bei denen eine Überempfindlichkeit gegenüber bestimmten biogenen Aminen vorliegt, nicht selten zu starken allergischen Reaktionen führen.

Einige der wichtigsten biogenen Amine sind in Tabelle 1 gelistet.

Tabelle 1: Übersicht über einige der wichtigsten biogenen Amine.

Biogenes Amin	entsteht aus der Aminosäure	biologische Bedeutung
Adrenalin	Tyrosin	Hormon, Neurotransmitter
β -Alanin	Asparaginsäure	Baustein von Coenzym A
γ -Aminobuttersäure	Glutaminsäure	Neurotransmitter
Cysteamin	Cystein	Baustein von Coenzym A
Dopamin	Tyrosin	Neurotransmitter
Ethanolamin	Serin	Baustein von Phospholipiden
Histamin	Histidin	Gewebshormon
Noradrenalin	Tyrosin	Neurotransmitter
Putrescin	Ornithin	beteiligt an Zellproliferation und Genregulation
Serotonin	Tryptophan	Neurotransmitter, Gewebshormon
Spermidin	Ornithin	beteiligt an Zellproliferation und Genregulation

Im Folgenden wird auf die Catecholamine Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin, ihre Abbauprodukte Metanephrin, Normetanephrin und 3-Methoxytyramin sowie auf Serotonin näher eingegangen, da für diese biogenen Amine im Rahmen der vorliegenden Arbeit Immunoassays entwickelt wurden.

1.1.1 Catecholamine und Metanephrine

Catecholamine sind biogene Amine, die eine gemeinsame Grundstruktur bestehend aus 1,2-Dihydroxybenzol und einer Aminogruppe aufweisen. Ihr Name leitet sich von dem Trivialnamen ihrer gemeinsamen 1,2-Dihydroxybenzol-Struktur, dem Brenzcatechin, im Englischen *catechol* genannt, ab. Die wichtigsten Catecholamine beim Menschen sind Dopamin, L-Noradrenalin und L-Adrenalin, die alle aus der Aminosäure L-Tyrosin gebildet werden und bis auf Dopamin, welches achiral ist, nur in der L-Form vorliegen. Sie wirken als Hormone und Neurotransmitter im Zentralnervensystem sowie auch im peripheren Nervensystem. Ihre vielfältigen Wirkungen entfalten sie durch Bindung an Adrenozeptoren beziehungsweise Dopaminrezeptoren, die alle zur Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören. Zudem gibt es zahlreiche künstlich hergestellte Catecholamine, die als Pharmaka auf noradrenerge und adrenerge Systeme wirken, wie beispielsweise Isoprenalin, ein β -Adrenozeptor-Agonist. Metanephrine sind die Abbauprodukte der Catecholamine und werden entweder über den Urin ausgeschieden oder im Körper weiter abgebaut. Metanephrine sind inaktive Metaboliten und besitzen daher keine hormonelle Wirkung mehr und können auch nicht mehr als Neurotransmitter wirken. Abbildung 1 zeigt die Strukturformeln von Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin.

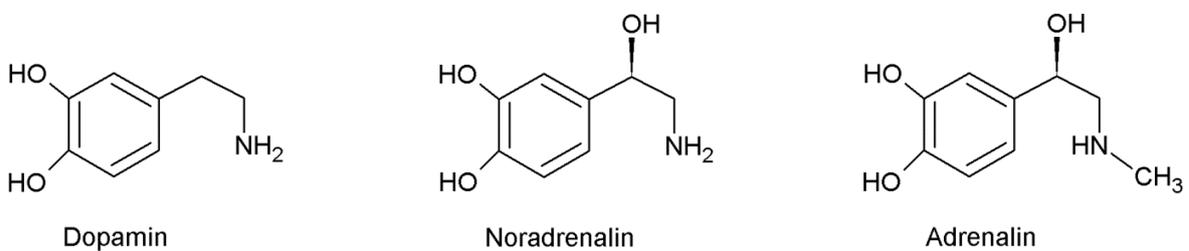


Abbildung 1: Strukturformeln der Catecholamine. Strukturformeln für die drei wichtigsten Catecholamine beim Menschen, Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin.

Biosynthese und Abbau der Catecholamine

Dopamin, L-Noradrenalin und L-Adrenalin werden aus der Aminosäure L-Tyrosin synthetisiert, wobei zunächst L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA), daraus Dopamin, dann Noradrenalin und zuletzt Adrenalin entsteht. Die Biosynthese erfolgt in den Axonendigungen, die Methylierung von Noradrenalin zu Adrenalin vorwiegend im Nebennierenmark [4].

Den Ausgangsstoff Tyrosin nehmen die Nervenzellen aus dem Extrazellulärraum auf, können es jedoch auch aus der Aminosäure Phenylalanin mit Hilfe des Enzyms Phenylalaninhydroxylase bilden. Tyrosin wird zunächst durch das Enzym Tyrosinhydroxylase zu 3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) oxidiert. Dies ist zugleich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Biosynthese der Catecholamine und die Aktivität der Tyrosinhydroxylase wird durch zahlreiche Mechanismen reguliert [5]. Das Enzym kommt nur in den catecholaminergen Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems sowie in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks vor [6, 7]. Den nächsten Schritt katalysiert die Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase, auch als DOPA-Decarboxylase bezeichnet, die L-DOPA zu Dopamin decarboxyliert. Die DOPA-Decarboxylase ist im Gegensatz zur Tyrosinhydroxylase weit im Körper verbreitet und katalysiert auch die Decarboxylierung anderer aromatischer Aminosäuren. Dopamin wird anschließend mit Hilfe des Vesikulären Monoamintransporters (VMAT) in die synaptischen Vesikel transportiert, wo die weitere Biosynthese der Catecholamine erfolgt [5]. Dort wird Dopamin durch das Enzym Dopamin- β -Hydroxylase zu Noradrenalin oxidiert. Zudem kann diese Reaktion auch im Nebennierenmark erfolgen. Den letzten Schritt katalysiert die Phenylethanolamin-N-Methyltransferase, hierbei wird Noradrenalin zu Adrenalin methyliert. Dieses Enzym kommt vorwiegend in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks vor, ist jedoch auch im Nervensystem, im Hirnstamm, in der Retina sowie im Herzen zu finden [4]. Aktionspotentiale bewirken dann eine Freisetzung der Catecholamine aus den Vesikeln durch Exozytose. Abbildung 2 zeigt die Biosynthese der Catecholamine aus der Aminosäure Tyrosin.

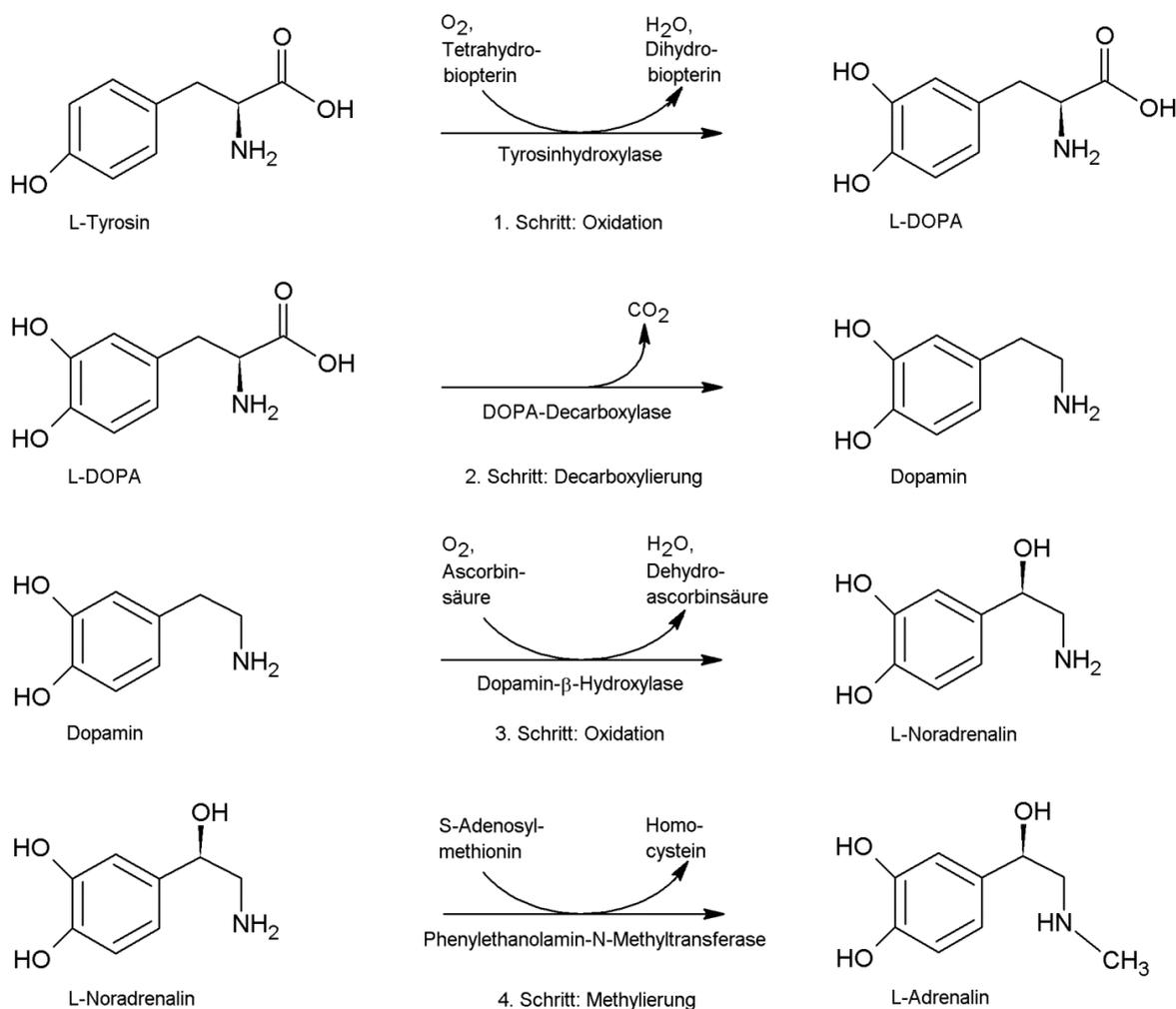


Abbildung 2: Biosynthese der Catecholamine. Im ersten Schritt wird die Aminosäure L-Tyrosin durch das Enzym Tyrosinhydroxylase zu L-DOPA oxidiert. Für diese Reaktion wird der Cofaktor Tetrahydrobiopterin benötigt. Anschließend wird L-DOPA zu Dopamin decarboxyliert. Diese Reaktion wird durch das Enzym DOPA-Decarboxylase katalysiert. Die Dopamin- β -Hydroxylase katalysiert anschließend die Oxidation von Dopamin zu L-Noradrenalin, hierfür wird als Cofaktor Ascorbinsäure benötigt. Im letzten Schritt wandelt die Phenylethanolamin-N-Methyltransferase L-Noradrenalin zu L-Adrenalin um, wobei S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonor fungiert.

Freigesetztes Noradrenalin und Adrenalin müssen anschließend wieder inaktiviert werden. 90 % der beiden Neurotransmitter werden durch einen aktiven Transportmechanismus wieder in das Axoplasma aufgenommen [8]. Dort kann eine Wiederaufnahme in die Speichervesikel oder die Metabolisierung erfolgen. Eine geringere Bedeutung kommt der Aufnahme und Inaktivierung der Neurotransmitter durch benachbarte Zellen wie zum Beispiel glatte Muskelzellen zu, in welchen stets eine Metabolisierung erfolgt.

Die beiden wichtigsten Enzyme beim Abbau von Noradrenalin und Adrenalin sind die Monoaminoxidase-A (MAO-A) sowie die Catechol-O-Methyltransferase (COMT). In catecholaminergen Axonendigungen kommt nur die MAO-A vor, während der Abbau in

dopaminergen Neuronen von der MAO-B katalysiert wird. Von der COMT gibt es zwei Isoformen, die lösliche, cytoplasmatische Form (S-COMT) sowie die membrangebundene Form (MB-COMT). Die S-COMT wird hauptsächlich in peripheren Geweben wie der Leber sowie in Gliazellen exprimiert, die MB-COMT dagegen im Zentralnervensystem [9, 10]. Die Monoaminoxidase-A katalysiert die oxidative Desaminierung von Noradrenalin und Adrenalin zu 3,4-Dihydroxyphenylglycolaldehyd, welcher durch die Aldehyd-Reduktase zu 3,4-Dihydroxyphenylglycol (DOPEG) oder durch die Aldehyd-Dehydrogenase zu 3,4-Dihydroxymandelsäure (DOMA) abgebaut wird. Die Catechol-O-Methyltransferase kann dann anschließend die 3,4-Dihydroxymandelsäure zur 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure, der Vanillinmandelsäure, sowie das 3,4-Dihydroxyphenylglycol zum 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MOPEG) methylieren. Dieser Abbauweg ist der vorherrschende Abbauweg in den catecholaminergen Axonendigungen. Ein anderer Abbau beginnt mit der Methylierung von Noradrenalin zu Normetanephrin beziehungsweise von Adrenalin zu Metanephrin, die ebenfalls von der COMT katalysiert wird. Normetanephrin und Metanephrin können anschließend ebenfalls durch die MAO-A und die Aldehyd-Dehydrogenase bzw. -Reduktase zu Vanillinmandelsäure bzw. MOPEG abgebaut werden. Dieser Abbauweg spielt sich vorwiegend in den Nachbarzellen, wie glatten Muskelzellen oder Gliazellen ab. Im Urin werden dann hauptsächlich die Metaboliten Vanillinmandelsäure und MOPEG ausgeschieden, des Weiteren werden aber auch Metanephrin und Normetanephrin direkt im Urin ausgeschieden, entweder frei oder konjugiert mit Schwefelsäure oder Glucuronsäure.

Die Inaktivierung von Dopamin erfolgt ebenfalls durch Wiederaufnahme in das Axoplasma, wo eine erneute Speicherung in Vesikeln oder eine Metabolisierung erfolgen kann. Auch benachbarte Gliazellen können Dopamin aufnehmen, hier erfolgt dann ausschließlich eine Metabolisierung von Dopamin. Der Abbau von Dopamin erfolgt ebenfalls durch die COMT, die Monoaminoxidase, die Aldehyd-Dehydrogenase und -Reduktase sowie durch die Alkohol-Dehydrogenase [10], wobei hier jedoch die MAO-B für die oxidative Desaminierung von Dopamin zuständig ist. Über die MAO-B entsteht aus Dopamin zunächst 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd (DOPAL), welcher dann durch die Aldehyd-Dehydrogenase zur 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) und anschließend durch die COMT zur Homovanillinsäure metabolisiert wird. Dieser Abbauweg findet vorwiegend in den dopaminergen Axonendigungen statt. Ein alternativer Abbauweg startet mit der Methylierung von Dopamin durch die COMT zu 3-Methoxytyramin, welches anschließend durch die MAO-B sowie die Aldehyd-Dehydrogenase ebenfalls zur Homovanillinsäure abgebaut wird. Dieser alternative Abbauweg spielt besonders in benachbarten Gliazellen eine Rolle. Hauptendprodukte

des Abbaus von Dopamin sind Homovanillinsäure und DOPAC, diese werden, zum Teil auch als Konjugate mit Schwefelsäure oder Glucuronsäure, über den Urin ausgeschieden [10]. In Abbildung 3 ist der Abbau von Noradrenalin und Adrenalin dargestellt, Abbildung 4 zeigt den Abbau von Dopamin. In den beiden Abbildungen sind jeweils die Analyten grau umrandet, für welche im Rahmen dieser Arbeit Immunoassays entwickelt wurden.

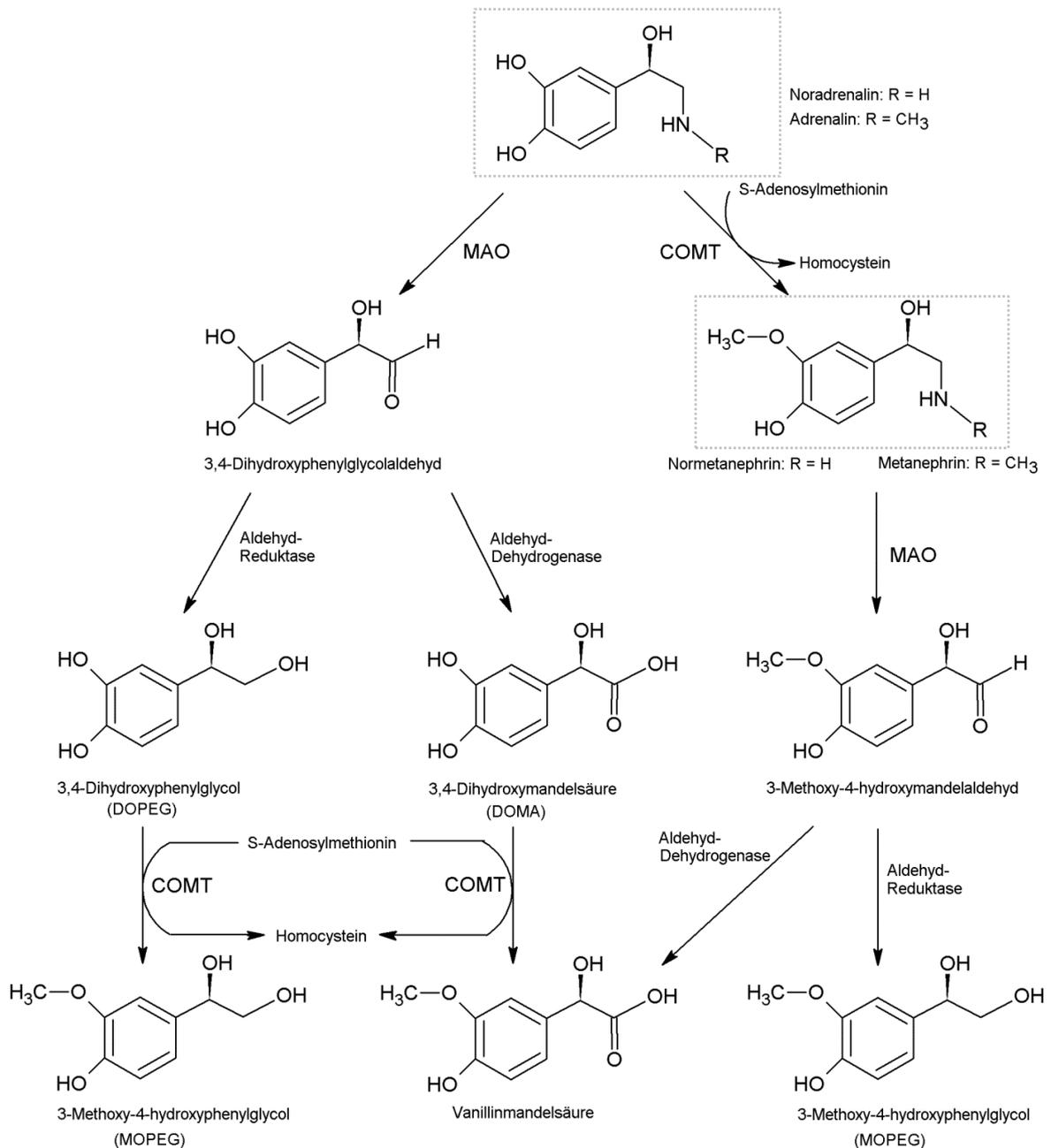


Abbildung 3: Abbau der Catecholamine. Noradrenalin und Adrenalin können durch zwei verschiedene Enzyme, die Monoaminoxidase-A (MAO-A) sowie die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) abgebaut werden. Als Endprodukte des Abbaus entstehen 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MOPEG) sowie Vanillinmandelsäure, die über den Urin ausgeschieden werden. Ebenfalls im Urin zu finden sind Normetanephrin und Metanephrin, die durch Methylierung von Noradrenalin und Adrenalin durch die COMT gebildet werden. Für die grau umrandeten Analyten wurden im Rahmen dieser Arbeit Immunoassays entwickelt.

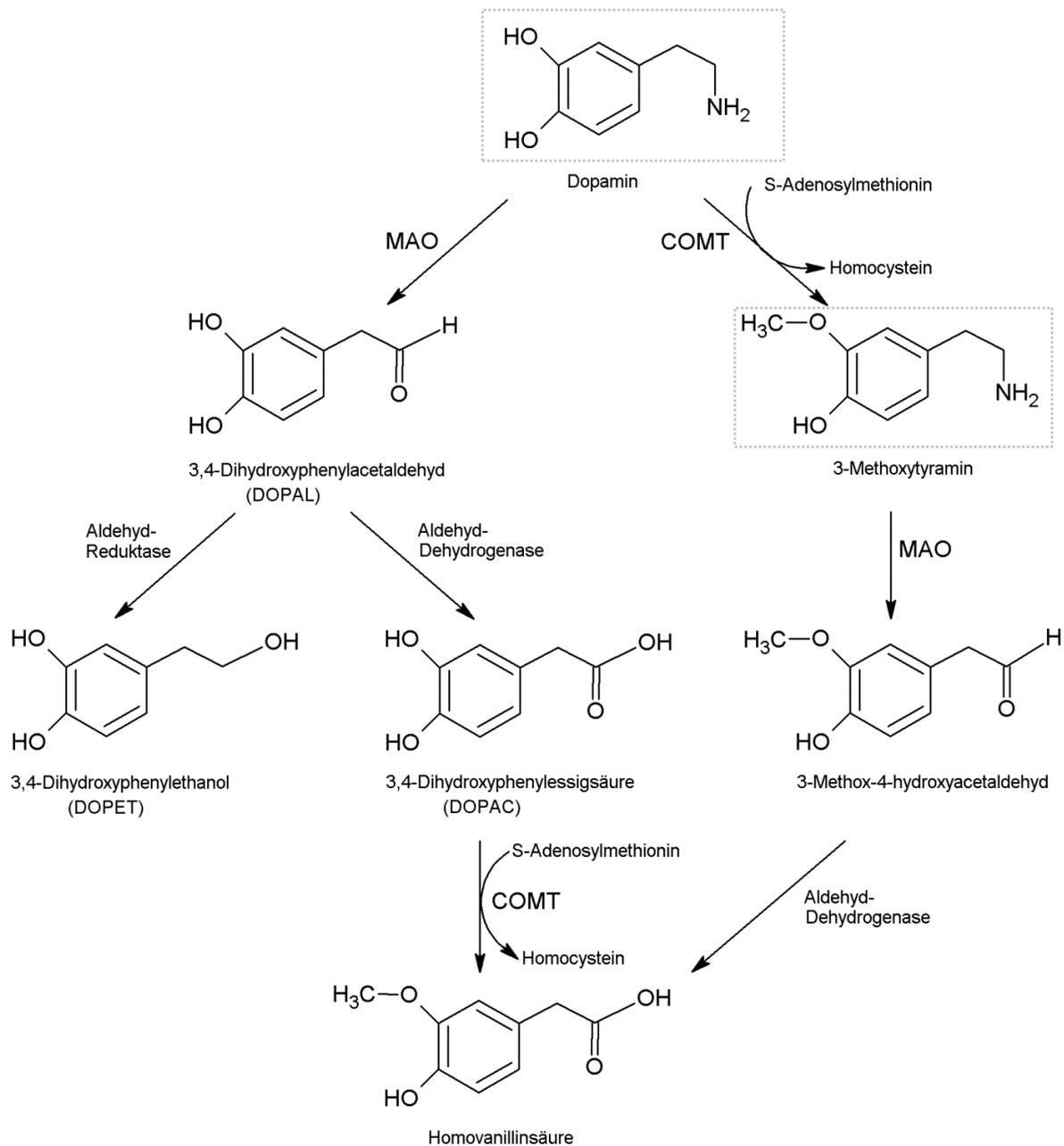


Abbildung 4: Abbau von Dopamin. Dopamin kann durch zwei verschiedene Enzyme, die Monoaminoxidase-B (MAO-B) sowie die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) abgebaut werden. Als Endprodukte des Abbaus entstehen 3,4-Dihydroxyphenylethanol (DOPET) und Homovanillinsäure. Bei der Methylierung von Dopamin durch die COMT entsteht 3-Methoxytyramin, welches durch die MAO-B und die Aldehyd-Dehydrogenase ebenfalls zu Homovanillinsäure abgebaut werden kann. Für die grau umrandeten Analyten wurden im Rahmen dieser Arbeit Immunoassays entwickelt.

Wirkungen von Catecholaminen und Metanephrinen

Noradrenalin ist einer der wichtigsten Neurotransmitter im Zentralnervensystem, die meisten Zellkörper liegen im Locus coeruleus. Ebenso wirkt Noradrenalin als Transmitter in den postganglionär-sympathischen Neuronen. In der Nebenniere gebildet, kann es in die Blutbahn abgegeben werden und dort als Hormon wirken. Als Stresshormon, das an der sogenannten *fight-or-flight*-Reaktion beteiligt ist, wirkt Noradrenalin im Gehirn und am Herzen und beeinflusst das Herz-Kreislauf-System. Es führt zur Erhöhung von Herzfrequenz, von systolischem und diastolischem Blutdruck durch Vasokonstriktion, zur Bereitstellung von Glucose und zur vermehrten Blutzufuhr zur Skelettmuskulatur. Darüber hinaus ist Noradrenalin an der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt [11]. Seine Wirkung entfaltet Noradrenalin durch Bindung an Adrenozeptoren, die zur Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören. Dabei bindet Noradrenalin an α_1 - und α_2 - sowie an β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren, wobei es auf den β_2 -Rezeptor eine schwächere Wirkung ausübt als auf die anderen drei Rezeptoren [8]. α_1 -Adrenozeptoren findet man vorwiegend auf glatten Muskelzellen, wo sie deren Kontraktion vermitteln, z.B. auf Blutgefäßen und im Gastrointestinaltrakt. α_2 -Adrenozeptoren können auch eine Vasokonstriktion vermitteln, viel wichtiger ist jedoch ihre inhibitorische Funktion. Über einen negativen Feedback-Mechanismus kommt es zur Hemmung der weiteren Transmitterfreisetzung aus noradrenergen sowie anderen Neuronen. β -Adrenozeptoren sind die wichtigsten Adrenozeptoren des Herzens. Vor allem die Aktivierung von β_1 -Adrenozeptoren führt zu einer positiv chronotropen, positiv inotropen, positiv dromotropen und positiv lusitropen Wirkung. Eine Aktivierung von β_2 -Adrenozeptoren führt unter anderem zur Vasodilatation an Herzkranzgefäßen und Gefäßen der Skelettmuskulatur, einer Relaxation der Bronchien sowie zur Glykogenolyse und Lipolyse. Darüber hinaus gibt es β_3 -Adrenozeptoren, deren Aktivierung unter anderem zur Lipolyse und Thermogenese im Fettgewebe führt [12].

Im Gegensatz zu Noradrenalin überwiegt bei Adrenalin die Funktion als Hormon. Es ist ein im Nebennierenmark gebildetes Stresshormon, welches in die Blutbahn ausgeschüttet wird und ebenfalls an der *fight-or-flight*-Reaktion beteiligt ist und dabei für die schnelle Bereitstellung von Energiereserven sorgt. Es führt zur Steigerung von Herzfrequenz und Blutdruck, bewirkt eine Freisetzung von Energiereserven durch Glykogenolyse und Lipolyse, vermittelt eine Bronchodilatation und führt zu einer Kontraktion der Gefäße der Haut, der Schleimhäute und des Gastrointestinaltrakts [13]. Als Neurotransmitter wirkt Adrenalin nur im Zentralnervensystem. Hier kommen adrenerge Neurone fast ausschließlich in der Medulla oblongata vor [8]. Auch Adrenalin entfaltet seine Wirkung

durch Bindung an α_1 - und α_2 - sowie an β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren. Im Gegensatz zu Noradrenalin hat Adrenalin eine starke Wirkung auf β_2 -Adrenozeptoren, die in den Blutgefäßen der Skelettmuskulatur enthalten sind und durch Aktivierung zu einer Gefäßdilatation führen [8]. Abbildung 5 zeigt die wichtigsten, über Adrenozeptoren vermittelten Wirkungen von Noradrenalin und Adrenalin.

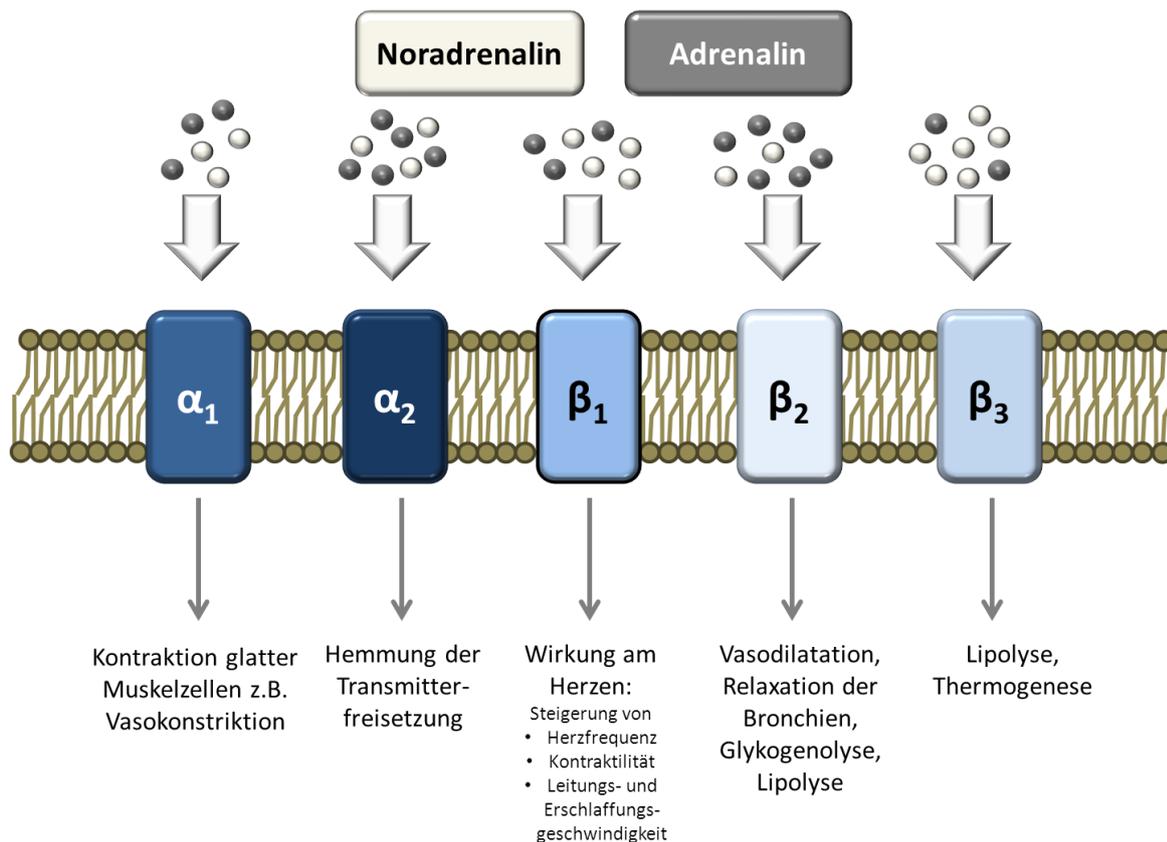


Abbildung 5: Über Adrenozeptoren vermittelte Wirkungen von Noradrenalin und Adrenalin. Adrenozeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und kommen sowohl im Zentralnervensystem als auch in der Peripherie vor. Durch Aktivierung der Rezeptoren durch Noradrenalin oder Adrenalin kommt es je nach Rezeptorsubtyp zu unterschiedlichen Reaktionen am Erfolgsorgan bzw. im Gesamtorganismus.

Metanephrin und Normetanephrin, die durch die COMT gebildeten Abbauprodukte von Adrenalin bzw. Noradrenalin, sind hingegen inaktive Metaboliten und haben keine Funktion als Hormon oder Neurotransmitter.

Dopamin ist ein wichtiger Neurotransmitter im Zentralnervensystem, die dopaminergen Nervenzellkörper liegen hauptsächlich im Mittel- und Zwischenhirn. Dopamin wirkt zwar auch auf Adrenozeptoren, stärker jedoch auf Dopaminrezeptoren. Es gibt fünf Dopaminrezeptoren, D_1 bis D_5 , die ebenfalls zur Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören. D_1 -Rezeptoren auf glatten Muskelzellen von Nieren- und

Darmblutgefäßen vermitteln eine Vasodilatation und damit eine vermehrte Durchblutung von Niere und Darm. Über Bindung an D₂-Rezeptoren kann Dopamin die Prolactinfreisetzung hemmen und Erbrechen auslösen. Die Dopaminrezeptoren D₃ bis D₅ kommen weit weniger häufig vor als die D₁- und D₂-Rezeptoren und sind vor allem im Zentralnervensystem zu finden.

3-Methoxytyramin, das durch die COMT gebildete Abbauprodukt von Dopamin, wurde bisher ebenfalls als inaktiver Metabolit ohne eigene Funktion betrachtet, jedoch beschrieben Sotnikova et al. eine Funktion von 3-Methoxytyramin als Neuromodulator [14].

1.1.2 Serotonin

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ist sowohl als Neurotransmitter als auch als Gewebshormon wirksam und kommt im Zentralnervensystem sowie peripher in den enterochromaffinen Zellen und Thrombozyten vor. Der größte Teil des Serotonins (ca. 95 %) befindet sich im Magen-Darm-Trakt. Davon befinden sich ca. 90 % in den enterochromaffinen Zellen der Darmmucosa, wo es vesikulär gespeichert und sowohl auf der luminalen als auch basolateralen Seite freigesetzt werden kann [8]. Die restlichen 10 % befinden sich in den Neuronen des enterischen Nervensystems [15]. Das Serotonin der Thrombozyten stammt ebenfalls aus den enterochromaffinen Zellen, sie nehmen es bei der Passage durch die intestinalen Blutgefäße auf [8]. Der Name Serotonin rührt von seiner regulierenden Wirkung auf den Blutdruck her: als Komponente des **Serums** reguliert es den **Tonus** der Blutgefäße und wirkt dabei als Vasokonstriktor [16].

Biosynthese und Abbau von Serotonin

Serotonin wird aus der Aminosäure L-Tryptophan gebildet. Die Biosynthese erfolgt hauptsächlich in den enterochromaffinen Zellen der Darmschleimhaut, des Weiteren aber auch im Zentralnervensystem, da das in den enterochromaffinen Zellen produzierte Serotonin nicht ZNS-gängig ist. Tryptophan wird zunächst durch die cytoplasmatische Tryptophanhydroxylase zu 5-Hydroxytryptophan oxidiert. Da Tryptophan zu den essentiellen Aminosäuren gehört, limitiert die Verfügbarkeit von Tryptophan die Geschwindigkeit der Biosynthese von Serotonin. Anschließend wird durch die Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase 5-Hydroxytryptophan zu Serotonin decarboxyliert. Die Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase ist dabei dasselbe Enzym,

welches auch die Decarboxylierung bei der Catecholamin-Biosynthese katalysiert. Serotonin wird anschließend in Speichervesikeln gespeichert. In Abbildung 6 ist die Biosynthese von Serotonin dargestellt.

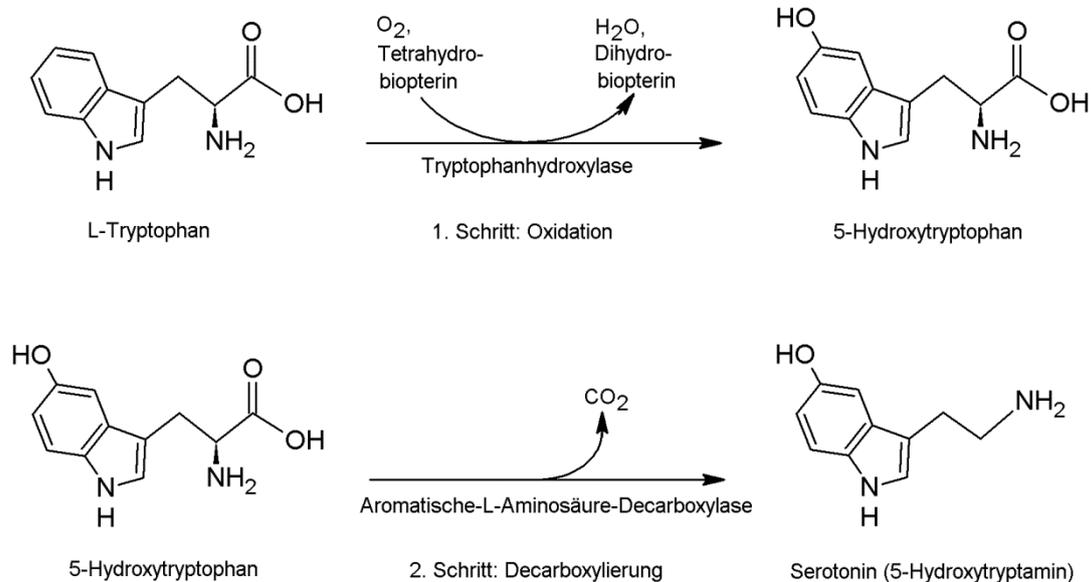


Abbildung 6: Biosynthese von Serotonin. Serotonin wird aus der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan gebildet. Im ersten Schritt wird L-Tryptophan durch das Enzym Tryptophanhydroxylase zu 5-Hydroxytryptophan oxidiert. Anschließend erfolgt eine Decarboxylierung zu Serotonin durch das Enzym Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (DOPA-Decarboxylase), welches auch die Decarboxylierung bei der Catecholamin-Biosynthese katalysiert.

Die Inaktivierung erfolgt durch Wiederaufnahme von Serotonin in die serotonerge Nervenendigung durch den Serotonin-Transporter (SERT), wo Serotonin erneut vesikulär gespeichert oder abgebaut wird. Dieser Transporter kommt auch in den Epithelzellen der Darmmucosa sowie in den Thrombozyten vor und sorgt für die Wiederaufnahme des aus enterochromaffinen Zellen freigesetzten Serotonins [17]. Serotonerge Neurone enthalten MAO-A und MAO-B, die den Abbau von Serotonin zu 5-Hydroxyindolacetaldehyd durch oxidative Desaminierung katalysieren, wobei der Abbau über die MAO-A überwiegt. Dieses Zwischenprodukt wird anschließend durch die Aldehyd-Dehydrogenase zur 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) oxidiert, dem Hauptendprodukt des Serotoninstoffwechsels. 5-HIAA kann dann über den Urin ausgeschieden werden. Serotonin bzw. seine Metaboliten können auch als Konjugate mit Schwefelsäure oder Glucuronsäure vorliegen. Abbildung 7 zeigt den Abbau von Serotonin zu 5-Hydroxyindolessigsäure.

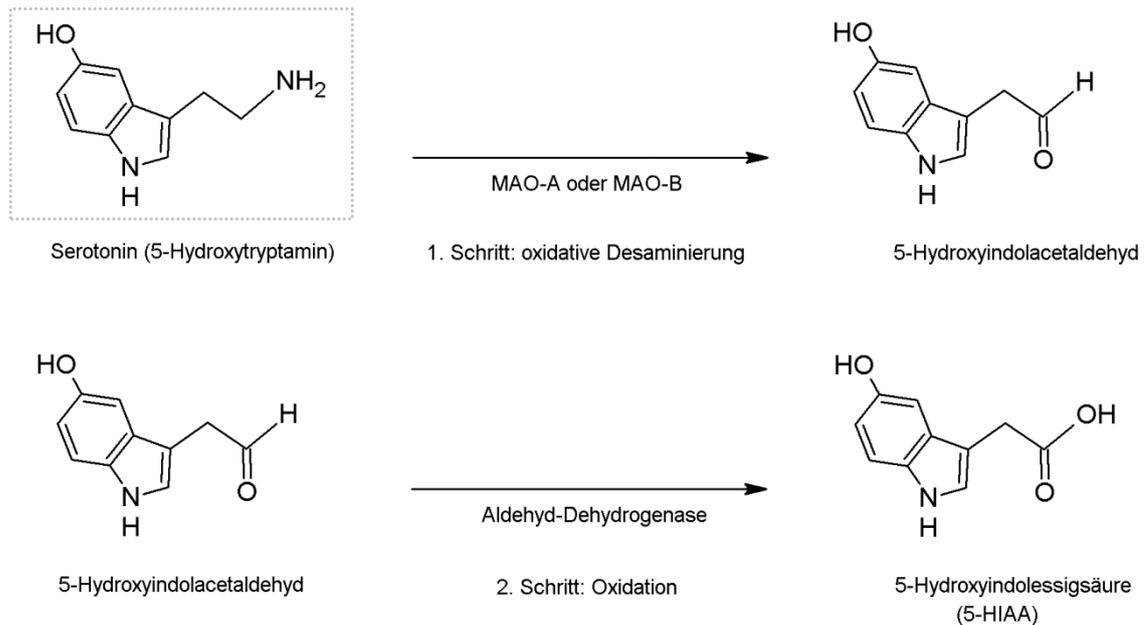


Abbildung 7: Abbau von Serotonin. Im ersten Schritt erfolgt eine oxidative Desaminierung von Serotonin zu 5-Hydroxyindolacetaldehyd durch die MAO-A oder MAO-B. Anschließend wird der Aldehyd durch die Aldehyd-Dehydrogenase zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) oxidiert. 5-HIAA ist das Hauptendprodukt des Serotoninstoffwechsels und wird über den Urin ausgeschieden. Für Serotonin (grau umrandet) wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Immunoassay entwickelt.

Wirkungen von Serotonin

Serotonin entfaltet seine vielfältigen Wirkungen über Serotonin-Rezeptoren, auch als 5-HT-Rezeptoren bezeichnet. Es gibt insgesamt 14 Subtypen, davon werden die meisten im ZNS exprimiert. Bei den meisten 5-HT-Rezeptoren handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren, es gibt jedoch auch den ionotropen 5-HT₃-Rezeptor, ein Ionenkanal für Natrium und Kalium [18]. Eine Rezeptor-unabhängige Wirkung von Serotonin beschrieben Walther et al.: durch die sogenannte Serotonylierung von kleinen GTPasen in Thrombozyten kann eine Freisetzung von verschiedenen Faktoren aus den α -Granula erfolgen [19].

Serotonin beeinflusst den Gastrointestinaltrakt sowie das Herz-Kreislauf-System und wirkt als Neurotransmitter im Zentralnervensystem.

Im Gastrointestinaltrakt ist Serotonin für motorische und sensorische Funktionen verantwortlich. Dabei kann zum einen Serotonin, das aus den enterochromaffinen Zellen freigesetzt wurde, verschiedene Wirkungen auf den Gastrointestinaltrakt ausüben und zum anderen kann Serotonin als Neurotransmitter im enterischen Nervensystem fungieren. Über die Bindung an den 5-HT_{1P}-Rezeptor steuert es die Peristaltik sowie sekretorische Reflexe im GIT [20]. Über 5-HT₃-Rezeptoren werden einerseits Signale an

das Zentralnervensystem weitergeleitet, andererseits kann über Bindung von Serotonin an diese Rezeptoren die Motilität des GIT gesteuert werden [20]. Ebenso ist der 5-HT₄-Rezeptor in die Regulation der Darmmotilität involviert [21]. In seiner sensorischen Funktion vermittelt im GIT freigesetztes Serotonin ebenfalls über den 5-HT₃-Rezeptor in Form eines Reflexes Übelkeit und Erbrechen [22].

Im Zentralnervensystem liegen die Zellkörper der serotonergen Neuronen in den Raphekernen des Hirnstamms. Von hier aus projizieren die Axone stark verzweigt in alle Regionen des Gehirns und ins Rückenmark und beeinflussen auf diese Weise viele verschiedene Gehirnfunktionen. Serotonin ist hier an der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus sowie der Thermoregulation beteiligt, beeinflusst das Schmerzempfinden, den Appetit und das Sexualverhalten [23]. Darüber hinaus übt Serotonin einen großen Einfluss auf die Stimmungslage aus, weshalb es oft im populärwissenschaftlichen Bereich auch als „Glückshormon“ bezeichnet wird [24-26].

Die Wirkungen von Serotonin auf das Herz-Kreislauf-System sind ebenfalls vielfältig. So wird beispielsweise an den Koronararterien durch Aktivierung von 5-HT_{2A}- und 5-HT_{1B}-Rezeptoren eine Vasokonstriktion vermittelt [8, 27]. Durch Bindung an die im rechten und linken Vorhof des Herzens vorkommenden 5-HT₄-Rezeptoren bewirkt Serotonin einen positiv chronotropen Effekt [27]. Serotonin kann auch eine Relaxation von Blutgefäßen bewirken, dies erfolgt über 5-HT₇-Rezeptoren [28, 29].

1.2 Biogene Amine und Erkrankungen

Da biogene Amine an vielen Funktionen im Organismus beteiligt sind, sind sie auch bei vielen Erkrankungen involviert. Diese reichen von Tumorerkrankungen über Erkrankungen des Nervensystems, Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems bis hin zu Stoffwechselerkrankungen. In den meisten Fällen gehen diese Erkrankungen mit einer Veränderung der Konzentration der biogenen Amine im Körper einher.

1.2.1 Erkrankungen mit Veränderung der Konzentration von Catecholaminen und Metanephrinen

1.2.1.1 Tumorerkrankungen

Phäochromozytom

Phäochromozytome sind seltene neuroendokrine Tumoren, die meistens aus den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks hervorgehen, seltener aus extraadrenalen Paraganglien, diese werden auch als Paragangliome bezeichnet. In den meisten Fällen sind Phäochromozytome benigne Tumoren, es gibt jedoch auch maligne Formen. Neben der sporadischen Form gibt es erbliche Formen des Phäochromozytoms, z. B. im Rahmen einer multiplen endokrinen Neoplasie (MEN) Typ 2, beim von-Hippel-Lindau-Syndrom sowie bei Patienten mit Neurofibromatose Typ 1 [30].

Diese Tumoren produzieren große Mengen der Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin, daher können im Blut und im Urin große Mengen der Catecholamine und ihrer Abbauprodukte Metanephrin, Normetanephrin und Vanillinmandelsäure nachgewiesen werden. Man unterscheidet hierbei Tumoren, die vorwiegend Noradrenalin (noradrenerger Phänotyp), Adrenalin (adrenerger Phänotyp) oder Dopamin (dopaminerges Phänotyp) produzieren [31]. Die vermehrte Produktion bzw. Sekretion von Catecholaminen basiert auf Mutationen, welche die Biosynthese oder die Freisetzung von Catecholaminen aus den Speichervesikeln beeinflussen. Manche Tumoren exprimieren vermehrt das Enzym Phenylethanolamin-N-Methyltransferase, welches Noradrenalin in Adrenalin umwandelt [32].

In anderen Tumoren betreffen die Mutationen Komponenten, die für die geregelte Freisetzung von Catecholaminen aus den sekretorischen Vesikeln verantwortlich sind. Eine verminderte Expression von Komponenten, welche die geregelte Freisetzung steuern sowie eine erhöhte Expression von Komponenten, die die spontane Freisetzung begünstigen führen dazu, dass Catecholamine spontan und unkontrolliert ins Blut sekretiert werden [33].

Bei Patienten mit einem Phäochromozytom treten zu Beginn unspezifische Symptome auf, die durch die starke Erhöhung der Catecholamine im Blut verursacht werden: schwere Hypertonie, Tachykardie, Kopfschmerzen, Schwitzen, Blässe der Haut sowie Schwindel. Die Hypertonie kann sowohl paroxysmal als auch persistierend sein [34]. Jedoch kann es auch vorkommen, dass bei manchen Patienten keine Hypertonie vorliegt, dies ist oft bei Patienten mit Dopamin-produzierenden Paragangliomen der Fall [35].

Aufgrund der wenig spezifischen Symptome und der Seltenheit werden Phäochromozytome meist erst spät bzw. zufällig im Rahmen anderer Untersuchungen entdeckt und sind dann häufig schon sehr stark gewachsen und haben bereits Metastasen gebildet. So vergeht meist zu viel Zeit zwischen dem Auftreten von unspezifischen Symptomen und der Diagnose des Phäochromozytoms.

Neuroblastom

Das Neuroblastom ist der häufigste, bereits im Kindesalter auftretende solide Tumor außerhalb des Gehirns. Es ist ebenfalls ein neuroendokriner Tumor, der vom autonomen Nervensystem, der embryonalen Neuralleiste, ausgeht und vor allem in der Nebenniere aber auch im Nervengewebe von Kopf-, Hals- und Nackenbereich sowie Brust- und Abdomenbereich entlang der Grenzstränge und in den Paraganglien vorkommt. Auch beim Neuroblastom sind die Symptome unspezifisch und je nach Lokalisation des Primärtumors unterschiedlich. In etwa 90 % aller Neuroblastome können erhöhte Konzentrationen an Catecholaminen und ihren Metaboliten Metanephrin, Normetanephrin und Vanillinmandelsäure, sowie auch Dopamin und Homovanillinsäure im Blut und im Urin detektiert werden [36]. Auf der Suche nach Früherkennungsmethoden für das Neuroblastom wurden im Rahmen des Neuroblastomscreenings bei Säuglingen im Alter von einem Jahr oder jünger in mehreren Studien die Konzentrationen von Vanillinmandelsäure und Homovanillinsäure im Urin bestimmt [37, 38]. Jedoch konnte durch das Screening von Neugeborenen keine Reduktion der Mortalität erreicht werden. Da sich Neuroblastome auch spontan zurückbilden können [39], wurde sogar eher ein gegenteiliger Effekt erzielt: Es wurden Kinder einer Behandlung unterzogen, deren Neuroblastom sich womöglich von selbst zurückgebildet hätte.

1.2.1.2 Erkrankungen des Nervensystems

Morbus Parkinson

Morbus Parkinson ist eine degenerative Erkrankung des extrapyramidal-motorischen Systems, die durch die Degeneration von Dopaminneuronen gekennzeichnet ist. Von diesem Degenerationsprozess sind die von der Substantia nigra compacta zum Corpus striatum ziehenden Dopaminneuronen betroffen sowie Neuronen im Locus coeruleus und im dorsalen Vaguskern [8]. Die Leitsymptome dieser Erkrankung sind motorische

Störungen wie Rigor, Tremor, Bradykinese bis hin zur Akinese sowie posturale Instabilität. Daneben treten vegetative Störungen wie erhöhte Speichel-, Tränen- und Talgproduktion auf sowie Störungen bei der Wärme- und Schweißregulation. Im Spätstadium treten psychische Störungen wie Depressionen, vor allem aber auch Demenz auf. Symptome bei Morbus Parkinson treten jedoch erst auf, wenn der Großteil der dopaminergen Zellen in der Substantia nigra zerstört ist, zum Zeitpunkt des Todes sind ca. 50-70 % der Dopaminneuronen zerstört [40]. Das späte Auftreten von Symptomen deutet darauf hin, dass die verbleibenden Neuronen noch lange Zeit in der Lage sind, durch vermehrte Dopaminsynthese und -freisetzung den Ausfall der degenerierten Dopaminneuronen auszugleichen. Morbus Parkinson ist eine idiopathische Erkrankung, das heißt, die genaue Ursache der Erkrankung ist nicht bekannt. Eine Erklärung für das Absterben der Dopaminneuronen ist die Hypothese der Autotoxizität von Dopamin. Beim Abbau von Dopamin durch die MAO-B entstehen reaktive Sauerstoffspezies. Aus dem bei der oxidativen Desaminierung von Dopamin entstehenden Wasserstoffperoxid (H_2O_2) kann sich ein Hydroxylradikal bilden (OH^\bullet), welches stark cytotoxisch wirkt. Es kann zur Oxidation von Lipiden, Proteinen und anderen Zellbestandteilen führen, den oxidativen Stress erhöhen sowie die Funktionalität der Mitochondrien schädigen [41]. Ein anderer Ansatz schreibt den sogenannten Lewy-Körperchen eine Rolle bei der Degeneration der Neuronen zu. Lewy-Körperchen sind eosinophile cytoplasmatische Einschlusskörperchen, die in den absterbenden Neuronen zu finden sind. Sie enthalten das Protein α -Synuclein in aggregierter Form, das an andere Proteine, wie z. B. Ubiquitin und Neurofilament gebunden ist [42]. Das aggregierte α -Synuclein verhindert die Chaperon-vermittelte Autophagie, die normalerweise α -Synuclein und andere Substanzen abbaut [43]. Vermutlich ist aber nicht das aggregierte α -Synuclein direkt für die Neurodegeneration verantwortlich, sondern die durch sie bedingte Fehlfunktion der Synapsen, eventuell durch eine durch die Aggregate bedingte Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung [44]. Die Behandlung von Morbus Parkinson zielt darauf ab, die Konzentration an Dopamin zu erhöhen und dadurch das gestörte Gleichgewicht zu anderen Neurotransmittern, vor allem Acetylcholin und γ -Aminobuttersäure, wieder herzustellen. Dies geschieht z.B. durch Gabe der Vorstufe von Dopamin, L-DOPA, da Dopamin selbst nur schwer ZNS-gängig ist, durch COMT-Inhibitoren, MAO-B-Inhibitoren oder Dopaminrezeptor-Agonisten. Die medikamentöse Erhöhung des Dopaminspiegels im Nervensystem dürfte sich auch in der Erhöhung der Konzentration von Dopamin und seinen Metaboliten im Urin widerspiegeln, sodass eine Therapiekontrolle durch Bestimmung dieser Analyten im Urin möglich ist [45].

Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung und mit etwa 60 % die häufigste Form der Demenz bei alten Menschen. Sie ist charakterisiert durch einen stetig fortschreitenden Verlust des Gedächtnisses und anderer kognitiver Fähigkeiten, durch den es zunehmend zur Beeinträchtigung von Alltagsaktivitäten und Verhaltensauffälligkeiten kommt. Meist wird die Erkrankung bei Personen diagnostiziert, die älter als 65 Jahre sind. Die Inzidenz steigt von 0.17 % pro Jahr im Alter von 65 auf 0.71 % pro Jahr im Alter von 75 und auf 2.92 % pro Jahr im Alter von 85 [46]. Im Gehirn von Alzheimer-Patienten finden sich senile Plaques, dies sind extrazelluläre Aggregate von β -Amyloid und fibrilläre Ablagerungen, die aus zu Fibrillen aggregiertem, hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen [47]. Auch bei Morbus Alzheimer ist nicht genau bekannt, wie es durch die Proteinaggregate zur Schädigung der Neuronen kommt. Es werden verschiedene Mechanismen beschrieben, wie es zu dieser Schädigung kommen könnte. So sollen die Aggregate Prozesse wie oxidativen Stress, Schädigung der Mitochondrien, Schädigung der Synapsen, Störung der Calcium-Homöostase sowie entzündliche Prozesse hervorrufen [48]. Es kommt zur Induktion von Apoptose und Störungen bei der Neurotransmission. Besonders betroffen sind cholinerge Neuronen im Nucleus basalis Meynert, die zum Cortex und Hippocampus ziehen [49]. Ebenso wurde ein beträchtlicher Verlust noradrenerger Neuronen im Locus coeruleus beschrieben [50-52]. Zum Teil können die verbleibenden noradrenergen Neuronen diesen Verlust durch verschiedene Mechanismen kompensieren [53]. Da das noradrenerge System bei Lernprozessen und dem Gedächtnis eine Rolle spielt [54], könnte der Verlust der kognitiven Fähigkeiten bei Morbus Alzheimer mit dem Verlust noradrenerger Neuronen zusammenhängen [53]. Trotz des Verlustes noradrenerger Neuronen steigt im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium die Konzentration von Noradrenalin und 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol in der Zerebrospinalflüssigkeit an, was durch die, in diesem Fall übermäßigen, kompensatorischen Mechanismen zu Stande kommen könnte [55]. Andere hingegen beschreiben eine im Vergleich zu gesunden Personen niedrigere Konzentration an Catecholaminen im Plasma und Urin von Alzheimer-Patienten [56].

Schizophrenie

Schizophrenie ist eine schwere psychotische Erkrankung, die mit Wahrnehmungsstörungen sowie Störungen des Denkens und der Affektivität einhergeht. Man unterscheidet dabei Positiv- und Negativsymptome. Zu den Positivsymptomen

zählen inhaltliche Denkstörungen wie Wahnvorstellungen, Halluzinationen und Inkohärenz, Sinnestäuschungen, Ich-Störungen und motorische Unruhe. Die Negativsymptomatik ist dagegen gekennzeichnet durch Antriebsmangel, Affektarmut, Interessen- und Initiativverlust, Zurückgezogenheit sowie Depressionen. Die Erkrankung beginnt meist im späten Jugend- oder jungen Erwachsenenalter [57]. Sowohl genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren und soziale Faktoren spielen bei der Entwicklung von Schizophrenie eine Rolle [58]. Die Ursache für die Entstehung einer Schizophrenie ist nicht genau bekannt, es gibt aber verschiedene Erklärungsversuche. Im Rahmen einer Schizophrenie kommt es auch zu Störungen bei der Neurotransmission, vor allem in dopaminergen, serotonergen und glutamatergen Systemen [59]. Einen Erklärungsversuch zur Entstehung von Schizophrenie bietet die Dopamin-Hypothese [60, 61]. Sie geht von einer Hyperaktivität bzw. Dysregulation des dopaminergen Systems aus, die zu den psychotischen Symptomen führen könnte. Daher wurde die Messung des Dopaminmetaboliten Homovanillinsäure im Plasma und im Urin für Untersuchungen zur Dopamin-Hypothese und Studien zur Schizophrenie herangezogen, jedoch ist diese sehr fehleranfällig, da Homovanillinsäure im Plasma und im Urin auch aus der Nahrung bzw. peripheren noradrenergen Systemen stammen kann [62]. Einen weiteren Erklärungsversuch liefert die Serotonin-Hypothese [63, 64]. Dabei wurden Veränderungen in der serotonergen Neurotransmission sowie Veränderungen bei der Expression der Serotonin-Rezeptoren 5-HT_{1A} und 5-HT_{2A} festgestellt [59]. Des Weiteren gibt es die Glutamat-Hypothese die besagt, dass eine verminderte Funktion des NMDA-Rezeptors, einem Glutamat-Rezeptor, bei der Entstehung von Schizophrenie beteiligt sein könnte [65].

Die Diagnose von Schizophrenie gestaltet sich oft schwierig, da die Symptome nicht eindeutig sind, sondern auch bei vielen anderen Erkrankungen auftreten können. Die Diagnose erfolgt anhand der Befragung des Patienten zu seinen Symptomen. Es gibt verschiedene Klassifizierungssysteme zur Einteilung der Symptome wie die *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* (ICD-10) der WHO oder das *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-V) der *American Psychiatric Association*. Die Systeme beruhen auf der Einteilung der Symptome in verschiedene Gruppen bzw. Achsen. Einen objektiven Test, der routinemäßig zur Diagnose von Schizophrenie eingesetzt wird, gibt es jedoch nicht [57]. Allerdings wurden in den letzten Jahren Biomarker identifiziert, die für die Diagnose von Schizophrenie hilfreich sein könnten. So haben Schwarz et al. einen multiplexen Immunoassay für 51 Biomarker entwickelt, mit dem Schizophrenie-Patienten zuverlässig identifiziert werden konnten [66]. Die Bestimmung von Dopamin und Noradrenalin sowie deren Metaboliten Homovanillinsäure und 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol im Plasma, im Urin und in

Zerebrospinalflüssigkeit wird vor allem in der Forschung bei der Aufklärung der neurobiologischen Mechanismen, die bei Schizophrenie eine Rolle spielen, und bei Untersuchungen zur Wirkung von antipsychotischen Medikamenten eingesetzt [67-70].

1.2.1.3 Stoffwechselerkrankungen

Stoffwechselerkrankungen mit verändertem Catecholaminspiegel sind bedingt durch eine Fehlfunktion von Enzymen, die an der Biosynthese oder dem Abbau von Catecholaminen beteiligt sind. So kann es beispielsweise durch einen seltenen Gendefekt zu einem Mangel an Dopamin- β -Hydroxylase kommen, was dazu führt, dass der Dopaminspiegel deutlich erhöht ist, jedoch kein Adrenalin oder Noradrenalin im Plasma vorhanden ist. Dies führt zu kardiovaskulären Störungen und einer schweren orthostatischen Hypotonie [71]. Ebenfalls in Zusammenhang mit einer Funktionsstörung der Dopamin- β -Hydroxylase steht das Menkes-Syndrom, eine Kupferstoffwechselstörung. Verantwortlich hierfür ist eine Mutation im ATP7A-Gen, das für einen Kupfertransporter codiert [72]. Es kommt dadurch zu einer Fehlverteilung von Kupfer, vor allem zu einer erniedrigten Konzentration im Gehirn und damit zu schweren neurodegenerativen Erkrankungen. Da auch die Dopamin- β -Hydroxylase ein Kupfer-abhängiges Enzym ist, ist die Biosynthese der Catecholamine ebenfalls beeinträchtigt. Da die Patienten eine Erhöhung der Konzentrationen an DOPA, Dopamin und DOPAC zeigen, aber niedrige Konzentrationen an Noradrenalin und 3,4-Dihydroxyphenylglycol, wurde gezeigt, dass eine Bestimmung der Plasmakonzentration von Catecholaminen bei der neonatalen Diagnose des Menkes-Syndroms hilfreich sein kann [73].

Ein genetischer Defekt im Gen für das Enzym Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase führt zu schweren Entwicklungsstörungen. Hier kommt es zu einer starken Reduktion der Plasmakonzentrationen von Catecholaminen und Serotonin [74].

Ein Mangel an MAO-A führt zum sogenannten Brunner-Syndrom, das durch mentale Retardierung und impulsives Verhalten gekennzeichnet ist. Da hier der Abbau der Catecholamine und von Serotonin gestört ist, kommt es zu einer massiven Anhäufung dieser Transmitter im Gehirn. Die Ausscheidung von Normetanephrin und Tyramin im Urin ist stark erhöht, während die Konzentrationen an 5-HIAA, Homovanillinsäure und Vanillinmandelsäure stark reduziert sind [75]. Im Gegensatz dazu zeigen Patienten mit einem Mangel an MAO-B weder mentale Retardierung noch abnormales Verhalten [76].

Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass die Aktivität des sympathischen Nervensystems durch Fettleibigkeit und Ernährungsgewohnheiten beeinflusst wird. Da die

Catecholamine über α - sowie β -Adrenozeptoren stark an der Regulation des Stoffwechsels beteiligt sind und Prozesse wie Lipolyse und Glykogenolyse steuern, könnte eine übermäßig fettreiche Nahrung sowie Fettleibigkeit das Gleichgewicht in diesem System stören. Es gibt hierzu in der Literatur widersprüchliche Erkenntnisse, die sowohl eine Steigerung als auch eine Reduktion der Aktivität des sympathischen Nervensystems in Zusammenhang mit Fettleibigkeit beschreiben [77, 78]. Troisi et al. zeigten beispielsweise, dass es bei fettleibigen Personen zu einem Anstieg der Konzentration von Noradrenalin im Plasma sowie zu einer verstärkten Ausscheidung von Noradrenalin im Urin kommt, was auf eine Erhöhung der Aktivität des sympathischen Nervensystems bei diesen Personen hindeutet [79]. Ebenso beschreiben De Pergola et al., dass bei Patienten mit dem metabolischen Syndrom eine erhöhte Konzentration von Noradrenalin im Urin vorliegt [80]. Sie stellen unter anderem die Hypothese auf, dass die Catecholamine eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Bluthochdruck und von Störungen der Regulation des Glucosestoffwechsels bei fettleibigen Personen spielen.

1.2.2 Erkrankungen mit Veränderung der Konzentration von Serotonin

1.2.2.1 Neuroendokrine Tumoren - Karzinoid

Das Karzinoid ist ein seltener, langsam wachsender neuroendokriner Tumor, der von Zellen des neuroendokrinen Systems ausgeht. Etwa zwei Drittel der Karzinoide kommen im Gastrointestinaltrakt vor und gehen dort von den enterochromaffinen Zellen aus [81]. Die Tumoren können mehrere biologisch aktive Substanzen sekretieren, darunter Serotonin, Kallikrein, Histamin und Prostaglandine [81]. Patienten mit einem Karzinoid können lange Zeit keine bzw. nur sehr unspezifische Symptome zeigen, manche Patienten weisen jedoch auch das sogenannte Karzinoid-Syndrom auf, welches durch die großen Mengen an sekretiertem Serotonin hervorgerufen wird. Dieses ist gekennzeichnet durch die *Flush*-Symptomatik, einer Rötung von Gesicht und Hals, die durch eine Vasodilatation zu Stande kommt, sowie anhaltenden Durchfällen, Bauchkrämpfen, Herzrasen und Bronchokonstriktion [81, 82]. Zudem ist auch die übermäßige Sekretion von Serotonin hauptsächlich für die Schädigung des Herzens verantwortlich, es kommt zur endomyokardialen Fibrose, Trikuspidalinsuffizienz und Pulmonalklappenstenose [81]. Für die biochemische Diagnose werden hauptsächlich zwei Marker verwendet, 5-HIAA, das Abbauprodukt von Serotonin, und Chromogranin A. Die Bestimmung von 5-HIAA im 24h-Urin ist eine weit verbreitete Methode zur Diagnose und Nachsorge des Karzinoids und besitzt eine Sensitivität von 73 % und eine Spezifität von 100 % [83]. Chromogranin A

befindet sich in der Wand synaptischer Vesikel, die unter anderem Serotonin speichern. Die Konzentrationen von Chromogranin A in Serum und Plasma scheinen mit der Größe des Tumors, jedoch nicht mit den Symptomen zu korrelieren [84]. Chromogranin A ist jedoch kein spezifischer Marker für das Karzinoid, es wird von vielen neuroendokrinen Tumoren freigesetzt. Dennoch ist es einer der wichtigsten Tumormarker für die Diagnose und Nachsorge neuroendokriner Tumoren [85].

1.2.2.2 Depressionen

Depressionen werden den affektiven Störungen zugeordnet und sind durch Niedergeschlagenheit, Interesselosigkeit, Freudlosigkeit und Antriebsarmut gekennzeichnet. Bei Patienten mit schweren Depressionen kann es bis zur latenten oder akuten Suizidalität kommen. Die Ursachen für die Entstehung einer Depression sind komplex und noch nicht vollständig verstanden. Es spielen jedoch genetische, biologische und entwicklungsgeschichtliche Faktoren eine Rolle sowie aktuelle Lebensereignisse und Stress [86]. Eine zentrale Hypothese zur Entstehung von Depressionen ist die Monoamin-Hypothese, die von einem Mangel an Serotonin und Catecholaminen bzw. einer Gleichgewichtsstörung vor allem des serotonergen und noradrenergen Systems aber auch dopaminergen Systems ausgeht [87]. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass wichtige Antidepressiva in diese Systeme eingreifen, wie zum Beispiel Serotonin- oder Noradrenalin-Wiederaufnahme-Inhibitoren oder Monoaminoxidase-Inhibitoren und dabei die Konzentration der Neurotransmitter im synaptischen Spalt erhöhen [88]. Zudem weisen Konzentrationsbestimmungen von Monoaminen in Zerebrospinalflüssigkeit, im Blut und im Urin auf eine Funktionsstörung des Monoamin-Metabolismus hin [89]. Es konnte beispielsweise in der Zerebrospinalflüssigkeit eine Reduktion von 5-HIAA und im Urin eine Reduktion von 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol festgestellt werden [86], obwohl diese Beobachtungen auch nicht konsistent sind [89]. Jedoch kann auch diese Hypothese die Pathophysiologie der Depression nicht vollständig erklären, beispielsweise ist unklar, warum nur etwa 50 % - 80 % der Patienten auf eine Therapie mit Antidepressiva ansprechen [90]. Ebenso ist unklar, warum die Wirkung erst nach einigen Wochen oder Monaten eintritt, obwohl durch die Wiederaufnahme-Hemmer bzw. MAO-Hemmer die Konzentration der Neurotransmitter im synaptischen Spalt unmittelbar ansteigt [90].

1.2.2.3 Migräne

Migräne ist eine chronische neurologische Erkrankung, die durch wiederkehrende moderate bis starke Kopfschmerzen gekennzeichnet ist. Häufig treten weitere Symptome wie Übelkeit, Erbrechen, Licht- und Geräuschempfindlichkeit auf. Es handelt sich dabei um meist halbseitige, pulsierende Kopfschmerzen, die für 4-72 h anhalten und sich bei körperlicher Anstrengung verschlimmern [91]. Man unterscheidet zwei Subtypen: Migräne mit und ohne Aura. Bei der Migräne mit Aura kommen zusätzlich noch neurologische Symptome hinzu wie Sehstörungen, sensible Wahrnehmungsstörungen, Sprachstörungen und motorische Störungen, die meist vor den Kopfschmerzen auftreten, nicht länger als 60 Minuten dauern und vollständig reversibel sind [91]. Bisher ist der Mechanismus des Migräneanfalls nicht vollständig aufgeklärt, es gibt aber Hypothesen zur Entstehung von Migräne. Dabei ist schon lange bekannt, dass Serotonin eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der Migräne spielt [92]. Zentraler Bestandteil einer der Hypothesen, der vaskulären Hypothese, ist das trigemino-vaskuläre System der Hirnhäute, welches aus den meningealen Blutgefäßen und den afferenten Fasern des Nervus trigeminus, der diese Gefäße innerviert, besteht [93, 94]. Man geht davon aus, dass zu Beginn eine Freisetzung von Serotonin aus serotonergen Neuronen in den meningealen Blutgefäßen oder aus Thrombozyten 5-HT_{2B}-Rezeptoren auf den Endothelzellen aktiviert und so zu einer Stimulation der endothelialen NO-Synthase führt. Daraufhin kommt es zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid, das eine Vasodilatation bewirkt. Die Erweiterung der Blutgefäße erklärt den pulsierenden Charakter der Kopfschmerzen. Zudem stimuliert NO die afferenten Fasern des Nervus trigeminus, was zur Freisetzung von Neuropeptiden wie Substanz P und dem *Calcitonin gene-related peptide* führt. Diese lösen eine neurogene Entzündung aus und über Aktionspotentiale, die im Nervus trigeminus zum ZNS geleitet werden, können Schmerz, Übelkeit und Erbrechen ausgelöst werden [8]. Unterstützt wird diese Theorie durch die Wirksamkeit von Migränemedikamenten wie Triptanen, die über Bindung an 5-HT_{1B/1D}-Rezeptoren zu einer Vasokonstriktion in zerebralen und duralen Gefäßwänden führen und zu einer Hemmung der Freisetzung von Neuropeptiden sowie einer Blockade der Übertragung von Schmerzsignalen [95]. Ferrari et al. [96] untersuchten die Plasmakonzentrationen von Serotonin und 5-HIAA zwischen und während Migräneattacken. Sie stellten fest, dass während einer Migräneattacke die Serotoninkonzentration um 100 % erhöht ist, während die 5-HIAA-Konzentration erniedrigt ist. Ebenso wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen der Konzentration von Serotonin sowie 5-HIAA im Urin und Migräneattacken herzustellen. Während einer Attacke war auch der Serotoninspiegel im Urin erhöht und die 5-HIAA-Konzentration

reduziert, die Unterschiede waren aber nicht sehr groß und sprechen eher für eine generelle Störung des Serotonin-Metabolismus bei Migräne-Patienten [97].

1.3 Methoden zur Quantifizierung von biogenen Aminen in humanen Flüssigkeiten

Aufgrund der zahlreichen Erkrankungen, die mit einer Veränderung der Konzentration an biogenen Aminen einhergehen, gibt es eine große Nachfrage nach Methoden zur Quantifizierung dieser in humanen Flüssigkeiten. Dazu zählen Plasma, Serum, Urin und Zerebrospinalflüssigkeit. Für Serotonin ist darüber hinaus die Quantifizierung in Thrombozyten von Bedeutung. Vor allem bei Patienten, die nur unspezifische Symptome aufweisen oder bei Erkrankungen, deren Diagnose bisher nur aufgrund der Anamnese erfolgt, kann die Bestimmung von biogenen Aminen Aufschluss über die zugrunde liegenden Erkrankungen bringen.

Beispielsweise gehen Phäochromozytome mit sehr unspezifischen Symptomen wie Hypertonie, Kopfschmerzen, Herzrasen und Schwitzen einher, die auch bei vielen anderen Erkrankungen auftreten. Da das Phäochromozytom ein seltener Tumor ist, wird bei Vorliegen dieser Symptome nicht direkt auf ein Phäochromozytom geschlossen. Dies führt dazu, dass die Tumoren oft erst sehr spät erkannt werden und es schon zur Malignisierung und Bildung von Metastasen gekommen ist, obwohl der Primärtumor durch operative Entfernung gut behandelbar gewesen wäre. Phäochromozytome werden oft auch nur zufällig im Rahmen anderer Untersuchungen oder Operationen entdeckt, vor allem dann, wenn es durch die hohe Konzentration an Catecholaminen im Blut zu schweren Komplikationen während der Operation kommt. Nicht selten werden Phäochromozytome auch erst post-mortem erkannt [98]. Bei Dopamin-produzierenden Phäochromozytomen, die mit Hypotonie einhergehen, werden die Tumoren meist erst dann erkannt, wenn sie so stark gewachsen sind, dass sie durch ihre Größe zu Komplikationen führen [99]. Aufgrund der möglicherweise fatalen Konsequenzen eines unerkannten Phäochromozytoms wäre es von Vorteil, alle Patienten mit unspezifischen Symptomen, die auch bei Phäochromozytomen auftreten können, durch die Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Vanillinmandelsäure im Plasma oder im Urin auf das Vorhandensein eines Tumors zu untersuchen [34]. Dabei stellt die Quantifizierung von freien Metanephrinen im Plasma oder Urin die sensitivste Methode dar. Die Bestimmung von Metanephrinen bietet im Vergleich zur Bestimmung von Catecholaminen den Vorteil, dass die Metanephrinspiegel weniger stark tageszeit- und aktivitätsabhängigen Schwankungen unterworfen sind und die Metanephrine eine längere

Halbwertszeit haben. Catecholamine hingegen werden nach der Freisetzung relativ schnell zu Metanephrinen metabolisiert. Tabelle 2 zeigt die Sensitivität und Spezifität der Bestimmung verschiedener Parameter für die Diagnose von Phäochromozytomen.

Tabelle 2: Sensitivität und Spezifität der Bestimmung verschiedener biogener Amine für die Diagnose von Phäochromozytomen. Quelle: Lenders et al. [34, 100].

quantifizierte biogene Amine	Sensitivität	Spezifität
freie Metanephrine im Plasma	99 %	89 %
Catecholamine im Plasma	84 %	81 %
Catecholamine im Urin	86 %	88 %
fraktionierte Metanephrine im Urin	97 %	69 %
Gesamt-Metanephrine im Urin	77 %	93 %
Vanillinmandelsäure im Urin	64 %	95 %

Darüber hinaus könnte die Bestimmung von biogenen Aminen im Urin zur Therapiekontrolle bei verschiedenen Krankheiten eingesetzt werden, bei denen durch medikamentöse Behandlung die Konzentration von biogenen Aminen verändert wird. Beispielsweise könnte eine Bestimmung von Dopamin im Urin hilfreich für die Therapiekontrolle bei Patienten mit Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung, Narkolepsie oder Angststörungen sein, die mit Dopamin-Wiederaufnahmehemmern behandelt werden [45].

Für die Quantifizierung dieser biogenen Amine im Plasma und im Urin ist demnach ein einfaches, schnelles und kostengünstiges Testverfahren notwendig. Es gibt bereits verschiedene Verfahren zur Bestimmung von biogenen Aminen im Plasma und im Urin. Früher wurden Vanillinmandelsäure und Metanephrine im Urin häufig mit Hilfe der Spektrophotometrie bestimmt, Metanephrine und Catecholamine auch mit Hilfe der Fluorimetrie. Seit Ende der 1970er Jahre gibt es eine Vielzahl von Verfahren, die sich der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) mit fluorimetrischer oder elektrochemischer Detektion bedienen [101]. Zudem kann eine Bestimmung mittels Gaschromatographie in Kombination mit Massenspektrometrie erfolgen [102]. Während spektrophotometrische und fluorimetrische Methoden anfällig gegenüber Störungen sind, z.B. durch Medikamente, Nahrungsbestandteile oder Kontrastmittel, sind chromatographische Methoden sehr sensitiv und spezifisch [101]. Zu den bedeutendsten Methoden heutzutage gehören chromatographische Verfahren, häufig in Kombination mit Massenspektrometrie und die Quantifizierung mittels immunologischer

Nachweisverfahren wie dem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), dessen Vorteil in der einfachen und kostengünstigen Durchführung liegt.

1.3.1 Probenvorbereitung

Bevor eine Quantifizierung von biogenen Aminen aus komplexen humanen Proben durchgeführt werden kann, muss je nach Messmethode eine Aufbereitung der Probe erfolgen, um die Catecholamine oder ihre Metaboliten aus der Probenmatrix zu extrahieren oder aufzukonzentrieren. Auch hierfür wurden verschiedene Verfahren entwickelt.

Für die Bestimmung von Catecholaminen werden diese direkt aus dem Urin isoliert, während bei Metanephrinen zunächst eine saure Hydrolyse erfolgt, um die in konjugierter Form vorliegenden Moleküle freizusetzen. Wird hingegen keine saure Hydrolyse durchgeführt, werden nur die freien Metanephrine im Plasma oder Urin erfasst.

Im angesäuerten Urin liegen die biogenen Amine als Kationen vor und können daher mit Hilfe von Aluminiumsäulen [103] oder durch Ionen-Austausch-Chromatographie isoliert werden, was jedoch sehr zeitaufwendig ist [104]. Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit, die Catecholamine mittels Festphasen-Extraktion über C₁₈-Säulen zu extrahieren [105] oder durch eine Proteinfällung von Proteinen zu befreien [106]. Ein weiteres Verfahren ist die Lösungsmittelextraktion, bei der die Komplexbildung von cis-diol Strukturen mit Diphenylborat im Alkalischen ausgenutzt und der Komplex anschließend in einem organischen Lösemittel extrahiert wird [107]. Des Weiteren können Catecholamine mit Hilfe von Boronat-Gelen extrahiert werden, welche ebenfalls die Eigenschaft besitzen, spezifisch Bindungen mit cis-diol Strukturen auszubilden [108].

Um die Sensitivität zu erhöhen, wird nach der Extraktion häufig ein Derivatisierungsschritt durchgeführt. Für die Detektion mittels fluoreszenzbasierter Verfahren muss eine Derivatisierung, beispielsweise mit Trihydroxyindol oder 1,2-Diphenylethylendiamin erfolgen, da die Eigenfluoreszenz der Catecholamine oft nicht ausreichend ist, um die erforderliche Sensitivität zu erreichen [109]. Eine weitere Möglichkeit zur Derivatisierung bietet auch das Enzym Catechol-O-Methyltransferase, das unter Verwendung von ¹⁴C-S-Adenosylmethionin oder ³H-S-Adenosylmethionin die Catecholamine in markierte Metanephrine umwandelt und so hauptsächlich früher den Einsatz von radiometrischen Assays ermöglichte [110, 111]. Auch für den Nachweis mittels ELISA erfolgt eine Derivatisierung, um die Sensitivität und Spezifität zu erhöhen. Hierbei werden die Catecholamine ebenfalls mit Hilfe der COMT methyliert, allerdings ist hier keine Markierung notwendig. Zudem wird eine Acylierung am Stickstoff vorgenommen. Für die

Metanephrine hingegen ist nur der Acylierungsschritt erforderlich [112]. Diese beiden Modifikationen ermöglichen eine spezifische Erkennung der Catecholamine durch den jeweiligen Antikörper.

1.3.2 Immunologische Nachweisverfahren

Obwohl die biogenen Amine sehr klein sind wurde bereits gezeigt, dass es möglich ist, spezifische polyklonale sowie auch monoklonale Antikörper gegen Catecholamine und andere biogene Amine zu generieren, um diese anschließend für immunologische Assays einzusetzen [113, 114]. Die Catecholamine und Metanephrine besitzen alle eine sehr ähnliche Struktur, basierend auf dem 1,2-Dihydroxybenzol-Ringsystem. Um spezifisch nur ein Catecholamin oder Metanephrin zu erkennen, darf der Antikörper somit nicht gegen die 1,2-Dihydroxybenzol-Struktur allein gerichtet sein. Die Seitenkette ist daher wesentlicher Bestandteil des Epitops und die Antikörper können dabei spezifisch kleinste Unterschiede wie das Vorhandensein einer Methylgruppe oder Hydroxylgruppe erkennen. Um eine Immunreaktion auszulösen sind sie jedoch zu klein und müssen deshalb an größere Trägermoleküle wie BSA, KLH oder Thyreoglobulin konjugiert werden, damit eine Immunisierung durchgeführt werden kann.

Dabei ist das Format des indirekten, kompetitiven ELISAs eines der häufigsten Formate, das für die Quantifizierung von biogenen Aminen mittels immunologischer Assays zum Einsatz kommt. Hierbei konkurrieren die freien biogenen Amine aus der Probe mit den auf der ELISA-Platte immobilisierten Antigenen um die Bindung des Antikörpers. Über Peroxidase-gekoppelte Sekundär-Antikörper erfolgt anschließend die Detektion [114].

Der Vorteil der immunologischen Verfahren liegt in der einfachen und kostengünstigen Durchführung, die einen Einsatz in der Routinediagnostik möglich macht.

Darüber hinaus gibt es Radioimmunoassays (RIA), die ^{125}I -markierte Antigene verwenden, die mit dem nicht markierten Antigen aus der Probe um die Bindung am Antikörper konkurrieren [115]. Nach Präzipitation mit einem Sekundär-Antikörper erfolgt die Auslesung des Präzipitats mit Hilfe eines Gamma-Zählers. Der Nachteil der Radioimmunoassays liegt jedoch in der Verwendung radioaktiver Substanzen, was dieses Verfahren im Vergleich zu ELISAs und chromatographischen Methoden wenig attraktiv erscheinen lässt.

1.3.3 Chromatographische Nachweisverfahren

Die am weitesten verbreitete Methode zur Bestimmung von Catecholaminen und ihrer Metaboliten im Urin ist die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) [116]. Früher wurden zur Detektion hauptsächlich fluoreszenzbasierte Methoden verwendet, während heute der Fokus auf elektrochemischen Verfahren liegt. Einerseits ist die elektrochemische Detektion sehr sensitiv, andererseits erfordert sie sorgfältige Wartung und häufige Reinigung und es kann zudem zu Störungen und falsch-positiven Ergebnissen durch Medikamente wie Paracetamol, Sympathomimetika oder Antidepressiva im Urin kommen [116]. Zudem erfordern chromatographische Methoden Erfahrung im Umgang mit dieser Technologie und sind häufig zeitintensiv und mit hohen Anschaffungskosten verbunden.

Darüber hinaus gewinnt auch immer mehr die Massenspektrometrie als Detektionsverfahren für biogene Amine an Bedeutung, da sie die Detektion der sehr geringen Konzentrationen an Metanephrinen im Plasma ermöglicht, weniger anfällig gegenüber Störungen durch z.B. Medikamente ist und darüber hinaus eine hohe Sensitivität und Selektivität aufweist [116]. Dabei werden interne Standards verwendet, die mit schweren Isotopen wie Deuterium markiert sind. Gosetti et al. beschreiben die simultane Bestimmung von 16 biogenen Aminen im Urin mittels HPLC und Tandem-Massenspektrometrie ohne vorherigen Derivatisierungsschritt [117]. Jedoch sind auch hier die sehr hohen Anschaffungskosten sowie die notwendige Expertise der Nachteil an der Detektion mittels Massenspektrometrie.

1.3.4 Weitere Nachweisverfahren

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von Catecholaminen im Urin bietet die Kapillarelektrophorese. Meistens werden anschließend aufgrund des breiten Anwendungsspektrums und der relativ geringen Kosten Ultraviolett-Detektoren für die Detektion eingesetzt. Man kann jedoch auch hier elektrochemische Detektoren, fluoreszenzbasierte oder massenspektrometrische Verfahren einsetzen. Des Weiteren beschreiben Xu et al. die Detektion von Catecholaminen mittels Chemilumineszenz im Anschluss an die Kapillarelektrophorese [118].

1.4 Microarrays

Die Microarray-Technologie hat sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen Werkzeug für eine Vielzahl von Applikationen sowohl in der Forschung und Entwicklung als auch in der *in vitro* Diagnostik entwickelt. Sie ermöglicht die Analyse von DNA, RNA, Proteinen, Peptiden, Antikörpern, Geweben, Zelllysaten und Kohlenhydraten und findet daher ihre Anwendung sowohl in der Proteomik als auch in der Genomik und Transkriptomik [119]. Der große Vorteil der Microarray-Technologie liegt in der Miniaturisierbarkeit und Parallelisierung, da hier aus sehr geringen Mengen an biologischem Probenmaterial viele verschiedene Parameter gleichzeitig detektiert und quantifiziert werden können. Weitere Stärken der Microarrays sind ihre hohe Sensitivität und die gute Automatisierbarkeit, die eine Anwendung im Hochdurchsatzverfahren möglich macht.

1.4.1 Das *Bead-basierte Array-System*

Im Gegensatz zu planaren Microarrays werden beim *Bead*-basierten Array-System die Fängermoleküle auf Mikrosphären (*Beads*) immobilisiert, die in diesem Fall die feste Phase darstellen. Das *Bead*-basierte Array-System der Firma Luminex (Luminex Corp., Austin, TX, USA) stellt ein Set aus bis zu 500 verschiedenen Mikrosphären zur Verfügung, die anhand ihrer Farbcodierung identifiziert werden können. Die Polystyrol-Mikrosphären haben einen Durchmesser von 6,5 µm und enthalten bis zu zehn verschiedene Mengen an drei Farbstoffen, einem roten, infraroten und orangenen Farbstoff. Für die Analyse wird das Prinzip eines Durchflusszytometers angewendet, somit werden die Mikrosphären jeweils einzeln in der Flusszelle analysiert. Dabei dienen zwei Laser und fünf Photomultiplier der Generierung des Endsignals. Ein roter Laser (635 nm) dient zur Anregung der drei in den Mikrosphären enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffe, während für die Anregung des Reporterfarbstoffs ein grüner Laser (532 nm) eingesetzt wird. Als Reporterfarbstoffe werden fluoreszierende Farbstoffe, wie z. B. Phycoerythrin, verwendet. Fünf verschiedene Detektoren dienen dann der Erfassung des Endsignals: drei Photomultiplier dienen der Erfassung der Lichtemission der drei unterschiedlichen Farbstoffe der Mikrosphären, ein weiterer erfasst die Größe der Mikrosphären und sortiert Störsignale durch Luftblasen oder Mikrosphärenaggregate aus und ein weiterer Photomultiplier dient der Auslesung und Quantifizierung des Reportersignals. Abbildung 8 zeigt die Prinzipien der xMAP-Technologie der Firma Luminex.

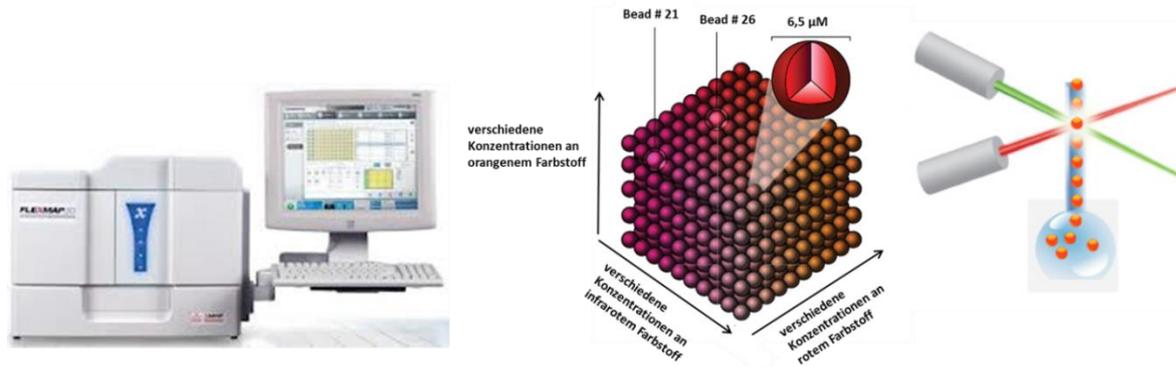


Abbildung 8: Die xMAP-Technologie der Firma Luminex. *Links:* Mit Hilfe des FLEXMAP 3D-Analysegeräts können bis zu 500 verschiedene Mikrosphärensorten unterschieden werden. *Mitte:* Die Identifizierung der jeweiligen Mikrosphärensorte erfolgt durch ein unterschiedliches Mischungsverhältnis von drei Fluoreszenzfarbstoffen, einem infraroten, roten und orangenen Farbstoff. *Rechts:* In der Flusszelle werden die Mikrosphären mit Hilfe von zwei Lasern einzeln analysiert, einem roten Laser zur Identifizierung der Mikrosphärensorte sowie einem grünen Laser zur Quantifizierung des Reportersignals. Modifiziert nach [120, 121].

1.4.2 Multiplexe Immunoassays

Konventionelle Immunoassays wie ELISAs werden vielfach in der Forschung sowie in der Diagnostik eingesetzt, da sie sehr sensitiv, robust und einfach zu handhaben sind. Multiplexe Immunoassays bieten darüber hinaus die Möglichkeit, mehrere Parameter gleichzeitig mit vergleichbarer Sensitivität, Präzision und Zuverlässigkeit zu bestimmen [122]. Dabei benötigen sie wesentlich weniger Probenmaterial und ermöglichen eine schnellere Durchführung, die Automatisierung und Hochdurchsatz erlaubt.

Für die Durchführung eines multiplexen Immunoassays werden die Fängermoleküle, beispielsweise Antikörper, auf den Mikrosphären immobilisiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit der Probe, die das zu analysierende Molekül enthält. Die Detektion kann entweder direkt erfolgen, wenn der Analyt selbst markiert wurde, oder mit einem Detektionsantikörper, der ebenfalls gegen den Analyten gerichtet ist. So können in komplexen Probenmatrices wie Plasma, Urin, Gewebe- und Zelllysaten verschiedenste Analyten wie Proteine, Antikörper oder kleine Moleküle nachgewiesen werden.

Multiplexe Immunoassays für kleine Moleküle stellen insofern eine Herausforderung dar, als dass spezifische Antikörper gegen sehr kleine Strukturen notwendig sind. Dass dies möglich ist wurde bereits mehrfach gezeigt. So wurde beispielsweise schon das Schilddrüsenhormon Thyroxin (T_4) in einen multiplexen Immunoassay integriert [123] und ein *Bead*-basierter Immunoassay für Trinitrotoluol (TNT) entwickelt [124].

1.4.3 Validierung von Immunoassays

Eine Validierung von Immunoassays ist notwendig, um die Qualität, Zuverlässigkeit und Eignung der Assays für die vorgesehene Anwendung zu zeigen. Hierfür gibt es verschiedene gesetzliche Regularien, die als Basisdokumente für Validierungen herangezogen werden können. Sowohl das Dokument „*Guideline on bioanalytical method validation*“ der *European Medicines Agency* (EMA) als auch das Dokument „*Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*“ der *US Food and Drug Administration* (FDA) geben Richtlinien für die Validierung von bioanalytischen Methoden vor [125, 126]. Sie definieren notwendige Begriffe und geben methodische Ratschläge. Jedoch sind diese Regularien nicht speziell auf die Validierung von Immunoassays ausgerichtet, sondern sind eher für eine Anwendung bei der Validierung von chromatographischen Verfahren vorgesehen. Dennoch können die beschriebenen Begrifflichkeiten und Methoden auch für die Validierung von Immunoassays verwendet und entsprechend der konkreten Fragestellung und des Anwendungszwecks angepasst werden.

Bei der Validierung von Immunoassays empfiehlt es sich, die folgenden Parameter zu ermitteln: ein geeignetes Kalibrierkurvenmodell, die untere Nachweisgrenze (*Limit of detection*, LOD), die untere Bestimmungsgrenze (*Lower limit of quantification*, LLOQ), die obere Bestimmungsgrenze (*Upper limit of quantification*, ULOQ), den dynamischen Bereich, welcher sich aus den beiden Bestimmungsgrenzen ergibt, die Intra- und Interassay-Präzision, die Wiederfindungsrate, die Selektivität oder Spezifität, die Verdünnungslinearität sowie die Robustheit des Assays und die Stabilität der Analyten.

Kalibrierkurvenmodell

Ein Kalibrierkurvenmodell beschreibt den Zusammenhang zwischen Konzentration und Messsignal in einem Assay. Die Wahl eines geeigneten Kalibrierkurvenmodells gewährleistet daher eine robuste Berechnung der Analytkonzentration in der Probe aus dem erhaltenen Messsignal anhand im Assay verwendeter Standards. Typisch für Immunoassays ist dabei ein nicht-linearer Zusammenhang zwischen dem Messsignal und der Analytkonzentration. Die Eignung des Kalibrierkurvenmodells kann anhand des Bestimmtheitsmaßes und der Wiederfindungsrate sowie mit Hilfe von Residuendiagrammen beurteilt werden.

Untere Nachweisgrenze (Limit of detection)

Die untere Nachweisgrenze (LOD – *Limit of detection*) ist die kleinste qualitativ noch erfassbare Konzentration eines Analyten, die sich signifikant vom Hintergrundrauschen unterscheidet. Sie ist also die geringste nachweisbare Konzentration (MDC – *minimum detectable concentration*) und entspricht damit der Sensitivität des Assays. Sie ist definiert als das Hintergrundsignal plus 3-mal die Standardabweichung des Hintergrundsignals.

Untere Bestimmungsgrenze (Lower limit of quantification)

Die untere Bestimmungsgrenze (LLOQ – *lower limit of quantification*) ist die kleinste quantitativ erfassbare Konzentration des Analyten und definiert als derjenige Punkt, an welchem der Variationskoeffizient (CV) für die Probe noch < 30 % ist und die Wiederfindungsrate innerhalb des Bereichs von 75-125 % liegt. Dabei wird der LLOQ mit dem Verdünnungsfaktor der Probe multipliziert, wobei bei mehreren Verdünnungen der Faktor für die Probe mit der geringsten nötigen Verdünnung gewählt wird. Die Angabe des CV in % erhält man, indem die Standardabweichung S durch den Mittelwert \bar{x} des jeweiligen Messwerts geteilt wird:

$$\% CV = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100$$

Obere Bestimmungsgrenze (Upper limit of quantification)

Die obere Bestimmungsgrenze (ULOQ – *upper limit of quantification*) ist die maximale Konzentration eines Analyten, die noch mit ausreichender Präzision und Richtigkeit bestimmt werden kann. Meistens ist der ULOQ identisch mit der Konzentration des höchsten Standards. Er wird analog zum LLOQ ermittelt, indem Konzentrationen gemessen werden, die oberhalb des obersten Standards liegen. Als ULOQ wird diejenige Konzentration definiert, bei welcher der CV noch unterhalb von 20 % und die Wiederfindungsrate zwischen 80-120 % liegt.

Dynamischer Bereich

Der dynamische Bereich eines Assays ist der Bereich zwischen der niedrigsten und höchsten Konzentration eines Analyten, für welchen die geforderte Präzision und Richtigkeit bewiesen wurde. Diese Grenzen sind durch den LLOQ sowie den ULOQ gegeben.

Präzision

Die Präzision einer analytischen Methode beschreibt die Nähe der Übereinstimmung zwischen unabhängig ermittelten Ergebnissen von wiederholten Messungen, wenn mit dieser Methode mehrere Aliquots einer definierten Probe gemessen wurden. Die Intraassay-Präzision, die Wiederholpräzision, ist dabei die Präzision innerhalb eines Assays, die Interassay-Präzision dagegen ist die Präzision zwischen mehreren Durchführungen desselben Assays. Die Präzision wird üblicherweise in Form des Variationskoeffizienten (% CV) der Messergebnisse angegeben. Die Intraassay-Präzision sollte einen CV < 15 % aufweisen. Die Interassay-Präzision sollte für jede Konzentration einen CV < 20 % aufweisen, für niedrige Konzentrationen wird auch ein CV < 30 % akzeptiert.

Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate eines Analyten in einem Assay ist das Verhältnis zwischen der tatsächlich gemessenen Menge des Analyten und der zuvor zu dieser Probe zugesetzten Menge dieses Analyten. Die Wiederfindungsrate spiegelt somit die Effizienz von Extraktions- und Probenverarbeitungsprozessen sowie eventuell vorhandene Matrixeffekte wider. Daher sollte die Bestimmung der Wiederfindungsrate in einer geeigneten Matrix erfolgen. Sie sollte im gesamten Messbereich zwischen 80-120 % liegen bzw. falls sie außerhalb dieses Bereichs liegt, sollte sie über den dynamischen Bereich des Assays konstant sein.

Selektivität und Spezifität

Die Selektivität beschreibt die Fähigkeit einer analytischen Methode, nur den gesuchten Analyten in Anwesenheit anderer Substanzen in einer Probe eindeutig zu erkennen und zu quantifizieren. Dies umfasst die Anwesenheit von Metaboliten, Verunreinigungen, Abbauprodukten und weiteren Matrixbestandteilen. Der Begriff Spezifität wird zumeist gleichbedeutend mit Selektivität verwendet, jedoch bezieht sich der Begriff Spezifität auf Methoden, die nur einen einzelnen Analyten erfassen, während sich der Begriff Selektivität auf Methoden bezieht, die mehrere Analyten gleichzeitig erfassen. Selektive Methoden sollten alle Analyten voneinander und von der Matrix unterscheiden können. Die Selektivität kann bestimmt werden, indem der Analyt in An- und Abwesenheit von verschiedenen potentiell interferierenden Substanzen bestimmt wird.

Verdünnungslinearität

Die Verdünnungslinearität gibt an, ob bzw. inwiefern man in einer Probe, in welcher die Konzentration des zu bestimmenden Analyten oberhalb des ULOQ liegt, die Analytkonzentration durch Verdünnen in den dynamischen Bereich des Assays bringen kann und ob diese über einen weiten Bereich von Verdünnungen linear verläuft. Dabei sollte die Linearität der zurückgerechneten Werte für die Konzentration des Analyten im bestmöglichen Fall über den gesamten dynamischen Bereich des Assays gegeben sein.

Robustheit und Stabilität des Analyten

Die Robustheit einer Methode beschreibt die Toleranz des Assays gegenüber bestimmten Schwankungen, zum Beispiel Schwankungen von Temperatur oder pH-Wert oder unterschiedlichen Lagerungsbedingungen. Eine Methode kann als robust bezeichnet werden, wenn durch die Änderung von Testbedingungen das Endergebnis nicht oder nur in geringem Maße verändert wird. Auch die Stabilität des Analyten gegenüber Schwankungen von Temperatur und pH-Wert oder unterschiedlichen Lagerungsbedingungen sollte getestet werden.

2. Zielsetzung

Aufgrund ihrer zahlreichen und wichtigen Funktionen im Körper spielen die Catecholamine, ihre inaktiven Metaboliten, die Metanephrine, sowie Serotonin bei vielen Erkrankungen eine Rolle. Verschiedene Tumorerkrankungen, wie das Phäochromozytom oder Neuroblastom, Erkrankungen des Nervensystems, wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson, sowie einige Stoffwechselerkrankungen gehen mit einer Veränderung der Konzentration an Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin einher. Diese Veränderungen können im Plasma, im Urin oder in Zerebrospinalflüssigkeit erfasst und für die Diagnose und Therapiekontrolle eingesetzt werden.

In einer ständig älter werdenden Gesellschaft treten Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Tumorerkrankungen immer häufiger auf und erfordern schnelle, zuverlässige, präzise und kostengünstige Methoden für die Diagnose und Therapiekontrolle. Daher gibt es eine große Nachfrage nach Methoden, mit denen Catecholamine, Metanephrine und Serotonin in humanen Körperflüssigkeiten quantitativ erfasst werden können. Hierfür stehen derzeit in der Routinediagnostik verschiedene Methoden zur Verfügung. Hauptsächlich kommen dabei immunologische Verfahren wie ELISA und Radioimmunoassays zum Einsatz oder chromatographische Verfahren wie HPLC mit elektrochemischer Detektion oder auch in Kombination mit Massenspektrometrie. Die heutigen immunologischen Verfahren erlauben jedoch nur die Bestimmung eines Analyten pro Test und sind daher sehr zeit- und arbeitsintensiv. Chromatographische Verfahren hingegen sind sehr wartungs- und kostenintensiv, erfordern viel Erfahrung im Umgang mit der Technologie und der Probendurchsatz ist hierbei limitiert.

Ziel dieser Arbeit war es daher, multiplexe *Bead*-basierte Immunoassays für Catecholamine, Metanephrine und Serotonin zu entwickeln, die eine einfache, schnelle und präzise Quantifizierung dieser Analyten im Urin ermöglichen. Multiplexe Assays bieten den Vorteil, dass aus geringen Probenvolumina mehrere Parameter gleichzeitig bestimmt und hunderte von Proben innerhalb kürzester Zeit bearbeitet werden können. *Bead*-basierte multiplexe Immunoassays stellen daher eine einfache, zeit- und kostensparende aber auch sensitive und zuverlässige Methode dar. In Zusammenarbeit mit der Firma Labor Diagnostika Nord (LDN, Nordhorn, Deutschland) sollten zwei multiplexe Immunoassays in einem nicht-kompetitiven, Sandwich-Immunoassay-

ähnlichen Format entwickelt werden, ein 3-plex für die Catecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin, sowie ein 4-plex für Metanephrin, Normetanephrin, 3-Methoxytyramin und Serotonin.

Für die Assayentwicklung sollten zunächst polyklonale Antikörper aus Kaninchen-Antiseren aufgereinigt und charakterisiert werden und diese anschließend für den Aufbau multiplexer *Bead*-basierter Immunoassays verwendet werden. Für die Probenvorbereitung sollte das Probenvorbereitungsprinzip aus den kompetitiven ELISAs der Firma LDN modifiziert und an das multiplexe Assayformat angepasst werden. Nach der Etablierung und Optimierung der beiden multiplexen Immunoassays sollten diese validiert und dabei auf ihre Qualität, Zuverlässigkeit und Eignung für die Quantifizierung der Analyten im Urin überprüft werden.

Darüber hinaus sollte gezeigt werden, dass es möglich ist, die Urinproben für die Quantifizierung der Catecholamine, Metanephrine und von Serotonin mittels *Dry Urine Test*-Filterkarten zu sammeln, die eine einfache und wenig fehleranfällige Alternative zu Urinsammelröhrchen darstellen.

Anschließend sollten die neu entwickelten multiplexen Immunoassays mit den beiden gängigen Verfahren zur Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin, dem ELISA und der HPLC, verglichen werden. Hierfür stand ein Set an Patientenproben, für welches Referenzwerte aus HPLC-Messungen am Universitätsklinikum in Tübingen vorlagen, zur Verfügung. Dieses Set sollte sowohl mit den multiplexen Immunoassays als auch mit kommerziell erhältlichen ELISAs analysiert werden und die Übereinstimmung der neu entwickelten multiplexen Methode mit den bereits in der Routinediagnostik etablierten Verfahren überprüft werden.

Abschließend sollte die Anwendbarkeit der multiplexen Immunoassays anhand verschiedener Patientenproben gezeigt werden. Hierfür standen Urinproben von Patienten mit einem Phäochromozytom, von Patienten mit verschiedenen Gedächtnisstörungen sowie Urinproben von Patienten mit verschiedenen Nierenerkrankungen zur Verfügung. Zusätzlich standen Urinproben von verschiedenen genmodifizierten Mäusen zur Verfügung, anhand derer in einer Zusammenarbeit mit der Universität in Turku (Finnland) die Rolle von Stress bei der Entwicklung von Fettleibigkeit und Stoffwechselerkrankungen untersucht werden sollte.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 *Urinproben*

Humaner Urin

Für die Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin in humanem Urin wurden Urinproben von Patienten mit verschiedenen Catecholamin-assoziierten Erkrankungen und von gesunden Spendern eingesetzt sowie ein kommerziell erhältlicher synthetischer Urin.

Spontanurin von Patienten mit einem gesicherten Phäochromozytom stand durch eine Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Nadine Koch von der Charité – Universitätsmedizin in Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und Internistische Intensivmedizin, zur Verfügung.

Spontanurin von Patienten mit verschiedenen Gedächtnisstörungen, vorwiegend mit leichten kognitiven Störungen sowie Alzheimer- und Parkinson-Demenz, stand durch eine Zusammenarbeit mit Prof. Christoph Laske aus dem Universitätsklinikum in Tübingen, Allgemeine Psychiatrie zur Verfügung.

Spontanurin von Patienten mit verschiedenen Nierenerkrankungen wurde ebenfalls von Frau Dr. med. Nadine Koch von der Charité – Universitätsmedizin in Berlin bereitgestellt.

Spontanurin von Patienten mit verschiedenen Krankheitsbildern wurde freundlicherweise von Dr. med. Andreas Peter aus dem Universitätsklinikum in Tübingen, Zentrallabor für den Vergleich zwischen multiplexen Immunoassays, ELISAs und HPLC zur Verfügung gestellt.

Synthetischer Urin (Art. Nr. 1000-D) wurde von der Firma Synthetic Urine e. K.-Vaihingen/Enz bezogen.

Kontrollurin von gesunden Personen wurde am NMI von freiwilligen Probanden gespendet.

Muriner Urin

Durch eine Zusammenarbeit mit Suvi Ruohonen, Universität Turku, Finnland stand für die Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin in murinem Urin 24 h-Urin von Wildtyp- und Adrenozeptor-Knockout-Mäusen zur Verfügung. Dabei

handelte es sich um 8 männliche und 8 weibliche Tiere mit einem Alpha-2AC-Adrenozeptor-Knockout, 11 männliche und 7 weibliche Tiere mit einem Alpha-2A-Adrenozeptor-Knockout sowie 9 männliche und 9 weibliche Wildtyp-Tiere.

3.1.2 Antikörper

Polyklonale Kaninchen-Antiseren wurden von der Firma LDN – Labor Diagnostika Nord, Nordhorn zur Verfügung gestellt. Da im Catecholamin-Assay die Catecholamine zunächst mit Hilfe der COMT *in vitro* methyliert werden, wird hier wie bei den Metanephrinen die methylierte Form nachgewiesen. Deshalb kann für die Catecholamine im multiplexen Catecholamin-Assay und ihre jeweiligen methylierten Abbauprodukte im multiplexen Metanephrin-Assay derselbe Antikörper eingesetzt werden. Somit sind für den Nachweis von sieben Analyten nur vier Antikörper notwendig. Tabelle 3 zeigt die verwendeten Antiseren.

Tabelle 3: Verwendete Antiseren.

Antiserum	Tier Nr.	Einsatz
anti-Metanephrin	7, 9, 10	Adrenalin- und Metanephrin-Assay
anti-Normetanephrin	6, 8, 9	Noradrenalin- und Normetanephrin-Assay
anti-3-Methoxytyramin	1,3	Dopamin- und 3-Methoxytyramin-Assay
anti-Serotonin	5, 9,10	Serotonin-Assay

3.1.3 Proteinkonjugate zur Antikörperaufreinigung

Die Proteinkonjugate zur Aufreinigung der polyklonalen Kaninchen-Antiseren wurden von der Firma LDN – Labor Diagnostika Nord, Nordhorn zur Verfügung gestellt. In Tabelle 4 sind die verwendeten Proteinkonjugate gelistet.

Tabelle 4: Proteinkonjugate zur Antikörperaufreinigung.

Bezeichnung	Analyt	Trägerprotein	Konzentration der Konjugatlösung
MN-TG	L-Metanephrin	Thyroglobulin	2 mg/mL
NMN-TG	L-Normetanephrin	Thyroglobulin	2 mg/mL
SERO-TG	Serotonin	Thyroglobulin	2 mg/mL
Ova-DOPA	3-Methoxytyramin	Ovalbumin	12,5 mg/mL

3.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Biotin-PEG(4)-Lys(PEG(4)-Biotin)-PEG(4)-NHS	Iris Biotech, Marktredwitz, Deutschland
Citronensäure (wasserfrei)	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, MO, USA
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (wasserfrei)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dopaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDC	Pierce, Rockford, IL, USA
(-)-Epinephrin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Esel-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Esel-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper-PE	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanolamin	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Histidin	bereitgestellt von LDN, Nordhorn, Deutschland
Homovanillinsäure	bereitgestellt von LDN, Nordhorn, Deutschland
5-Hydroxyindolessigsäure	bereitgestellt von LDN, Nordhorn, Deutschland
5-Hydroxytryptophan	bereitgestellt von LDN, Nordhorn, Deutschland
Kaffeensäure	bereitgestellt von LDN, Nordhorn, Deutschland
L-DOPA	bereitgestellt von LDN, Nordhorn, Deutschland
LiquiChip System Fluid (10x Konzentrat)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Melatonin	bereitgestellt von LDN, Nordhorn, Deutschland
MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
D,L-Metanephrin	bereitgestellt von LDN, Nordhorn, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol	bereitgestellt von LDN, Nordhorn, Deutschland
3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure	bereitgestellt von LDN, Nordhorn, Deutschland
3-Methoxytyraminhydrochlorid	bereitgestellt von LDN, Nordhorn, Deutschland
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Fortsetzung Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge, 1 N	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NHS-PEG ₁₂ -Biotin	Pierce, Rockford, IL, USA
NHS-PEG ₄ -Biotin	Pierce, Rockford, IL, USA
L-(-)-Norepinephrin(+)-bitartrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
D,L-Norepinephrinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Norepinephrinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
D,L-Normetanephrinhydrochlorid	bereitgestellt von LDN, Nordhorn, Deutschland
Phenylalanin	bereitgestellt von LDN, Nordhorn, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Serotonin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Serva Blue R	Serva, Heidelberg, Deutschland
Streptavidin R-Phycoerythrin Jackson	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Streptavidin R-Phycoerythrin PJ31S	Prozyme, Hayward, CA, USA
Streptavidin R-Phycoerythrin PJRS50	Prozyme, Hayward, CA, USA
Streptavidin-R-Phycoerythrin S-21388	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Streptavidin R-Phycoerythrin SAPE-001	Moss Inc., Pasadena, MD, USA
Streptavidin R-Phycoerythrin Sigma	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Streptavidin-R-Phycoerythrin	Moss Inc., Pasadena, MD, USA
Sonderanfertigung 1 & 2	
Streptavidin-R-Phycoerythrin	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Sonderanfertigung 3	
Sulfo-NHS	Pierce, Rockford, IL, USA
TRIS Pufferan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tryptamin	bereitgestellt von LDN, Nordhorn, Deutschland
Tyramin	bereitgestellt von LDN, Nordhorn, Deutschland
Tyrosin	bereitgestellt von LDN, Nordhorn, Deutschland

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Dry Urine Test-Filterkarten	LDN, Nordhorn, Deutschland
Indikatorpapier pH 5,0-9,0	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Luminex MagPlex Mikrosphären	Luminex Corp., Austin, TX, USA
Luminex MicroPlex Mikrosphären	Luminex Corp., Austin, TX, USA
Mikrotiterplatte, 48- oder 96-Well, glasklar	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Mikrotiterplatte, 96-Well, mit Filtereinheit	EMD Millipore Corp., Billerica, MA, USA
Mikrotiterplatte, 96-Well, weiß, mit halber Oberfläche, <i>non-binding</i> Oberfläche	Corning, Corning, NY, USA
NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Protein A/G Plus Agarose	Pierce, Rockford, IL, USA
Protein LoBind tubes, 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße, 1,5 mL	Vetter, Ammerbuch, Deutschland
Reaktionsgefäße, 2 mL	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Streptavidin-Sepharose	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Urinsammelröhrchen	LDN, Nordhorn, Deutschland

3.1.6 Kits

Tabelle 7: Verwendete Kits.

Kit/Kit Komponente	Hersteller
3-CAT ELISA Fast Track	LDN, Nordhorn, Deutschland
Coomassie Protein Assay Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
2-MET Urine ELISA Fast Track	LDN, Nordhorn, Deutschland
MicroVue Creatinine	Quidel Corp., San Diego, CA, USA
NuPAGE Antioxidant	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20x)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Serotonin ELISA Fast Track	LDN, Nordhorn, Deutschland

3.1.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 8: Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Hersteller
Aktivierungsmix	100 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 6,2 5 mg/mL EDC 5 mg/mL Sulfo-NHS
Aktivierungspuffer, pH 6,2	100 mM Na ₂ HPO ₄
Ansäuerungspuffer	1 mM HCl
Bindepuffer, pH 8,4	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl
Bindepuffer (Protein A/G), pH 7,0	12,26 mM NaH ₂ PO ₄ 7,74 mM Na ₂ HPO ₄ 150 mM NaCl
Blockierungspuffer, pH 8,3	0,5 M Ethanolamin 0,5 M NaCl
Blocking Reagent for ELISA	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland 50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 % (w/v) gereinigte Gelatine
Coomassie-Färbelösung	0,2 % (w/v) Serva Blue R 50 % Methanol 10 % Essigsäure
Elutionspuffer, pH 2,5 oder pH 3,0	100 mM Citrat

Fortsetzung Tabelle 8: Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Hersteller
Entfärber II	10 % Ethanol 5 % Essigsäure
Kopplungspuffer, pH 5,0 (Mikrosphären)	50 mM MES
Kopplungspuffer, pH 8,3 (Proteinkonjugate)	0,2 M NaHCO ₃ 0,5 M NaCl
LDN Standardmatrix	LDN, Nordhorn, Germany Zusammensetzung nicht verfügbar
LowCross-Puffer	Candor Bioscience, Wangen, Deutschland Zusammensetzung nicht verfügbar
PBS, pH 7,4	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
PBS/0,5 % BSA/Tween, pH 7,4	PBS 0,5 % BSA 0,05 % Tween 20
Waschpuffer (LDN) mit Glycin, pH 7,2	LDN Wash Buffer (BA E-0030) 100 mM Glycin
Waschpuffer (Mikrosphären), pH 7,4	PBS 0,05 % (v/v) Tween 20
Waschpuffer (Proteinkonjugate), pH 4,0	100 mM Natriumacetat 0,5 M NaCl
Waschpuffer 1 (Protein A/G), pH 7,0	12,26 mM NaH ₂ PO ₄ 7,74 mM Na ₂ HPO ₄
Waschpuffer 2 (Protein A/G), pH 7,0	Waschpuffer 1 mit 300 mM NaCl

3.1.8 Geräte

Tabelle 9: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Analysenwaage Explorer E12140	OHAUS, Pine Brook, NJ, USA
CanoScan 8800F	Canon, Tokio, Japan
ELx808 Absorbance Microplate Reader	BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA
EnVision 2102 Multilabel Reader	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
FLEXMAP 3D	Luminex Corp., Austin, TX, USA
FLUOstar Optima	BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland
Luminex 100	Luminex Corp., Austin, TX, USA
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter 766	Knick, Berlin, Deutschland
PHERAStar	BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland
PowerEase 500 Spannungsquelle	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tube Rotator	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Vakuum-Absaugstation	EMD Millipore Corp., Billerica, MA, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
XCell SureLock Mini-Cell	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.1.9 Software

Tabelle 10: Verwendete Software.

Software	Hersteller
ChemSketch V 12.01	Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Kanada
Gen5 V 1.07.05 (ELx808 Microplate Reader)	BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA
EndNote X6	Thomson Reuters, New York City, NY, USA
Wallac EnVision Manager 1.12	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
MasterPlex QT V 5.0.0.68	MiraiBio, San Francisco, CA, USA
Multi Experiment Viewer V 4.9.0 (TM4 Microarray Software Suite)	Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA [127]
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
RExcel V 3.2.13	Statconn, Krems, Österreich
RStudio V 0.97.551	RStudio, Inc., Boston, MA, USA
SilverFast SE 6.5.5r2	LaserSoft Imaging AG, Kiel, Deutschland
XLfit	IDBS, Guildford, UK
xPONENT 4.0.846.0 SP1	Luminex Corp. Austin, TX, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Biochemische Methoden

3.2.1.1 Herstellung polyklonaler Antiseren

Die polyklonalen Antiseren aus Kaninchen wurden von der Firma LDN, Nordhorn zur Verfügung gestellt. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte bei Pineda Antikörper Service, Berlin. Die Immunisierungskonjugate wurden ebenfalls von der Firma LDN bereitgestellt. Dabei handelte es sich um Konjugate aus D,L-Metanephrin, D,L-Normetanephrin, 3-Methoxytyramin oder Serotonin mit BSA als Trägerprotein. Für jeden Analyten wurden jeweils zehn Kaninchen immunisiert. Die Immunisierungsdauer betrug zwischen 90 und 150 Tage.

3.2.1.2 Aufreinigung von Antikörpern aus polyklonalen Kaninchen-Antiseren

Die Aufreinigung von Antikörpern aus polyklonalen Kaninchen-Antiseren erfolgte im *batch*-Verfahren mit Hilfe der Affinitätschromatographie. Da jedoch zumeist ein Aufreinigungsschritt nicht ausreichend war, um einen spezifischen Antikörper in einer für die Immobilisierung auf Mikrosphären ausreichenden Reinheit zu erhalten, wurde für jedes Antiserum eine geeignete Aufreinigungsstrategie entwickelt. Da das Maximalvolumen für die Durchführung der Aufreinigung im *batch*-Verfahren 2 mL betrug, wurden folgende Volumina gewählt: 400 μ L NHS-aktivierte Sepharose 4 Fast Flow, 200 μ L Proteinkonjugat-Lösung und 1,35 mL Antiserum.

Kopplung der Proteinkonjugate an NHS-aktivierte Sepharose

Für die Herstellung der mit den Proteinkonjugaten für die Aufreinigung gekoppelten Sepharose wurden die Proteinkonjugate zunächst mit Kopplungspuffer verdünnt. Hierfür wurden 50 μ L des jeweiligen Proteinkonjugats (MN-TG, NMN-TG, SERO-TG, Ova-DOPA, siehe Tabelle 4) mit 150 μ L Kopplungspuffer auf eine Konzentration von 0,5 mg/mL verdünnt bzw. für Ova-DOPA 8 μ L Konjugat mit 192 μ L Kopplungspuffer. 400 μ L NHS-aktivierte Sepharose wurden zunächst dreimal mit 400 μ L eiskalter 1 mM HCl (Ansäuerungspuffer) gewaschen, um sie von der Aufbewahrungslösung (Isopropanol) zu befreien. Anschließend wurde sehr kurz mit 400 μ L Kopplungspuffer gewaschen, um den pH-Wert wieder etwas zu erhöhen. Nach Zugabe von 200 μ L Proteinkonjugatlösung wurde für 3 h bei Raumtemperatur auf dem Rotator inkubiert. Anschließend wurde nicht gekoppeltes Proteinkonjugat durch eine Folge von Waschschritten entfernt und die noch restlichen aktiven NHS-Gruppen der Sepharose blockiert (Blockierungspuffer). Zwischen den Waschschritten wurde 1 min bei 9300 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Lagerung der gekoppelten Sepharose erfolgte in PBS/0,1 % NaN₃, pH 7,4 bei 4 °C.

Tabelle 11 zeigt die Abfolge der Wasch- und Blockierungsschritte nach der Kopplung der Proteinkonjugate auf das Sepharosematerial.

Tabelle 11: Abfolge der Wasch- und Blockierungsschritte nach der Kopplung der Proteinkonjugate auf das Sepharosematerial.

Waschpuffer	Häufigkeit/Volumen
Blockierungspuffer	3x mit 0,4 mL
Waschpuffer (Proteinkonjugate)	3x mit 0,4 mL
Blockierungspuffer	3x mit 0,4 mL
Inkubation: 30 min, RT, Rotator	
Waschpuffer (Proteinkonjugate)	3x mit 0,4 mL
Blockierungspuffer	3x mit 0,4 mL
Waschpuffer (Proteinkonjugate)	3x mit 0,4 mL
PBS/0,1% NaN ₃ , pH 7,4	5x mit 0,4 mL

Da der pH-Wert während der Lagerung 7,4 betragen sollte, wurde am Schluss der pH-Wert im Überstand der Sepharose-Lösung mittels Indikatorpapier überprüft und gegebenenfalls nochmals mit PBS/0,1 % NaN₃ gewaschen.

Für die Durchführung der prä-Adsorption bei der Aufreinigung des Metanephrin-Antiserums wurden die Proteinkonjugate NMN-TG, SERO-TG und Ova-DOPA gleichzeitig auf die Sepharose gekoppelt. Hierfür wurden 50 µL NMN-TG, 50 µL SERO-TG und 8 µL Ova-DOPA mit 92 µL Kopplungspuffer verdünnt und auf 400 µL NHS-aktivierte Sepharose wie oben beschrieben gekoppelt.

Aufreinigung des Metanephrin-Antiserums

Zunächst wurden aus dem Metanephrin-Antiserum mit Hilfe der Affinitätschromatographie an NMN-TG, SERO-TG und Ova-DOPA die an diese Konjugate bindenden Antikörper abgereichert, um später unspezifische Bindungen und Kreuzreaktivitäten im Assay zu vermeiden. Durch diese prä-Adsorption an den „falschen“ Antigenen sollten im Eluat keine Antikörper mehr enthalten sein, die unspezifisch an Normetanephrin, Serotonin oder 3-Methoxytyramin binden. Die zuvor mit NMN-TG, SERO-TG und Ova-DOPA gekoppelte Sepharose wurde dreimal mit 0,4 mL Bindepuffer gewaschen. 1,35 mL Metanephrin-Antiserum wurden mit 0,15 mL 10-fach Bindepuffer versetzt und auf das Sepharosematerial gegeben. Anschließend wurde für 90 min bei RT auf dem Rotator inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (1 min, 9300 x g) wurde der Überstand, der nun die nicht gebundenen Antikörper enthielt, vorsichtig abgenommen und auf eine zuvor dreimal mit 0,4 mL Bindepuffer gewaschene MN-TG gekoppelte Sepharose gegeben. Daraufhin

wurde erneut 90 min bei RT im Rotator inkubiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die Sepharose wurde 5-mal mit 0,4 mL PBS, pH 8,4 gewaschen, zwischen den Waschschritten wurde 1-2 min auf dem Rotator inkubiert. Nach den Waschschritten wurden 4 Elutionsschritte durchgeführt. Es wurden jeweils 150 µL Elutionspuffer auf die Sepharose gegeben und für 15 min, 10 min, 5 min und nochmals 5 min auf dem Rotator inkubiert. Zwischen den Elutionsschritten wurde zentrifugiert (1 min, 9300 x g), der Überstand vorsichtig abgenommen und sofort mit 1 N NaOH neutralisiert, der pH-Wert wurde mit Hilfe von Indikatorpapier überprüft. Die vier Eluate wurden mit 0,1 % NaN₃ versetzt und bei 4 °C gelagert. Die Sepharose wurde für die Lagerung 7-mal mit PBS/0,1 % NaN₃, pH 7,4 gewaschen und bei 4 °C gelagert. Die vier Eluate wurden anschließend mit Hilfe der LDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf ihre Reinheit überprüft und zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Eluate mit ausreichender Reinheit und ausreichend hohem Proteingehalt wurden vereinigt und für die Immobilisierung auf Mikrosphären verwendet.

Aufreinigung des Normetanephrin-Antiserums

Das Normetanephrin-Antiserum wurde ebenfalls in 2 Schritten aufgereinigt. Zunächst wurde hier eine Aufreinigung mit Hilfe von Protein A/G und anschließend eine Aufreinigung mit dem spezifischen Antigen NMN-TG durchgeführt. Protein A stammt aus *Staphylococcus aureus* und bindet Immunglobuline, vor allem IgG, an deren Fc-Teil. Protein G stammt aus Bakterien der Gattung *Streptococcus* und bindet ebenfalls hauptsächlich an den Fc-Teil von IgG. Protein A/G ist ein rekombinantes Fusionsprotein, das die IgG-bindenden Domänen beider Proteine enthält und daher das breiteste Spektrum an IgG-Subklassen bindet.

Für die Aufreinigung wurden 1 mL Protein A/G Plus Agarose in einem 2 mL Reaktionsgefäß dreimal mit 1,4 mL Bindepuffer (Protein A/G) gewaschen, um die Aufbewahrungslösung zu entfernen. Anschließend wurden 1,17 mL Normetanephrin-Antiserum mit 130 µL 10-fach Bindepuffer (Protein A/G) versetzt und zu der gewaschenen Protein A/G Plus Agarose gegeben. Die Inkubation erfolgte anschließend für 90 min bei RT auf dem Rotator. Nach der Inkubation wurde zentrifugiert (1 min, 9300 x g) und der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Der erste Waschschriff erfolgte mit 1,4 mL Waschpuffer 1 (Protein A/G) für 1-2 min auf dem Rotator, anschließend wurde zweimal mit 1,4 mL Waschpuffer 2 (Protein A/G) für 1-2 min gewaschen. Zuletzt erfolgten wiederum zwei Waschschriffe mit Waschpuffer 1 (Protein A/G) für 1-2 min. Nach

Entfernen des Überstands des letzten Waschschruttes wurde mit 0,5 mL Elutionspuffer pH 3,0 eluiert. Es wurden insgesamt 4 Elutionsschritte mit jeweils 0,5 mL Elutionspuffer durchgeführt, die Inkubationszeit betrug bei jedem Schritt 5 min. Die Eluate wurden sofort mit 1 N NaOH neutralisiert und mit 0,1 % NaN₃ versetzt. Die Protein A/G Plus Agarose wurde am Ende 5-mal mit PBS/0,1 % NaN₃, pH 7,4 gewaschen und bei 4 °C gelagert.

Die vier Eluate wurden anschließend mit Hilfe der LDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf Reinheit überprüft und zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Eluate mit ausreichender Reinheit und ausreichend hohem Proteingehalt wurden vereinigt und für die Affinitätsaufreinigung über das Antigen NMN-TG eingesetzt. Die Durchführung der Aufreinigung über NMN-TG entspricht der Durchführung der Aufreinigung über MN-TG wie im Abschnitt Aufreinigung des Metanephrin-Antiserums beschrieben.

Aufreinigung des 3-Methoxytyramin-Antiserums

Zur Aufreinigung des 3-Methoxytyramin-Antiserums wurde eine Affinitätsaufreinigung über Ova-DOPA durchgeführt. Die Durchführung entspricht ebenfalls der Aufreinigung über MN-TG wie im Abschnitt Aufreinigung des Metanephrin-Antiserums beschrieben.

Aufreinigung des Serotonin-Antiserums

Für die Aufreinigung des Serotonin-Antiserums wurden zwei Aufreinigungsschritte benötigt, eine Affinitätsaufreinigung über SERO-TG sowie anschließend eine Biotin-Depletion. Die Durchführung der Affinitätsaufreinigung über SERO-TG entspricht ebenfalls der Aufreinigung über MN-TG wie im Abschnitt Aufreinigung des Metanephrin-Antiserums beschrieben. Die gewonnenen vier Eluate wurden anschließend mit Hilfe der LDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf Reinheit überprüft und zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Eluate mit ausreichender Reinheit und ausreichend hohem Proteingehalt wurden vereinigt und anschließend für die Biotin-Depletion eingesetzt. Hierfür wurden 600 µL Streptavidin-Sepharose in einem 2 mL Reaktionsgefäß dreimal mit je 1 mL PBS gewaschen. 300 µL der vereinigten Eluate wurden zu der gewaschenen Streptavidin-Sepharose gegeben und für 30 min bei RT auf dem Rotator inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (1 min, 9300 x g) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß mit 600 µL gewaschener Streptavidin-Sepharose gegeben. Es wurde wiederum 30 min bei RT auf dem Rotator inkubiert, anschließend zentrifugiert und der Überstand in ein

sauberes Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,1 % NaN_3 wurde der aufgereinigte Antikörper bei 4 °C gelagert und anschließend für die Immobilisierung auf Mikrosphären eingesetzt.

3.2.1.3 LDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Coomassie-Färbung

Um den Erfolg der Antikörperaufreinigung sowie die Reinheit der Eluate zu überprüfen, wurde eine LDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (LDS-PAGE) durchgeführt. Hierfür wurde das NuPAGE System der Firma Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) verwendet. Da vor Durchführung der LDS-PAGE keine Proteinbestimmung durchgeführt wurde und anhand des Gels nur ein qualitatives Ergebnis erhalten werden sollte, wurde keine einheitliche Proteinmenge sondern mit jeweils 10 μL ein konstantes Volumen der Eluate auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden 5 μL des Sepharose-Materials vor und nach Elution des gebundenen Antikörpers auf das Gel aufgetragen, um die Vollständigkeit der Elution zu überprüfen. Die Proben wurden mit 5 μL NuPAGE LDS Sample Buffer (4x) und 2 μL NuPAGE Sample Reducing Agent (10x) versetzt und mit 3 μL bzw. 8 μL ddH_2O auf ein Gesamtvolumen von 20 μL aufgefüllt. Die Proben wurden für 10 min bei 70 °C denaturiert (Mastercycler gradient). 15 μL Probe bzw. 5 μL SeeBlue Plus2 Proteinstandard wurden anschließend auf ein NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde NuPAGE MES SDS Running Buffer verwendet, wobei zur inneren Gelkammer 500 μL NuPAGE Antioxidant hinzugefügt wurden. Die Gelelektrophorese wurde für 42 min bei konstanter Spannung von 200 V durchgeführt.

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele für 45 min in Coomassie-Färbelösung angefärbt. Zum Entfärben wurden die Gele zunächst für 30 min in Entfärber I inkubiert und anschließend bis zum Sichtbarwerden der Banden bzw. vollständiger Entfärbung des Hintergrunds in Entfärber II. Die Geldokumentation erfolgte mit Hilfe des Scanners CanoScan 8800 F und der Software SilverFast SE 6.5.5r2.

3.2.1.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Um die Proteinkonzentration in den Eluaten nach der Protein A/G- bzw. Affinitätsaufreinigung und nach der Biotin-Depletion zu bestimmen, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt [128]. Diese beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie-Brilliantblau G-250 in saurem Milieu von 465 nm zu 595 nm in Gegenwart von Proteinen. Der Farbstoff bindet dabei an kationische sowie unpolare Seitenketten von Proteinen.

Zur Generierung der Standardkurve wurde BSA verwendet. Dafür wurden zwölf BSA-Lösungen im Konzentrationsbereich von 0-2000 µg/mL in PBS hergestellt. 5 µL Eluat bzw. BSA-Standard wurden mit 250 µL Coomassie Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific) versetzt und für 30 s zur Durchmischung geschüttelt. Anschließend wurde für 10 min bei RT inkubiert und danach die Absorption bei 590 nm gemessen (FLUOstar Optima/ PHERAstar, BMG Labtech).

3.2.1.5 Bestimmung von Kreatinin im Urin

Für die Bestimmung von Kreatinin in humanem und murinem Urin wurde der MicroVue Creatinine Assay der Firma Quidel Corp. verwendet. Dieser quantitative, kolorimetrische Assay basiert auf der Jaffé-Methode [129]. Die Methode nutzt die Bildung eines roten Komplexes zwischen dem Kreatinin im Urin und Pikrinsäure in alkalischer Lösung, welcher anschließend bei 490 nm spektrophotometrisch gemessen werden kann.

Der Assay wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt, jedoch war bei einigen humanen Urinproben sowie bei allen murinen Urinproben die vorgeschlagene Verdünnung von 1:40 zu hoch. Daher mussten diese humanen Urinproben 1:20 bzw. 1:10 und die murinen Urinproben 1:15 verdünnt werden. Die Messung der Absorption bei 490 nm erfolgte mit Hilfe des EnVision 2102 Multilabel Reader (Perkin Elmer).

3.2.2 Sammeln von Urinproben

Sammeln von Urinproben mit Hilfe von Urinsammelröhrchen

Die Urinproben der Kontrollpatienten und der Patienten aus der Psychiatrie des Universitätsklinikums in Tübingen sowie die Urinproben, die während der Assayentwicklung eingesetzt wurden, wurden mit Hilfe von Urinsammelröhrchen der Firma LDN gesammelt. Diese Urinsammelröhrchen fassen ein Volumen von 3 mL und enthalten ein Watteschwämmchen, welches mit HCl, Stabilisatoren sowie einem Indikator getränkt und anschließend getrocknet wurde. Für die Gewinnung von Spontanurin wurde zunächst in einem Urinsammelbecher Mittelstrahlurin gesammelt. Anschließend wurden sofort 3 mL des Urins in ein LDN Urinsammelröhrchen überführt und gemischt. Der im Watteschwämmchen enthaltene Indikator zeigte an, ob die Ansäuerung des Urins ausreichend war. Anschließend wurden die Urinröhrchen bei -20 °C eingefroren.

Die Spontanurinproben der übrigen Patienten wurden jeweils entsprechend den internen Sammelverfahren der Kooperationspartner gesammelt.

Sammeln von Urin mit Dry Urine Test-Filterkarten

Für das Sammeln von Urin mittels *Dry Urine Test-Filterkarten* (DUT-Filterkarten) wurden DUT-Filterkarten von der Firma LDN bereitgestellt. Zunächst wurde auch hier Mittelstrahlurin gewonnen. Dieser wurde in das DUT-Urinsammelgefäß überführt, welches Stabilisatoren sowie einen Indikator enthält. Anschließend wurde die Filterkarte in den Urin im Sammelgefäß eingetaucht, gefaltet und für 24 h bei RT getrocknet. Abbildung 9 zeigt die Herstelleranleitung zum Sammeln von Urin mit Hilfe der DUT-Filterkarten.

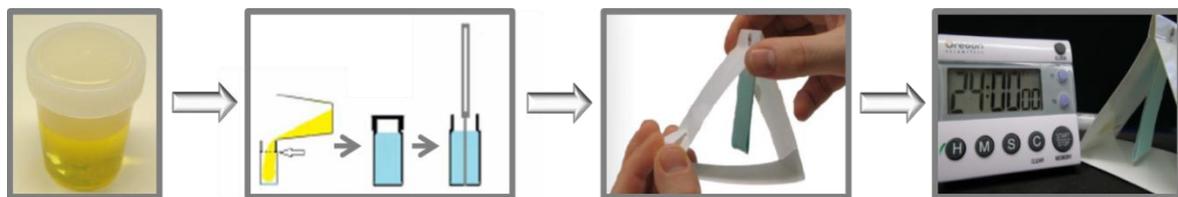


Abbildung 9: Sammeln von Urinproben mit Hilfe von DUT-Filterkarten der Firma LDN. Nach Gewinnung von Mittelstrahlurin wird der Urin in das DUT-Urinsammelgefäß, das Stabilisatoren und einen Indikator enthält, überführt. Anschließend wird die DUT-Filterkarte in das Urinsammelgefäß eingetaucht, gefaltet und für 24 h bei RT getrocknet. Modifiziert nach [130].

Für die Elution der Analyten aus der Filterkarte wurde diese nach 24 h abgeschnitten, in ein Plastikröhrchen gelegt und mit 3 mL ddH₂O getränkt. Anschließend wurde für 1 h bei RT auf dem Rotator inkubiert. Danach wurde die Filterkarte ausgepresst und die gewonnene Flüssigkeit in ein sauberes Gefäß überführt. Die Filterkarte nimmt etwa 1 mL Urin auf, daher erfolgt durch die Elution mit 3 mL ddH₂O eine Verdünnung der Probe um den Faktor 3, welcher anschließend bei der Berechnung der Analytkonzentration berücksichtigt werden muss.

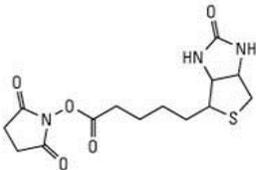
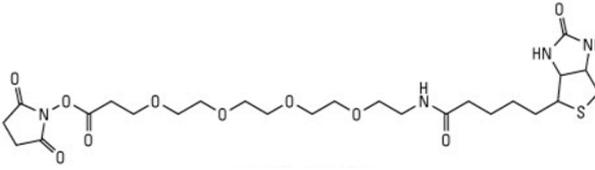
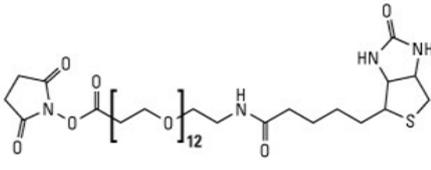
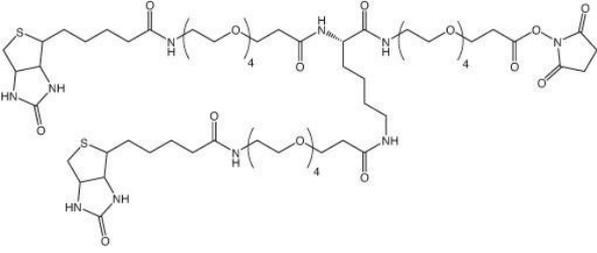
3.2.3 Probenvorbereitung für die Quantifizierung von Catecholaminen

Für die Extraktion, Acylierung und enzymatische Umwandlung der Catecholamine aus Urin wurden die Materialien und Reagenzien aus dem 3-CAT ELISA Fast Track der Firma LDN verwendet. Das Prinzip der Extraktion, Acylierung und Elution, welches für die Probenvorbereitung verwendet wurde, ist ein von der Firma LDN patentiertes Verfahren (EPO Patent EP1835290; Assay for catecholamines, (2007-09-19), Manz, Bernhard. Pr.: EP20060005531 20060317). Die Durchführung erfolgte nicht exakt nach Herstellerangaben, sondern wurde auf die Durchführung des multiplexen Immunoassays angepasst.

3.2.3.1 Extraktion und Acylierung der Catecholamine

Die Extraktion erfolgte mit Hilfe eines Boronat-Affinitätsgels, welches spezifisch cis-diol Strukturen, zu denen auch die Catecholamine gehören, bei pH > 7 bindet. Somit erfolgt eine Trennung von den im Urin enthaltenen Metanephrinen, da hier die cis-diol Struktur durch Methylierung einer OH-Gruppe nicht mehr vorhanden ist. Dies ist erforderlich, da die eingesetzten Antikörper nur die methylierte Form der Catecholamine erkennen. Für die Extraktion wurden 10 µL Standard, Kontrolle oder Urin auf die Extraktionsplatte, welche mit dem Boronat-Affinitätsgel beschichtet war, pipettiert. Anschließend wurden 250 µL ddH₂O, 50 µL Assaypuffer und 50 µL Extraktionspuffer zu den Urinproben hinzugefügt und für 30 min bei RT geschüttelt (Thermomixer comfort, 750 rpm). Nach der Extraktion wurde die Flüssigkeit durch Invertieren der Platte entfernt, die Platte auf saugfähigen Papiertüchern ausgeklopft und 1 mL Waschpuffer (LDN) hinzugefügt. Es wurde 5 min bei RT und 600 rpm inkubiert und der Waschschrift anschließend nochmals wiederholt. Nach Entfernen der Waschlösung und dem Ausklopfen der Platte folgte die Acylierung. Für die Acylierung wurden in der Entwicklungsphase das Acylierungsreagenz des 3-CAT ELISA sowie verschiedene andere Acylierungsreagenzien verwendet, wobei nach der Entwicklungsphase nur noch NHS-PEG₁₂-Biotin für die Acylierung eingesetzt wurde. Tabelle 12 zeigt die verwendeten Acylierungsreagenzien.

Tabelle 12: Verwendete Acylierungsreagenzien für die Acylierung von Catecholaminen.
 Quelle Strukturformeln: www.piercenet.com, www.iris-biotech.de.

Acylierungsreagenzien	Struktur	Eigenschaften/ Verwendung
NHS-Biotin		<ul style="list-style-type: none"> • MW 341,38 • Spacer: 13,5 Å • Verwendung in Entwicklungsphase
NHS-PEG ₄ -Biotin		<ul style="list-style-type: none"> • MW 588,67 • Spacer: 29 Å • Verwendung in Entwicklungsphase
NHS-PEG ₁₂ -Biotin		<ul style="list-style-type: none"> • MW 941,09 • Spacer: 56 Å • Verwendung im etablierten Assay
„Doppel-Biotin“		<ul style="list-style-type: none"> • MW 1437,71 • Spacer: k. A. • Verwendung in Entwicklungsphase

Biotin-PEG(4)-Lys(PEG(4)-Biotin)-PEG(4)-NHS

Für die Acylierung wurden 150 µL Acylierungspuffer und 25 µL Acylierungsreagenz in wasserfreiem DMSO zu jeder Probe auf die Extraktionsplatte gegeben und für 30 min bei RT und 750 rpm inkubiert. Nach der Acylierung wurde die Flüssigkeit durch Invertieren der Platte entfernt, die Platte auf saugfähigen Papiertüchern ausgeklopft und 1 mL Waschpuffer (LDN) mit Glycin hinzugefügt. Es wurde 15 min bei RT und 600 rpm inkubiert. Anschließend wurde nochmals gewaschen, dieses Mal jedoch mit 1 mL Waschpuffer (LDN) ohne Glycin für 10 min bei RT und 600 rpm. Nach Entfernen der Waschlösung und Ausklopfen der Platte wurde die Probe durch Zugabe von 100 µL HCl sauer eluiert. Die Elution erfolgte für 10 min bei RT und 750 rpm. Nach der Elution wurde der Extrakt für die enzymatische Umwandlung eingesetzt.

3.2.3.2 Enzymatische Umwandlung des Catecholamin-Extrakts

Nach der Elution erfolgte die enzymatische Umwandlung der acylierten Catecholamine mit Hilfe der Catechol-O-Methyltransferase. Diese methyliert wie auch beim Abbauweg im Körper die Catecholamine spezifisch an der 3'OH-Gruppe. Die COMT wird hierzu aus Schweineleber gewonnen, als Coenzym wurde S-Adenosylmethionin hinzugegeben.

Für die enzymatische Umwandlung wurden 25 μL des Extrakts auf eine 96-Well Mikrotiterplatte mit halber Oberfläche und *non-binding* Oberfläche transferiert. Das lyophilisierte Enzym wurde in 1 mL ddH₂O gelöst und mit 300 μL Coenzym und 700 μL *Adjustment Buffer* versetzt. Anschließend wurden 6,2 μL der fertigen Enzymlösung zum Extrakt gegeben. Der *Adjustment Buffer* bewirkt, dass der niedrige pH-Wert des salzsauren Eluats auf einen neutralen pH-Wert erhöht wird, bei welchem die COMT arbeiten kann. Da in der Salzsäure der Indikator Phenolrot enthalten ist, kann die Neutralisation gut anhand der roten Färbung des Extraktes verfolgt werden. Die enzymatische Umwandlung erfolgte für 1 h bei RT und 750 rpm. Anschließend wurden die acylierten und methylierten Catecholamine im *Bead*-basierten Immunoassay eingesetzt. Abbildung 10 zeigt schematisch die Probenvorbereitung für die Catecholamine.

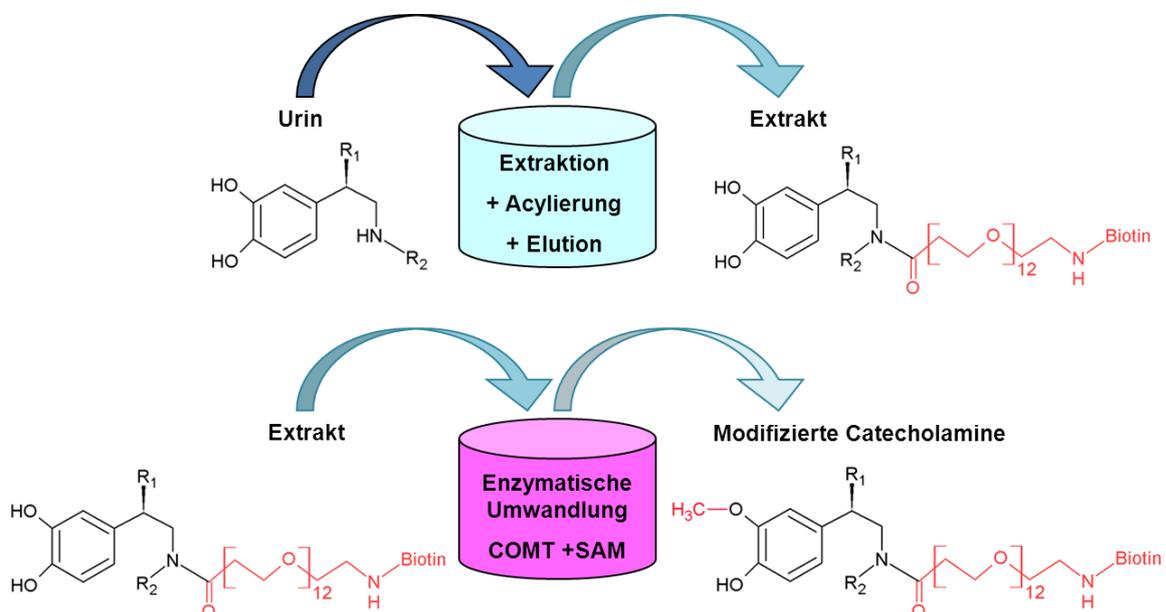


Abbildung 10: Probenvorbereitung für die Quantifizierung von Catecholaminen. Zunächst erfolgt die Extraktion der Catecholamine aus der Probenmatrix mit Hilfe eines cis-diol spezifischen Boronat-Gels. Anschließend erfolgt die Acylierung mit NHS-PEG₁₂-Biotin an der primären bzw. sekundären Aminogruppe. Nach saurer Elution mittels HCl werden 25 μL Extrakt auf eine 96-Well Mikrotiterplatte transferiert und mit einer Enzymlösung versetzt, die das Enzym Catechol-O-Methyltransferase (COMT) und das Coenzym S-Adenosylmethionin (SAM) sowie *Adjustment Buffer* zur Neutralisierung enthält.

3.2.4 Probenvorbereitung für die Quantifizierung von Metanephrinen und Serotonin

Für die Quantifizierung von Metanephrinen und Serotonin im Urin ist im Gegensatz zu den Catecholaminen keine Extraktion und enzymatische Umwandlung notwendig, sondern nur eine Acylierung. Da in den in dieser Arbeit beschriebenen Assays nur freie Metanephriene im Urin bestimmt werden, wird während der Probenvorbereitung keine saure Hydrolyse durchgeführt. Für die Acylierung wurden die Reagenzien aus dem 2-MET Urine ELISA Fast Track Kit sowie Serotonin-ELISA Fast Track Kit der Firma LDN verwendet. Zusätzlich wurde ein spezieller Acylierungspuffer von der Firma LDN bereitgestellt, welcher kein BSA enthielt. Auch hier erfolgte die Durchführung nicht exakt nach Herstellerangaben, sondern wurde auf die Durchführung des multiplexen Immunoassays angepasst.

3.2.4.1 Acylierung von Metanephrinen und Serotonin

Da die im Immunoassay verwendeten Antikörper nur die an der 3'OH-Gruppe methylierten Catecholamine erkennen, also die jeweiligen Metanephriene, muss hier keine Extraktion durchgeführt werden, da die im Urin enthaltenen Catecholamine nicht erkannt werden. Hier konnte also gleich mit der Acylierung begonnen werden. Für die Acylierung von Metanephrinen und Serotonin wurden ebenfalls die in Tabelle 12 gezeigten Acylierungsreagenzien verwendet. Für die Acylierung wurden 30 µL Standard bzw. Kontrolle und 10 µL Urin in eine 48-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Die Standards bzw. Kontrollen setzten sich zusammen aus 10 µL 2-MET Urine ELISA Standards bzw. Kontrollen mit Metanephrin und Normetanephrin, 10 µL Serotonin-ELISA Standard bzw. Kontrolle und 10 µL selbst angesetztem 3-Methoxytyramin-Standard, da hier kein kommerziell erhältlicher ELISA verfügbar war. Dazu wurde 3-Methoxytyramin in einer von der Firma LDN bereitgestellten Standardmatrix gelöst und entsprechend verdünnt. Standards und Kontrollen wurden mit 170 µL, Urinproben mit 190 µL Acylierungspuffer versetzt und anschließend wurde durch Zugabe von 10 µL Acylierungsreagenz die Acylierung gestartet. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei RT und 750 rpm.

3.2.4.2 Abstoppen der Acylierungsreaktion

Da bei den Metanephrinen und Serotonin keine Waschschriffe nach der Acylierung erfolgen, wurde, um noch reaktives Acylierungsreagenz aus dem Ansatz zu entfernen,

Glycin oder Ethanolamin verwendet. Dieses reagiert mit dem noch vorhandenen NHS ab, damit dieses später im Immunoassay nicht stört. Hierfür wurden 20 µL 100 mM oder 300 mM Glycin oder Ethanolamin zum acylierten Ansatz pipettiert und die Acylierungsreaktion für 30 min bei RT und 750 rpm abgestoppt. Nach der Abstoppreaktion wurden 25 µL des acylierten Ansatzes im Immunoassay eingesetzt.

3.2.5 Multiplexe Immunoassays

Die wie unter Punkt 3.2.3 und 3.2.4 beschriebenen modifizierten Catecholamine, Metanephrene und Serotonin wurden in zwei verschiedenen multiplexen Immunoassays eingesetzt. Dabei handelte es sich um einen *Bead*-basierten Immunoassay für die Quantifizierung von Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin sowie einen *Bead*-basierten Immunoassay für die Quantifizierung von Metanephrin, Normetanephrin, 3-Methoxytyramin und Serotonin. Bei beiden Assays handelt es sich um Assays in einem nicht-kompetitiven, Sandwich-Immunoassay-ähnlichen Format, d. h. der spezifische Fängerantikörper ist auf den Mikrosphären immobilisiert, die Detektion erfolgt mit Hilfe von Streptavidin-Phycoerythrin, das spezifisch an das zuvor über die Acylierung eingeführte Biotin bindet. Phycoerythrin dient dabei als Reportersignal, das im Analysegerät FLEXMAP 3D der Firma Luminex ausgelesen werden kann.

3.2.5.1 Immobilisierung von Antikörpern auf Luminex MicroPlex und MagPlex Mikrosphären

Bei den MagPlex Mikrosphären der Firma Luminex handelt es sich um magnetische Mikrosphären mit einer Carboxyl-funktionalisierten Oberfläche. MicroPlex Mikrosphären sind dagegen nicht magnetisch. Auf beiden Mikrosphärenarten können Antikörper bzw. allgemein Proteine mit NH₂-Gruppen mit Hilfe eines Aktivesters auf der Basis von Sulfo-NHS und EDC auf der Oberfläche immobilisiert werden.

300 µL der Mikrosphären-Stocklösung ($1,25 \times 10^7$ Mikrosphären pro mL) wurden nach gründlichem Vortexen (10 s) und Behandlung im Ultraschallbad (30 s) in ein Protein LoBind Reaktionsgefäß überführt und 3-mal mit 400 µL Aktivierungspuffer gewaschen. Für die Aktivierung der Mikrosphären wurde ein Aktivierungsmix aus 120 µL Aktivierungspuffer, 15 µL 50 mg/mL Sulfo-NHS (in wasserfreiem DMSO) und 15 µL 50 mg/mL EDC (frisch gelöst in Aktivierungspuffer) hergestellt und auf die Mikrosphären gegeben. Anschließend wurde für 20 min bei RT im Dunkeln auf dem Rotator inkubiert. Bei der Aktivierung der Mikrosphären reagiert zunächst das EDC mit einer

Carboxylgruppe unter Bildung einer O-Acyl-Isoharnstoff-Zwischenstufe, die in Anwesenheit des Nukleophils Sulfo-NHS zu einem Aktivester weiterreagiert. Dabei wird als Nebenprodukt ein Harnstoffderivat freigesetzt. Der Aktivester reagiert nun mit einer primären Aminogruppe der zu koppelnden Substanz unter Ausbildung einer Amidbindung, wobei das Sulfo-NHS wieder freigesetzt wird. Nach dem Aktivierungsschritt wurde der Aktivierungsmix entfernt und die Mikrosphären wurden 4-mal mit 400 μL Kopplungspuffer gewaschen. Anschließend wurden 250 μL des aufgereinigten Antikörpers in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zu den aktivierten, gewaschenen Mikrosphären gegeben und für 2 h bei RT im Dunkeln auf dem Rotator inkubiert. Danach erfolgten 4 Waschschrte mit jeweils 400 μL Waschpuffer (Mikrosphären), nach dem letzten Waschschrte wurden die Mikrosphären in 150 μL Blocking Reagent for ELISA/0.1 % NaN_3 resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei 4 $^\circ\text{C}$ im Dunkeln.

3.2.5.2 Immobilisierungskontrolle

Um den Erfolg der Immobilisierung zu überprüfen und die Anzahl an Mikrosphären pro μL zu bestimmen, wurde eine Immobilisierungskontrolle durchgeführt. Hierfür wurden die Mikrosphären gründlich gevortext, durch Ultraschallbehandlung vereinzelt und 1:500 in Waschpuffer (Mikrosphären) verdünnt. Für die Detektion wurde ein Esel-anti-Kaninchen-Antikörper, der mit Phycoerythrin markiert war, verwendet (dk- α -rb-PE). Dieser wurde in den Konzentrationen 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Waschpuffer (Mikrosphären) eingesetzt. 50 μL der verdünnten Mikrosphären wurden mit 50 μL der jeweiligen dk-a-rb-PE-Lösung auf einer 96-Well Mikrotiterplatte mit halber Oberfläche (*non-binding* Oberfläche) gemischt und für 45 min bei RT und 750 rpm geschüttelt. Anschließend erfolgte das Auslesen mit Hilfe der FLEXMAP 3D (Einstellungen: Probenvolumen 50 μL , maximale Messzeit 80 s, minimale Anzahl an Mikrosphären pro Sorte 10000). Die Anzahl an Mikrosphären pro μL wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Mikrosphären pro } \mu\text{L} = \frac{\text{Anzahl an detektierten Mikrosphären}}{30} \cdot 1000$$

Die Zahl 30 im Nenner rührt daher, dass das Totvolumen des Analysegeräts 20 μL beträgt und 50 μL Probenvolumen vom Analysegerät aufgesaugt wurden. Da die Mikrosphären final 1:1000 verdünnt im Well vorlagen, muss noch mit dem Faktor 1000 multipliziert werden.

3.2.5.3 Machbarkeit eines nicht-kompetitiven, multiplexen Immunoassays für Catecholamine

Um die prinzipielle Realisierbarkeit eines nicht-kompetitiven, Sandwich-Immunoassay-ähnlichen Assays für Catecholamine zu demonstrieren, wurden zunächst einige Vorversuche durchgeführt. Dabei wurde ein Versuchsaufbau gewählt, welcher keine Aufreinigung der Kaninchen-Antiseren erforderte.

Hierfür wurden drei unterschiedliche MicroPlex oder MagPlex Mikrosphären-Sorten jeweils mit Esel-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (dk- α -rb-IgG-AK) beladen und 2000 Mikrosphären pro Well in einem Volumen von 600 μ L PBS/0,5 % BSA/0,05 % Tween 20 resuspendiert. Diese wurden dann jeweils in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 600 μ L des in PBS/0,5 % BSA/0,05 % Tween 20 1:2000 verdünnten Kaninchen-Antiserums versetzt und für 1 h bei RT auf dem Rotator inkubiert. Anschließend wurden die Mikrosphären 3-mal mit 1,2 mL Waschpuffer (Mikrosphären) gewaschen und in 1,2 mL Waschpuffer aufgenommen. 25 μ L der Mikrosphären wurden pro Well auf eine zuvor mit PBS/0,5 % BSA/0,05 % Tween 20 blockierte Mikrotiterplatte mit Filtereinheit pipettiert und mit Hilfe der Vakuum-Absaugstation wurde die Waschlösung abgesaugt. 50 μ L der modifizierten Catecholamine wurden zu den Mikrosphären pipettiert und für 1 h bei RT und 650 rpm inkubiert. Anschließend wurde 3-mal mit 100 μ L PBS/0,5 % BSA/0,05 % Tween 20 gewaschen und 30 μ L Streptavidin-Phycoerythrin (Moss SAPE-001, 8 μ g/mL) in jedes Well pipettiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT und 650 rpm wurde erneut 3-mal mit 100 μ L PBS/0,5 % BSA/0,05 % Tween 20 gewaschen und die Mikrosphären abschließend in 100 μ L PBS/0,5 % BSA/0,05 % Tween 20 aufgenommen. Die Messung erfolgte mit Hilfe des Luminex 100-Systems. Abbildung 11 zeigt schematisch den Aufbau des Vorversuchs.

Zudem wurde ein Vorversuch zur Ermittlung eines geeigneten Acylierungsreagenzes durchgeführt. Dabei wurden die in Tabelle 12 dargestellten Reagenzien getestet. Die Proben wurden wie unter 3.2.3.1 beschrieben vorbereitet, dabei wurde jeweils das Acylierungsreagenz ausgetauscht. Anschließend wurden die modifizierten Catecholamine wie oben beschrieben im Assay getestet.

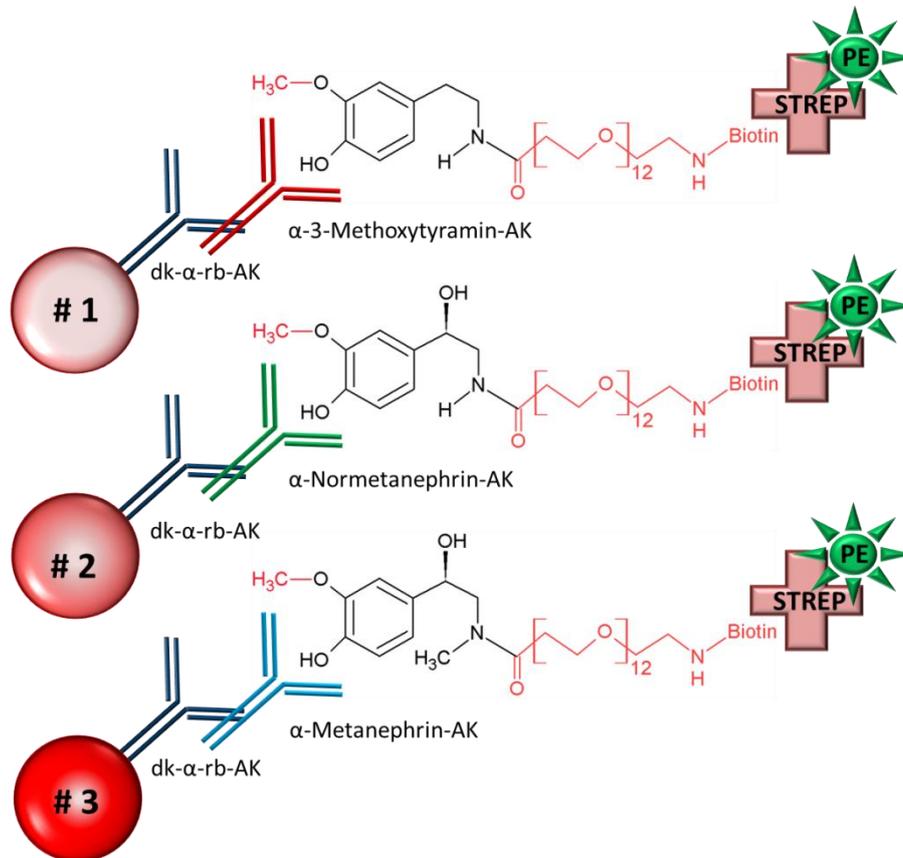


Abbildung 11: Aufbau des Versuchs zur Demonstration der prinzipiellen Realisierbarkeit eines nicht-kompetitiven, multiplexen Immunoassays für Catecholamine. Für die Versuche zur Wahl eines geeigneten Acylierungsreagenzes wurde nicht nur NHS-PEG₁₂-Biotin verwendet, sondern zusätzlich die in Tabelle 12 dargestellten Reagenzien. Strep-PE = Streptavidin-Phycoerythrin.

3.2.5.4 Multiplexer Immunoassay für Catecholamine

Da die enzymatische Umwandlung der Catecholamine bereits auf der 96-Well Mikrotiterplatte mit halber Oberfläche (*non-binding* Oberfläche) stattgefunden hatte, konnten die Mikrospären direkt zu den modifizierten Catecholaminen gegeben werden. Hierfür wurden pro Well jeweils 1000 Mikrospären mit immobilisiertem Metanephrin-, Normetanephrin- und 3-Methoxytyramin-Antikörper in Blocking Reagent for ELISA/0,05 % Tween 20 in einem Protein LoBind Reaktionsgefäß angesetzt. Pro Well wurden anschließend 20 µL der Mikrospären-Suspension zu den modifizierten Catecholaminen pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 90 min bei RT und 750 rpm. Mit Hilfe eines magnetischen Separators für Mikrotiterplatten wurde anschließend 3-mal mit je 100 µL LDN Waschpuffer gewaschen. Zur Detektion wurde Streptavidin-Phycoerythrin verwendet. Dieses wurde in einer Konzentration von 5 µg/mL in Blocking Reagent for ELISA/0,05 % Tween 20 angesetzt und pro Well 30 µL eingesetzt. Die Inkubation erfolgte

für 30 min bei RT und 750 rpm. Nach weiteren 3 Waschschrritten mit je 100 µL LDN Waschpuffer wurden die Mikrosphären in 100 µL Blocking Reagent for ELISA/0,05 % Tween 20 aufgenommen. Die Mikrotiterplatte wurde dann im Analysegerät FLEXMAP 3D ausgelesen (Einstellungen: Probenvolumen 80 µL, maximale Messzeit 60 s, minimale Anzahl an Mikrosphären pro Sorte 100). Abbildung 12 zeigt schematisch den Aufbau des multiplexen Immunoassays für Catecholamine.

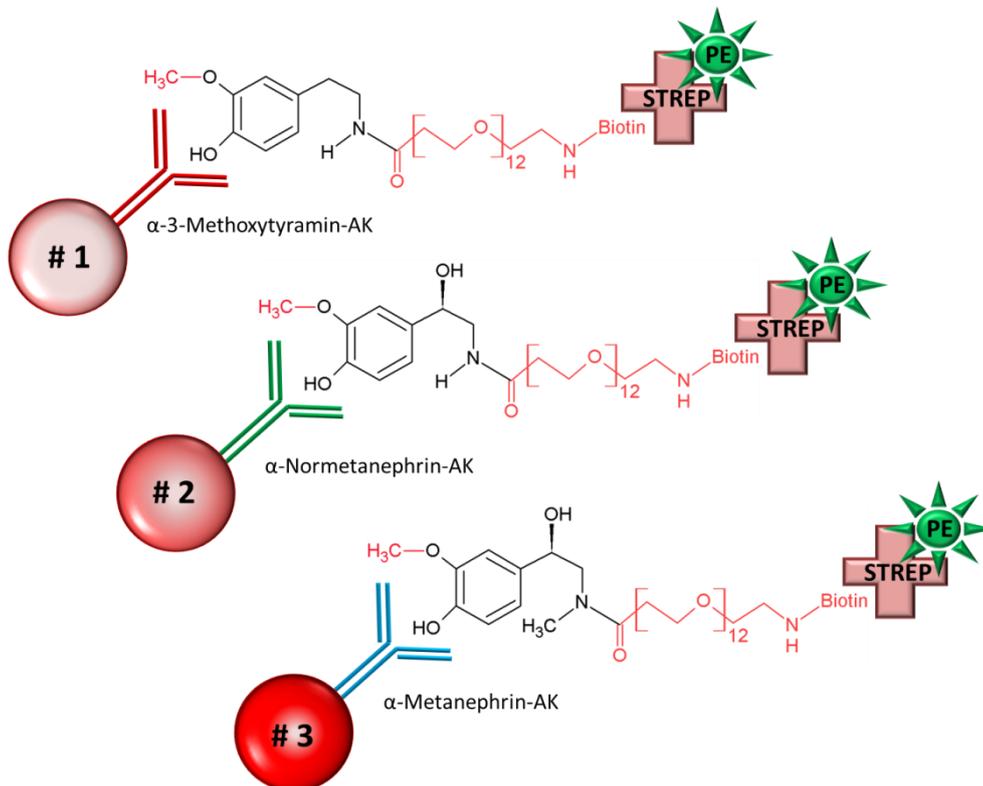


Abbildung 12: Multiplexer Immunoassay für Catecholamine. Der multiplexe Immunoassay für Catecholamine stellt einen 3-plex für die simultane Bestimmung von Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin in einer Probe dar. Dabei sind die spezifischen Antikörper, die sich gegen die methylierte Form der Catecholamine richten, also gegen die jeweiligen Metanephrine, auf unterschiedlich farbcodierten Mikrosphären immobilisiert. Da die Catecholamine im Zuge der Acylierung ein Biotin erhalten haben, kann für die Detektion ein mit Phycoerythrin markiertes Streptavidin verwendet werden. Strep-PE = Streptavidin-Phycoerythrin.

3.2.5.5 Multiplexer Immunoassay für Metanephrine und Serotonin

Nach Abstoppen der Acylierungsreaktion mit Glycin oder Ethanolamin (siehe 3.2.4.2) wurden 25 µL des Ansatzes auf eine 96-Well Mikrotiterplatte mit halber Oberfläche (*non binding* Oberfläche) transferiert. Es wurden pro Well jeweils 1000 Mikrosphären mit immobilisiertem Metanephrin-, Normetanephrin-, 3-Methoxytyramin- und Serotonin-Antikörper in Blocking Reagent for ELISA/0,05 % Tween 20 in einem Protein LoBind Reaktionsgefäß angesetzt. Pro Well wurden anschließend 25 µL der Mikrosphären-

Suspension zu dem acylierten Ansatz pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 90 min bei RT und 750 rpm. Mit Hilfe eines magnetischen Separators für Mikrotiterplatten wurde anschließend 3-mal mit je 100 µL LDN Waschpuffer gewaschen. Zur Detektion wurde Streptavidin-Phycoerythrin verwendet. Dieses wurde in einer Konzentration von 5 µg/mL in Blocking Reagent for ELISA/0,05 % Tween 20 angesetzt und pro Well 30 µL eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei RT und 750 rpm. Nach weiteren 3 Waschschritten mit je 100 µL LDN Waschpuffer wurden die Mikrosphären in 100 µL Blocking Reagent for ELISA/0,05 % Tween 20 aufgenommen. Die Mikrotiterplatte wurde dann im Analysegerät FLEXMAP 3D ausgelesen (Einstellungen: Probenvolumen 80 µL, maximale Messzeit 60 s, minimale Anzahl an Mikrosphären pro Sorte 100). Abbildung 13 zeigt den schematischen Aufbau des 4-plex für Metanephrin, Normetanephrin, 3-Methoxytyramin und Serotonin.

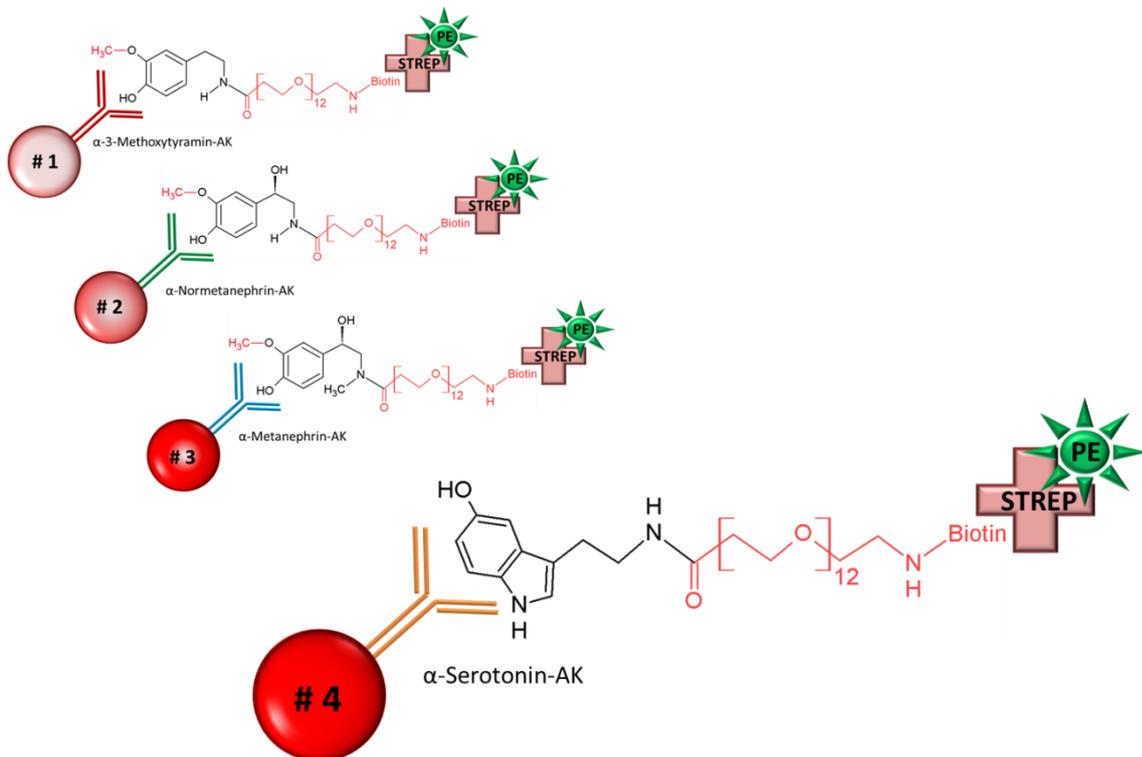


Abbildung 13: Multiplexer Immunoassay für Metanephrin, Normetanephrin, 3-Methoxytyramin und Serotonin. Der multiplexe Immunoassay für Metanephrine und Serotonin stellt einen 4-plex für die simultane Bestimmung von Metanephrin, Normetanephrin, 3-Methoxytyramin und Serotonin in einer Probe dar. Dabei sind die spezifischen Antikörper auf unterschiedlich farbcodierten Mikrosphären immobilisiert. Da die Metanephrine und Serotonin im Zuge der Acylierung ein Biotin erhalten haben, kann für die Detektion ein mit Phycoerythrin markiertes Streptavidin verwendet werden. In Abbildung 12 ist der Aufbau für Metanephrin, Normetanephrin und 3-Methoxytyramin vergrößert dargestellt, da der Assayaufbau für Catecholamine und Metanephrine identisch ist. Strep-PE = Streptavidin-Phycoerythrin.

3.2.5.6 Allgemeine Prinzipien für die Entwicklung von Immunoassays

Bei Immunoassays spielen verschiedene Faktoren, wie die verwendeten Antikörper, die eingesetzten Puffer, die Detektionsmethode sowie Matrixeffekte eine Rolle für ihre Spezifität, Sensitivität und allgemein ihre Qualität. Während der Entwicklungsphase wird versucht, diese Parameter so zu optimieren, dass ein möglichst sensitiver, spezifischer und präziser Immunoassay erhalten wird.

Konzentration der Antikörper für die Immobilisierung auf Mikrosphären

Für die Immobilisierung der aufgereinigten Antikörper auf den Mikrosphären wurden diese in einer Konzentration von 50 µg/mL eingesetzt. Die Antikörper wurden dazu in Kopplungspuffer (Mikrosphären) verdünnt. 250 µL dieser Antikörperlösung wurden für die Immobilisierung verwendet.

Wahl einer geeigneten Konzentration des Acylierungsreagenzes

Die Konzentration des Acylierungsreagenzes in den ELISAs der Firma LDN beträgt 50 mg/mL in wasserfreiem DMSO. Es wurde untersucht, ob eine Reduktion der Konzentration des Acylierungsreagenzes möglich ist. Dazu wurde das Acylierungsreagenz NHS-PEG₁₂-Biotin auf eine Konzentration von 25 mg/mL bzw. 12,5 mg/mL in wasserfreiem DMSO verdünnt und ebenfalls 25 µL davon für die Acylierung eingesetzt.

Ermittlung der optimalen Inkubationszeit für die Acylierung und enzymatische Umwandlung im Catecholamin-Assay

Des Weiteren wurden für die Acylierung und enzymatische Umwandlung verschiedene Inkubationszeiten getestet, um eine effiziente aber auch zeitsparende Umsetzung der Catecholamine zu erreichen. Für die Acylierung wurden dabei Inkubationszeiten von 15 min, 30 min und 1 h getestet, für die enzymatische Umwandlung Inkubationszeiten von 30 min, 1 h und 2 h.

Wahl eines geeigneten Puffersystems

Da für die Probenvorbereitung die bereits optimierten Puffer der Firma LDN verwendet wurden, wurde nur für den multiplexen Immunoassay eine Optimierung des Puffersystems durchgeführt. Hierfür wurden die Mikrosphären sowie das Streptavidin-Phycoerythrin in zwei unterschiedlichen Puffern suspendiert, entweder in Blocking Reagent for ELISA/0,05 % Tween 20 oder in LowCross-Puffer.

Wahl eines geeigneten Streptavidin-Phycoerythrins

Um ein möglichst geringes Hintergrundsignal und ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, wurde Streptavidin-Phycoerythrin von unterschiedlichen Herstellern getestet. Dazu wurden die mit spezifischem Antikörper beladenen Mikrosphären mit den verschiedenen Streptavidin-Lösungen für 30 min inkubiert. Dabei wurden die Streptavidin-Lösungen in den Konzentrationen 2 µg/mL und 4 µg/mL getestet, wobei 30 µL pro Well eingesetzt wurden. In Tabelle 5 sind die in der Entwicklungsphase verwendeten Streptavidine gelistet.

3.2.5.7 Validierung der entwickelten Immunoassays

Die Validierung der multiplexen Immunoassays erfolgte in Anlehnung an die „*Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*“ der *US Food and Drug Administration* [126]. Dabei wurde ein geeignetes Kalibrierkurvenmodell gewählt, der dynamische Bereich der Assays bestimmt, die Intra- sowie Interassay-Präzision ermittelt, die Sensitivität und Spezifität bestimmt sowie auf Kreuzreaktivität zu verschiedenen anderen Substanzen untersucht. Des Weiteren wurden die Wiederfindungsrate in humanen Urinproben, die Verdünnungslinearität und die Robustheit der Assays sowie Stabilität der Analyten ermittelt.

Für die Validierung der Assays wurden eigene Standards hergestellt, da die Standards aus den ELISAs der Firma LDN nicht ausreichend hoch konzentriert waren, um Versuche zur Wiederfindungsrate durchzuführen. Dazu wurden die jeweiligen Substanzen in einer von der Firma LDN bereitgestellten Standardmatrix gelöst. Tabelle 13 zeigt die Konzentrationen der für die Assaykalibrierung verwendeten Standards.

Tabelle 13: Konzentrationen der für die Assaykalibrierung verwendeten Standards in ng/mL.

Standard	Adrenalin [ng/mL]	Noradrenalin [ng/mL]	Dopamin [ng/mL]	Metanephrin [ng/mL]	Normetanephrin [ng/mL]	3-Methoxy- tyramin [ng/mL]	Serotonin [ng/mL]
A	0	0	0	0	0	0	0
A/B 1	0,2	1	2	1,46	2,19	1,82	1,82
A/B	0,45	2,25	4,5	4,86	7,29	6,08	6,08
B	1	5	10	16,2	24,3	20,25	20,25
C	4	20	40	54	81	67,5	67,5
D	15	75	150	180	270	225	225
E	50	250	500	600	900	750	750
F	200	1000	2000	2000	3000	2500	2500

Generierung von Validierungs- und Qualitätskontrollen

Für die Generierung von Validierungs- und Qualitätskontrollen wurde Urin von 12 freiwilligen gesunden Spendern sowie ein synthetisch hergestellter Urin mit Hilfe der beiden multiplexen Immunoassays auf die endogene Konzentration an Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin hin untersucht. Nach Identifizierung von geeigneten Spendern wurde der Urin dieser Spender mit unterschiedlichen Konzentrationen an synthetisch hergestellten Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin versetzt. Dabei wurden die Konzentrationen so gewählt, dass jeweils zwei Proben im unteren, mittleren und oberen Bereich der Standardkurve lagen. Tabelle 14 zeigt die Konzentrationen der Analyten, mit welchen die Urinproben *gespikt* wurden. Dabei wurde zu Urinprobe 1 kein zusätzlicher Analyt gegeben, die Messwerte spiegeln hier die Spender-abhängige, endogene Konzentration dieser Analyten wider. Die *gespikten* Urinproben wurden anschließend aliquotiert und bei -20 °C tiefgefroren.

Tabelle 14: In den Validierungs- und Qualitätskontrollen eingesetzte finale Konzentrationen der Analyten im *gespikten* Urin.

Urinprobe (Konzentrations- bereich der Standardkurve)	Adrenalin [ng/mL]	Noradrenalin [ng/mL]	Dopamin [ng/mL]	Metanephrin [ng/mL]	Normetanephrin [ng/mL]	3-Methoxy- tyramin [ng/mL]	Serotonin [ng/mL]
1 (niedrig)	0	0	0	0	0	0	0
2 (niedrig)	10	50	100	1,5	2,5	2	2
3 (mittel)	20	100	200	15	25	20	20
4 (mittel)	30	150	300	150	250	200	200
5 (hoch)	100	500	1000	1500	2500	2000	2000
6 (hoch)	150	750	1500	-	-	-	-

Ermittlung eines geeigneten Kalibrierkurvenmodells

Für die Ermittlung eines geeigneten Kalibrierkurvenmodells wurden die Assays an vier verschiedenen Tagen durchgeführt, dabei wurde jeder Standard in Triplikaten gemessen. Mit Hilfe der Software MasterPlex QT wurden verschiedene Kurvenanpassungsmodelle getestet und dann anhand des Wertes für das Bestimmtheitsmaß (R^2) sowie der Wiederfindungsrate ein geeignetes Kalibrierkurvenmodell gewählt.

Ermittlung der unteren Nachweisgrenze (Limit of detection)

Für die Bestimmung des LOD wurde der Standard A (Konzentration = 0 ng/mL) in einem Experiment 20-mal hintereinander gemessen und der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten sowie die Standardabweichung berechnet. Daraus wurde dann mit Hilfe des Kalibrierkurvenmodells die Konzentration für das Hintergrundsignal + 3x die Standardabweichung des Hintergrundsignals berechnet.

Ermittlung der unteren Bestimmungsgrenze (Lower limit of quantification)

Für die Bestimmung des LLOQ wurde ausgehend von Standard D eine Verdünnungsreihe angefertigt, bei welcher der Standard D 8-mal 1:2 in LDN Standardmatrix verdünnt und im Assay gemessen wurde. Dies wurde in drei Experimenten wiederholt, dabei wurde jede Verdünnung in Triplikaten gemessen. Als LLOQ wurde diejenige Verdünnung definiert, bei welcher die Kriterien $CV < 30 \%$ und Wiederfindungsrate zwischen 75 – 125 % noch zutraf.

Ermittlung der oberen Bestimmungsgrenze (Upper limit of quantification)

Für die Bestimmung des ULOQ wurden zwei zusätzliche Standards, F1 und F2, hergestellt, welche die 2- bzw. 4-fache Konzentration des eigentlich höchsten Standards F hatten (siehe Tabelle 15). Als ULOQ wurde diejenige Konzentration bestimmt, bei welcher der CV < 20 % war und die Wiederfindungsrate zwischen 80 – 120 % lag.

Tabelle 15: Konzentrationen der zur Bestimmung des ULOQ eingesetzten zusätzlichen Standards F1 und F2.

Standard	Adrenalin [ng/mL]	Noradrenalin [ng/mL]	Dopamin [ng/mL]	Metanephrin [ng/mL]	Normetanephrin [ng/mL]	3-Methoxy- tyramin [ng/mL]	Serotonin [ng/mL]
F1	400	2000	4000	4000	6000	5000	5000
F2	800	4000	8000	8000	12000	10000	10000

Ermittlung des dynamischen Bereichs

Der dynamische Bereich wurde als der Bereich zwischen dem in der Validierung ermittelten LLOQ und ULOQ des jeweiligen Immunoassays definiert.

Ermittlung der Präzision

Für die Bestimmung der Intra- und Interassay-Präzision wurden die in Tabelle 14 aufgelisteten Validierungsproben verwendet. Dabei wurde zur Bestimmung der Intraassay-Präzision die Urinprobe Nr. 3 mit einer mittleren Konzentration der Analyten in 3 Experimenten zwischen 12- und 20-mal innerhalb eines Assays gemessen. Für die Interassay-Präzision wurden die Urinproben 1-6 mit zwei niedrigen, zwei mittleren und ein bis zwei hohen Konzentrationen der Analyten in 4 Experimenten, jeweils in Triplikaten gemessen.

Ermittlung der Wiederfindungsrate

Für die Ermittlung der Wiederfindungsrate wurden die in Tabelle 14 dargestellten *gespikten* Urinproben eingesetzt. Die Proben wurden in 4 Experimenten, jeweils in Triplikaten gemessen und die Konzentration der Analyten in der Probe bestimmt. Es wurde berechnet, wie viel Prozent des zugesetzten Analyten durch die Messung in der

Probe wiedergefunden werden konnten. Dabei wurde die in Urinprobe 1 gemessene endogene Analytkonzentration von den in den Urinproben 2-6 gemessenen Konzentrationen abgezogen.

Ermittlung der Verdünnungslinearität

Für die Ermittlung der Verdünnungslinearität wurde eine Urinprobe mit einer hohen Konzentration (siehe Tabelle 16) des jeweiligen Analyten versetzt und initial 1:50 bzw. 1:10 verdünnt, um diese in den oberen Bereich der Standardkurve zu bringen. Anschließend erfolgten serielle Verdünnungen mit dem Faktor 2 in LDN Standardmatrix bis zu einer Verdünnung von 1:400 bzw. 1:320. Dabei wurde jede Verdünnung in Triplikaten gemessen.

Tabelle 16: *Gespikte* Konzentration der Analyten im Urin für die Bestimmung der Verdünnungslinearität.

Urinprobe (Konzentrations- bereich der Standardkurve)	Adrenalin [ng/mL]	Noradrenalin [ng/mL]	Dopamin [ng/mL]	Metanephrin [ng/mL]	Normetanephrin [ng/mL]	3-Methoxy- tyramin [ng/mL]	Serotonin [ng/mL]
7 (sehr hoch)	200	1000	2000	1500	2500	2000	2000

Anschließend wurde die anhand der Kalibrierkurve berechnete Konzentration der Analyten mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, die Wiederfindungsrate berechnet und die Linearität der Verdünnungen überprüft.

Ermittlung der Selektivität

Für die Ermittlung der Selektivität wurde die Kreuzreaktivität der Catecholamine, Metanephrine und von Serotonin untereinander sowie die Kreuzreaktivität zu strukturell ähnlichen Substanzen untersucht. Diese Substanzen wurden von der Firma LDN bereitgestellt. Für den multiplexen Catecholamin-Assay handelte es sich dabei um die Substanzen 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol, Tyramin, Phenylalanin, Kaffeesäure, L-DOPA, Homovanillinsäure, Tyrosin und 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure. Beim multiplexen Immunoassay für die Metanephrine und Serotonin wurde die Kreuzreaktivität zu den Substanzen Tryptamin, Melatonin, 5-Hydroxyindolessigsäure, Phenylalanin, Histidin, Tyramin und 5-Hydroxytryptophan bestimmt. Für die Bestimmung der Kreuzreaktivität wurden die Substanzen in einer Konzentration von 10 mg/mL, 1 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,001 mg/mL und 0,0001 mg/mL im Assay getestet. Hierfür

wurden jeweils 10 µL der einzelnen Lösungen im Assay eingesetzt und gleich behandelt wie eine Probe. Für die Ermittlung der Kreuzreaktivität der Catecholamine im Metanephrin-Assay wurden diese erst ab einer Konzentration von 1 mg/mL eingesetzt, dafür aber bis zu einer Konzentration von 0,00001 mg/mL verdünnt. Die Verdünnung der Substanzen erfolgte in LDN Standardmatrix.

Ermittlung der Robustheit und der Analytstabilität

Es wurde die Robustheit der Assays bzw. die Analytstabilität in Bezug auf die Lagerungstemperatur sowie –zeit und die Anzahl der Einfrier- und Auftauzyklen bestimmt. Hierfür wurden 12 identische Aliquots einer Urinprobe mit einer mittleren Konzentration der Analyten versetzt und bei -20 °C tiefgefroren. Für die Kurzzeitstabilität, also die Stabilität in Bezug auf Lagerungstemperatur und –zeit über einen kurzen Zeitraum, wurde jeweils ein Aliquot für 2 h, 4 h oder 24 h bei RT oder 4 °C gelagert und anschließend im Assay gemessen. Für die Ermittlung der Stabilität gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen wurde ein Aliquot bei RT aufgetaut, gevortext und wieder bei -20 °C für 24 h tiefgefroren. Am nächsten Tag wurde dieses Aliquot sowie ein weiteres Aliquot bei RT aufgetaut, gevortext und wieder bei -20 °C für 24 h tiefgefroren. Am dritten Tag wurden die beiden Aliquots vom Vortag sowie ein weiteres Aliquot bei RT aufgetaut, gevortext und wieder bei -20 °C für 24 h tiefgefroren. Am vierten Tag wurden alle 3 Aliquots sowie ein weiteres Aliquot bei RT aufgetaut und im Assay vermessen. Somit konnte der Einfluss von bis zu drei zusätzlichen Einfrier- und Auftauzyklen auf die Analyten in der Probe ermittelt werden. Es wurde die Wiederfindungsrate in den behandelten Proben in Bezug auf eine frisch aufgetaute Probe bestimmt.

3.2.6 Durchführung der kommerziell erhältlichen ELISAs der Firma LDN

Die Durchführung der kommerziell erhältlichen, kompetitiven ELISAs der Firma LDN erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Durchgeführt wurden der 3-CAT ELISA Fast Track, der 2-MET Urine ELISA Fast Track sowie der Serotonin-ELISA Fast Track. Das Auslesen der ELISAs erfolgte mit Hilfe des ELx808 Absorbance Microplate Readers der Firma Biotek.

In einem Versuch zum Vergleich zwischen multiplexem Assay und kompetitivem ELISA wurde das im multiplexen Assay verwendete Acylierungsreagenz auch im ELISA getestet. Hierfür wurde das im ELISA verwendete Acylierungsreagenz durch die entsprechende

Menge an NHS-PEG₁₂-Biotin ausgetauscht und die Acylierungsdauer wie im multiplexen Assay von 15 min auf 30 min erhöht.

3.2.7 Datenanalyse

Generelle Datenanalyse

Die von der Software xPONENT 4.0 erhaltenen Messwerte in MFI stellten den Median der Messungen einzelner Mikrosphären dar. Für einen zuverlässigen Messwert war dabei die Erfassung des Signals von mindestens 35 Mikrosphären erforderlich. Die Messwerte wurden anschließend mit Hilfe der Software MasterPlex QT zur Erstellung von Standardkurven und Berechnung der Analytkonzentration in den Proben verwendet. Dabei wurde für die Erstellung der Standardkurven ein 5-parametrisch logistischer Fit mit einer Gewichtung von $1/Y$ verwendet. Anhand dieser Standardkurve wurde dann von den MFI-Werten auf die Konzentration der Analyten in der Probe zurückgerechnet.

Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman

Für den Vergleich zwischen den neu entwickelten multiplexen Immunoassays und den kommerziell erhältlichen ELISAs der Firma LDN sowie den HPLC-Messwerten wurden Urinproben von gesunden Spendern und Patienten oder *gespikte* Urinproben gemessen und die erhaltenen Werte miteinander verglichen. Dafür wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman verwendet (r_s). Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ist ein parameterfreies Maß für die statistische Abhängigkeit zwischen zwei Variablen. Er beurteilt, wie gut die Beziehung zwischen zwei Variablen mit einer monotonen Funktion beschrieben werden kann. Dabei müssen die Größen mindestens ordinal skaliert sein, es muss jedoch kein linearer Zusammenhang vorliegen. Für die Berechnung von r_s werden die Werte der beiden Beobachtungsmerkmale jeweils für sich in aufsteigender Reihenfolge geordnet und mit den entsprechenden Rangzahlen versehen. Anschließend wird für jedes Wertepaar die Differenz d_i der beiden Rangzahlen berechnet und mit sich selbst multipliziert (d_i^2). Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman kann dann mit folgender Formel berechnet werden:

$$r_s = 1 - \frac{6 \cdot \sum_{i=1}^n d_i^2}{n \cdot (n^2 - 1)}$$

Dabei ist n die Anzahl an Wertepaaren.

Für die Interpretation des Rangkorrelationskoeffizienten können folgende Definitionen verwendet werden:

Ist $r_s > 0$ liegt ein positiver Zusammenhang vor, ist $r_s < 0$ liegt ein negativer Zusammenhang vor, wobei r_s Werte zwischen -1 und +1 annehmen kann. Ist $r_s = 0$ liegt kein Zusammenhang vor. Je näher der Wert an 0 liegt, desto schwächer ist der Zusammenhang, je näher er an -1 oder +1 liegt, desto stärker ist der Zusammenhang:

$0,0 \leq r_s \leq 0,2$	→ kein bis geringer Zusammenhang
$0,2 < r_s \leq 0,5$	→ schwacher bis mäßiger Zusammenhang
$0,5 < r_s \leq 0,8$	→ deutlicher Zusammenhang
$0,8 < r_s \leq 1,0$	→ hoher bis perfekter Zusammenhang

Ausreißertest nach Grubbs

Mit Hilfe des Ausreißertests nach Grubbs können Ausreißer in einer gegebenen Stichprobe identifiziert werden [131]. Voraussetzung ist, dass die Daten normalverteilt sind. Identifizierte Ausreißer können anschließend eliminiert werden und durch Iteration kann die verbleibende Stichprobe verbessert werden. Für den Ausreißertest nach Grubbs wird der Mittelwert über alle Proben gebildet und die jeweils am weitesten vom Mittelwert entfernten Werte überprüft. Wurde ein Ausreißer identifiziert, wird dieser eliminiert und der Test mit den verbleibenden Werten solange wiederholt, bis sich keine Ausreißer mehr in der Stichprobe befinden.

Es wird zunächst die Prüfgröße PG berechnet, die den Abstand des als Ausreißer angenommenen Wertes x_i vom Mittelwert \bar{x} im Verhältnis zur Standardabweichung S des Mittelwerts beschreibt:

$$PG = \frac{\max |x_i - \bar{x}|}{S}$$

Anschließend wird das Signifikanzniveau definiert. Es wird nun ermittelt, ob die Prüfgröße größer als die Vergleichsgröße VG ist. Die Vergleichsgröße erhält man aus Tabellen, die für die jeweilige Anzahl an Einzelwerten und das gewählte Signifikanzniveau die entsprechenden Werte für die Vergleichsgrößen gelistet haben. Der Ausreißertest nach Grubbs kann auch einseitig durchgeführt werden, indem man gezielt das Maximum und das Minimum aller Daten testet. In diesem Fall gilt:

$$PG = \frac{\bar{x} - x_{\min}}{S} \quad \text{und} \quad PG = \frac{x_{\max} - \bar{x}}{S}$$

Für die Auswertung der Daten in dieser Arbeit wurde ein Signifikanzniveau von 95 % gewählt. Bei einem Stichprobenumfang von 19 Proben und einem einseitigen Test beträgt der Wert für die Vergleichsgröße 2,5312. Es wird also überprüft ob $PG > 2,5312$ ist.

Box-Whisker-Plots

Der Box-Whisker-Plot dient der graphischen Darstellung der Verteilung von kardinalskalierten Daten. Der Vorteil besteht darin, dass auf den ersten Blick anhand von bestimmten Kennwerten die Verteilung der Daten beurteilt werden kann. Die dabei verwendeten Kennwerte sind der Median, zwei Quartile sowie das Minimum und Maximum der Werte. Die Box stellt dabei den Bereich dar, in welchem 50 % der Daten liegen und wird begrenzt durch das untere Quartil (25 %) und das obere Quartil (75 %). Die Länge der Box entspricht dem Interquartilsabstand, einem Maß für die Streuung der Daten. Die Box wird durch den Median weiter unterteilt. Der Median teilt die Box in zwei Bereiche, in welchen jeweils 50 % der Daten liegen, somit gibt die Lage des Medians die Schiefe der den Daten zugrunde liegenden Verteilung an. Die Whisker können verschiedene Werte angeben, häufig geben sie den maximalen und minimalen Wert an oder das 5 % und 95 % Quantil, dabei werden Ausreißer, welche nicht in die Berechnung miteinbezogen wurden, als Punkte außerhalb der Whisker dargestellt. Abbildung 14 zeigt die Interpretation von Box-Whisker-Plots.

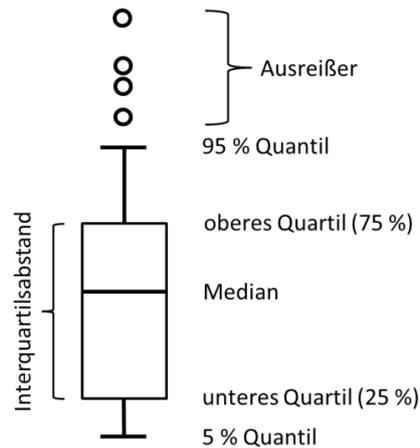


Abbildung 14: Interpretation des Box-Whisker-Plots.

Die Box-Whisker-Plots in dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Software RExcel und RStudio erstellt.

Statistische Signifikanztests

Zweistichproben-t-Test

Der t-Test ist ein statistischer Signifikanztest und gehört zur Gruppe der parametrischen Verfahren. Der Zweistichproben-t-Test prüft mit Hilfe der Mittelwerte zweier Stichproben, ob die Mittelwerte zweier Grundgesamtheiten gleich oder verschieden sind. Die Nullhypothese besagt in diesem Fall, dass die Mittelwerte der Grundgesamtheiten gleich sind. Der p-Wert gibt dabei an, wie wahrscheinlich es ist, das erhaltene Stichprobenergebnis oder ein noch extremeres zu erhalten, wenn die Nullhypothese wahr ist. Je kleiner dabei der p-Wert ist, desto eher spricht das Stichprobenergebnis gegen die Nullhypothese. Wird die Nullhypothese abgelehnt, so bezeichnet man das Ergebnis als statistisch signifikant. Als Signifikanzniveau wurde in dieser Arbeit ein Niveau von 1 % gewählt, entsprechend einem p-Wert von 0,01. Die p-Werte für den Vergleich zweier Stichproben wurden mit Hilfe der Software RExcel berechnet. Die Daten wurden zunächst mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung überprüft und anschließend wurde bei Erfüllung der Normalverteilung ein Zweistichproben-t-Test mit den beiden Stichproben durchgeführt.

Wilcoxon-Test

Der Wilcoxon-Test ist ein nichtparametrischer Test zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen. Dabei muss die abhängige Variable nicht normalverteilt sein, sollte aber mindestens ordinalskaliert sein. Daher wurde der Wilcoxon-Test durchgeführt wenn die Normalverteilung der Stichproben nicht gegeben war und somit kein t-Test durchgeführt werden konnte. Der Wilcoxon-Test wurde ebenfalls mit der Software RExcel durchgeführt.

Signifikanztest bei mehr als zwei Stichproben

Werden mehr als zwei Stichproben miteinander verglichen, so kann kein einfacher t-Test durchgeführt werden. In diesem Fall wurden die Daten in dieser Arbeit zunächst mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung überprüft und anschließend, bei Erfüllung der Normalverteilung ein t-Test bzw. bei nicht Erfüllung ein Wilcoxon-Test zwischen jeweils zwei der Stichproben durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde ebenfalls ein Niveau von 1 % gewählt, entsprechend einem p-Wert von 0,01. Die p-Werte für den Vergleich der Stichproben wurden mit Hilfe der Software RExcel berechnet.

Hierarchische Clusteranalyse

Um Ähnlichkeiten zwischen gesunden Probanden, Patienten und Analyten zu ermitteln, wurde eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. Unter Clusteranalyse versteht man multivariate Verfahren, mit denen man Gruppen von zusammengehörigen Objekten (Cluster) aus einer Grundmenge von numerisch beschriebenen Objekten ermitteln kann. Objekte werden dabei so zu Clustern zusammengefasst, dass innerhalb eines Clusters die Objekte möglichst ähnlich sind, zwischen den verschiedenen Clustern dagegen möglichst unähnlich. Die hierarchische Clusteranalyse ist dabei ein distanzbasiertes Verfahren zur Clusteranalyse, bei dem verschiedene Distanz- bzw. Proximitätsmaße verwendet werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die hierarchische Clusteranalyse mit Hilfe der Software Multi Experiment Viewer (TM4 Microarray Software Suite) durchgeführt [127]. Als Ähnlichkeitsmaß zur Bestimmung des Abstands zwischen zwei Objekten wurde der Pearson Korrelationskoeffizient verwendet, als Fusionierungsalgorithmus zur Bestimmung des Abstands zwischen zwei Clustern wurde eine vollständige Verknüpfung (*complete linkage*) verwendet. Die Ergebnisse wurden in sogenannten *Heatmaps* dargestellt, welche

die Cluster anhand unterschiedlicher Farben und Clusterbäumen an den Achsen graphisch darstellen.



4. Ergebnisse

4.1 Machbarkeit nicht-kompetitiver, multiplexer Immunoassays für Catecholamine

Die prinzipielle Machbarkeit multiplexer Immunoassays für Catecholamine in einem nicht-kompetitiven, Sandwich-Immunoassay-ähnlichen Format wurde vor der eigentlichen Assayentwicklung zuerst in einigen Vorversuchen gezeigt.

Die für die Entwicklung als Grundlage dienenden kommerziellen ELISAs der Firma LDN basieren auf einem kompetitiven Assayformat. Für die Acylierungsreaktion wird in diesen ELISAs NHS-Biotin verwendet. Diese Markierung der Catecholamine mit Biotin bietet den großen Vorteil, dass sie in einem nicht-kompetitiven, multiplexen Immunoassay die Detektion der Analyten direkt über Streptavidin-Phycoerythrin ermöglicht. Somit wird kein weiterer Antikörper zur Detektion benötigt, sondern nur ein spezifischer Fängerantikörper, der auf den Mikrosphären immobilisiert wird.

4.1.1 Immobilisierung der Antikörper auf den Mikrosphären

Um eine Aussage über die prinzipielle Machbarkeit von nicht-kompetitiven Immunoassays für Catecholamine treffen zu können, wurde zunächst ein Versuchsaufbau gewählt, bei welchem die Aufreinigung spezifischer Antikörper aus den Kaninchen-Antiseren für eine Immobilisierung auf den Mikrosphären nicht notwendig war. Hierfür wurden mit Hilfe von immobilisierten Esel-anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern Immunglobuline vom Isotyp G aus dem Kaninchen-Antiserum herausgefangen. Die so „immobilisierten“ Antikörper wurden dann dazu verwendet, die biotinylierten Catecholamine aus der Probe zu fangen.

4.1.2 Wahl eines geeigneten Acylierungsreagenzes

Zunächst wurde versucht, das Acylierungsreagenz NHS-Biotin aus dem kompetitiven ELISA auch im nicht-kompetitiven Immunoassay einzusetzen. Es konnte jedoch mit diesem Acylierungsreagenz bei allen drei Catecholaminen kein Signal erhalten und daher keine Standardkurve generiert werden. Demzufolge wurden weitere

Acylierungsreagenzien getestet, welche über unterschiedlich lange Polyethylenglycoleinheiten zwischen der NHS- und der Biotin-Gruppe verfügten (siehe Tabelle 12). Abbildung 15 zeigt das Ergebnis des Vorversuchs zur Ermittlung eines geeigneten Acylierungsreagenzes.

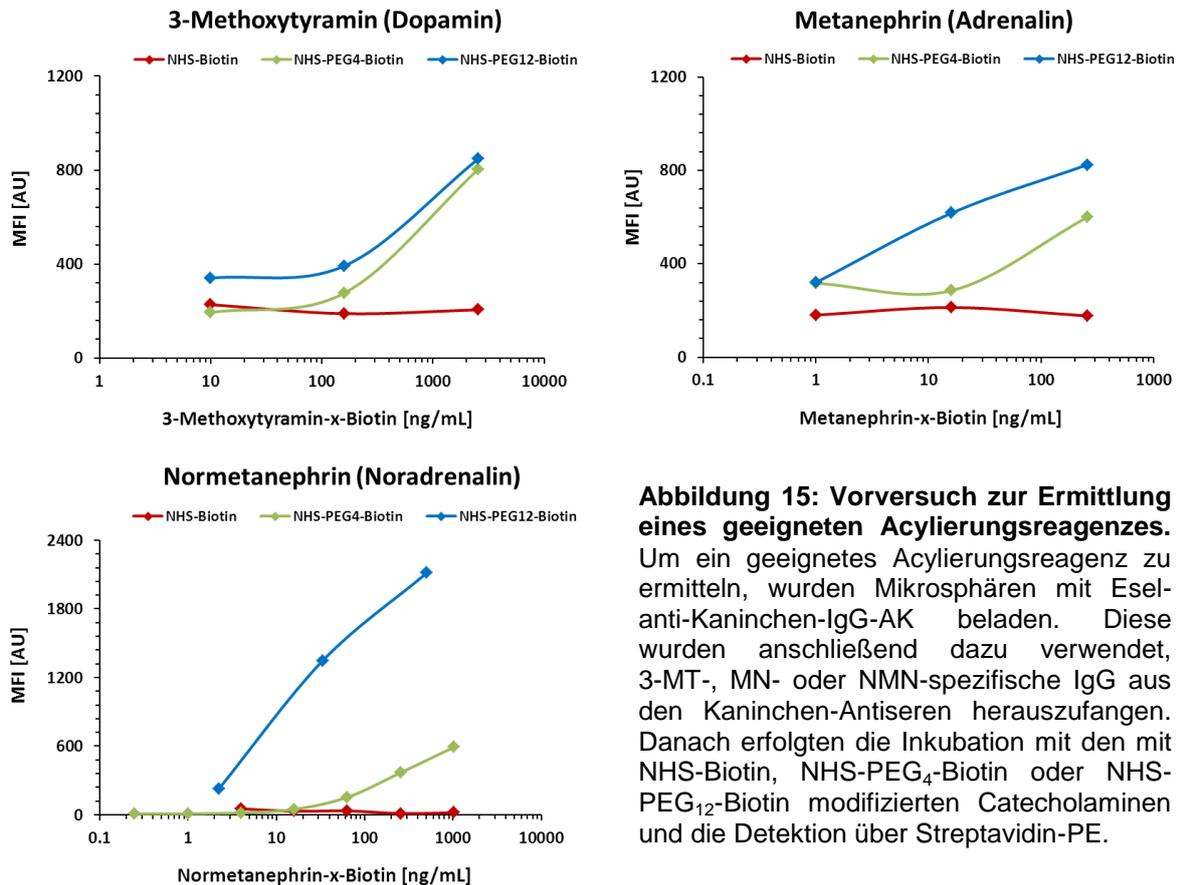


Abbildung 15: Vorversuch zur Ermittlung eines geeigneten Acylierungsreagenzes.

Um ein geeignetes Acylierungsreagenz zu ermitteln, wurden Mikrosphären mit Eselanti-Kaninchen-IgG-AK beladen. Diese wurden anschließend dazu verwendet, 3-MT-, MN- oder NMN-spezifische IgG aus den Kaninchen-Antisera herauszufangen. Danach erfolgten die Inkubation mit den mit NHS-Biotin, NHS-PEG₄-Biotin oder NHS-PEG₁₂-Biotin modifizierten Catecholaminen und die Detektion über Streptavidin-PE.

In Abbildung 15 ist zu sehen, dass mit dem Acylierungsreagenz aus dem LDN ELISA (NHS-Biotin) bei keinem der drei Analyten ein Signal erhalten werden konnte, auch bei hohen Analytkonzentrationen konnte kein Anstieg des Signals beobachtet werden. Jedoch konnten sowohl mit NHS-PEG₄-Biotin als auch mit NHS-PEG₁₂-Biotin bei allen Analyten mit steigender Konzentration steigende Signale gemessen werden. Dabei wurden für NHS-PEG₁₂-Biotin die höheren Signale erhalten, vor allem bei Normetanephrin (Noradrenalin). Daher wurde für die weitere Entwicklung das Acylierungsreagenz NHS-PEG₁₂-Biotin eingesetzt.

4.1.3 Aufbau des nicht-kompetitiven, multiplexen Immunoassays

Da die bisherigen Assays nur im singleplexen Format durchgeführt wurden, wurde der Assay nun als Singleplex und Multiplex durchgeführt, um zu überprüfen, ob es bei der Durchführung des multiplexen Assays zu Kreuzreaktivitäten oder einem Wechsel der Metanephrin-spezifischen Antikörper zwischen den verschiedenen dk-a-rb-Mikrosphärensorten kommt. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis dieses Vorversuchs.

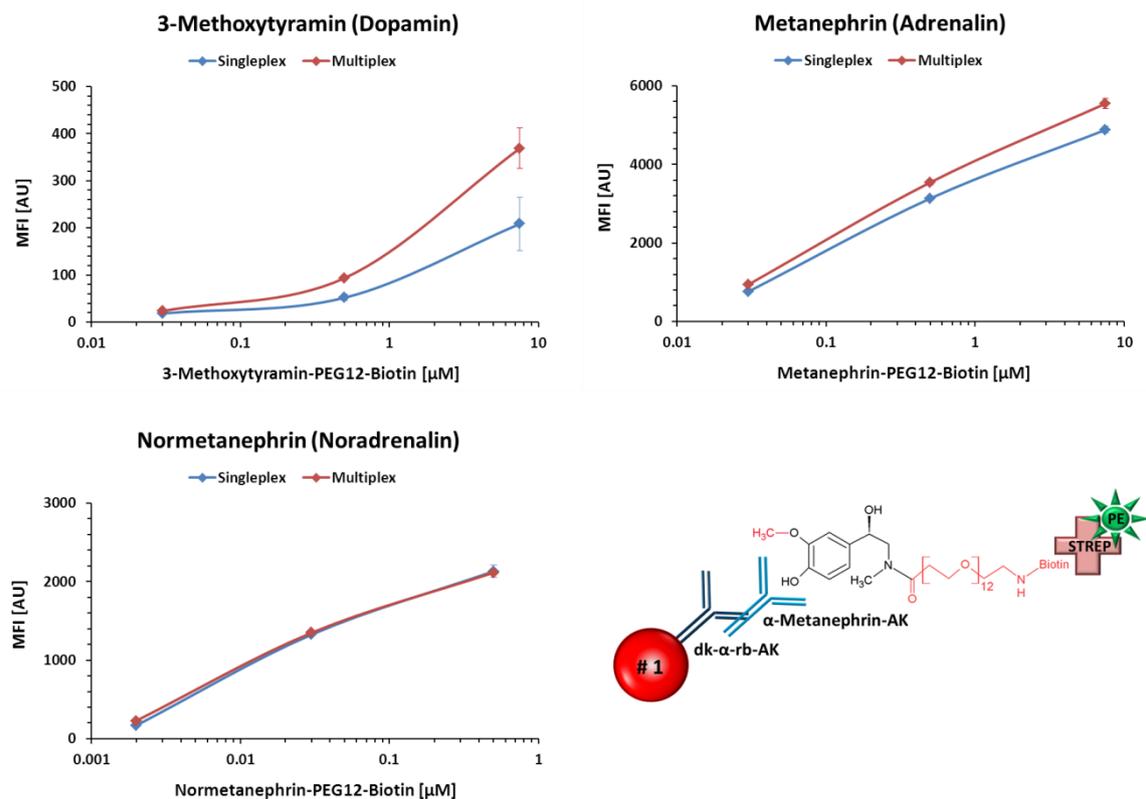


Abbildung 16: Vorversuch zur Demonstration der prinzipiellen Realisierbarkeit eines nicht-kompetitiven, multiplexen Immunoassays für Catecholamine. Um die prinzipielle Realisierbarkeit eines nicht-kompetitiven, multiplexen Immunoassays für Catecholamine zu testen, wurden drei unterschiedliche Mikrosphärensorten jeweils mit Esel-anti-Kaninchen-IgG-AK beladen. Diese wurden anschließend dazu verwendet, Metanephrin-spezifische IgG aus den Kaninchen-Antisera herauszufangen. Für den multiplexen Ansatz wurden die drei Mikrosphärensorten vereinigt. Es erfolgte die Inkubation mit den modifizierten Catecholaminen und die Detektion über Streptavidin-PE. Dargestellt sind die Ergebnisse für den singleplexen und multiplexen Ansatz für 3-Methoxytyramin (Dopamin), Metanephrin (Adrenalin) und Normetanephrin (Noradrenalin) sowie der schematische Aufbau des Vorversuchs am Beispiel von Metanephrin.

Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, konnte bei allen drei Catecholaminen sowohl im singleplexen als auch im multiplexen Ansatz mit steigender Analytkonzentration ein Anstieg der Signale beobachtet werden. Die Übereinstimmung zwischen singleplexem und multiplexem Assay ist für Noradrenalin perfekt, für Adrenalin gut, bei Dopamin kann

jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen dem singleplexen und multiplexen Ansatz festgestellt werden.

Da mit diesen Versuchen gezeigt werden konnte, dass die Entwicklung eines nicht-kompetitiven, multiplexen Immunoassays für biogene Amine prinzipiell möglich ist, wurde mit der Aufreinigung spezifischer Antikörper aus den Kaninchen-Antiseren begonnen, um diese auf Mikrosphären immobilisieren zu können.

4.2 Aufreinigung von Antikörpern aus den Kaninchen-Antiseren

Die Aufreinigung der Kaninchen-Antiseren erfolgte im *batch*-Verfahren im 2 mL Reaktionsgefäß mit Hilfe der Affinitätschromatographie an den jeweiligen Antigenen (siehe Tabelle 4). Aufgrund von Kreuzreaktivitäten und unspezifischen Hintergrundsignalen musste für jedes Antiserum eine geeignete Aufreinigungsstrategie entwickelt werden.

Für das 3-Methoxytyramin-Antiserum war die Affinitätsaufreinigung über Ova-DOPA ausreichend, es konnte ein spezifischer α -3-Methoxytyramin-Antikörper erhalten werden.

Für das Metanephrin-Antiserum konnte durch eine einfache Affinitätsaufreinigung kein spezifischer Antikörper erhalten werden. Hier wurde deshalb eine prä-Adsorption an NMN-TG, SERO-TG und Ova-DOPA durchgeführt, um unspezifische Antikörper gegen diese Analyten aus dem Antiserum zu entfernen. Das Eluat dieser Aufreinigung wurde anschließend mittels Affinitätsaufreinigung an MN-TG aufgereinigt. Durch dieses Verfahren konnte ein spezifischer α -Metanephrin-Antikörper gewonnen werden.

Ebenso konnte für das Normetanephrin-Antiserum durch eine einstufige Affinitätsaufreinigung kein spezifischer Antikörper erhalten werden. Der aufgereinigte Antikörper zeigte hier eine starke Verunreinigung mit Serumalbumin. Es wurden dann zunächst mittels einer Aufreinigung über Protein A/G-Plus-Sepharose vorwiegend die Immunglobuline des Isotyps G aus dem Antiserum gebunden. Das Eluat dieser Aufreinigung wurde anschließend der Affinitätsaufreinigung an NMN-TG unterzogen. Durch diese beiden Aufreinigungsschritte konnte ein spezifischer α -Normetanephrin-Antikörper gewonnen werden.

Beim α -Serotonin-Antikörper zeigte sich nach der Affinitätsaufreinigung über SERO-TG ein sehr hohes Hintergrundsignal im Assay. Hier erwies sich die nachträgliche Aufreinigung des Eluats aus der Affinitätsaufreinigung über Streptavidin-Sepharose als hilfreich, um das Hintergrundsignal um ein Vielfaches zu verringern.

In Tabelle 17 sind die jeweiligen Aufreinigungsstrategien für die Antiseren zusammengefasst.

Tabelle 17: Aufreinigungsstrategien für die Aufreinigung spezifischer Antikörper aus den polyklonalen Kaninchen-Antisera.

Antikörper	1. Aufreinigungsschritt	2. Aufreinigungsschritt
α -3-Methoxytyramin Nr. 3	Affinitätsaufreinigung über Ova-DOPA	nicht erforderlich
α -Metanephrin Nr. 7	prä-Adsorption an NMN-TG, SERO-TG und Ova-DOPA	Affinitätsaufreinigung über MN-TG
α -Normetanephrin Nr. 8	Affinitätsaufreinigung über Protein A/G	Affinitätsaufreinigung über NMN-TG
α -Serotonin Nr. 10	Affinitätsaufreinigung über SERO-TG	Biotin-Depletion mittels Streptavidin-Sepharose

Zur Kontrolle des Erfolgs der Antikörperaufreinigung sowie zur Überprüfung der Reinheit der Eluate, wurden die aufgereinigten Antikörper mittels LDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

Da die Aufreinigung der Antisera im *batch*-Verfahren mit einem Volumen von maximal 5,4 mL Antiserum pro Ansatz (parallele Durchführung in vier 2 mL Reaktionsgefäßen mit je 1,35 mL Antiserum) durchgeführt werden konnte, musste in mehreren Ansätzen aufgereinigt werden. Es wurden daher verschiedene Chargen an aufgereinigtem Antikörper generiert und in den Assays verwendet. Im Folgenden sind daher exemplarisch die Ergebnisse für eine der aufgereinigten Antikörper-Chargen gezeigt. Ebenso sind nur die Ergebnisse für diejenigen Antikörper gezeigt, die im fertig entwickelten Assay verwendet wurden, nicht jedoch die Ergebnisse der Antikörper, die nur während der Entwicklungsphase eingesetzt wurden.

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der LDS-PAGE für eine Charge der aufgereinigten Antikörper α -3-Methoxytyramin Nr. 3, α -Metanephrin Nr. 7, α -Normetanephrin Nr. 8 und α -Serotonin Nr. 10.

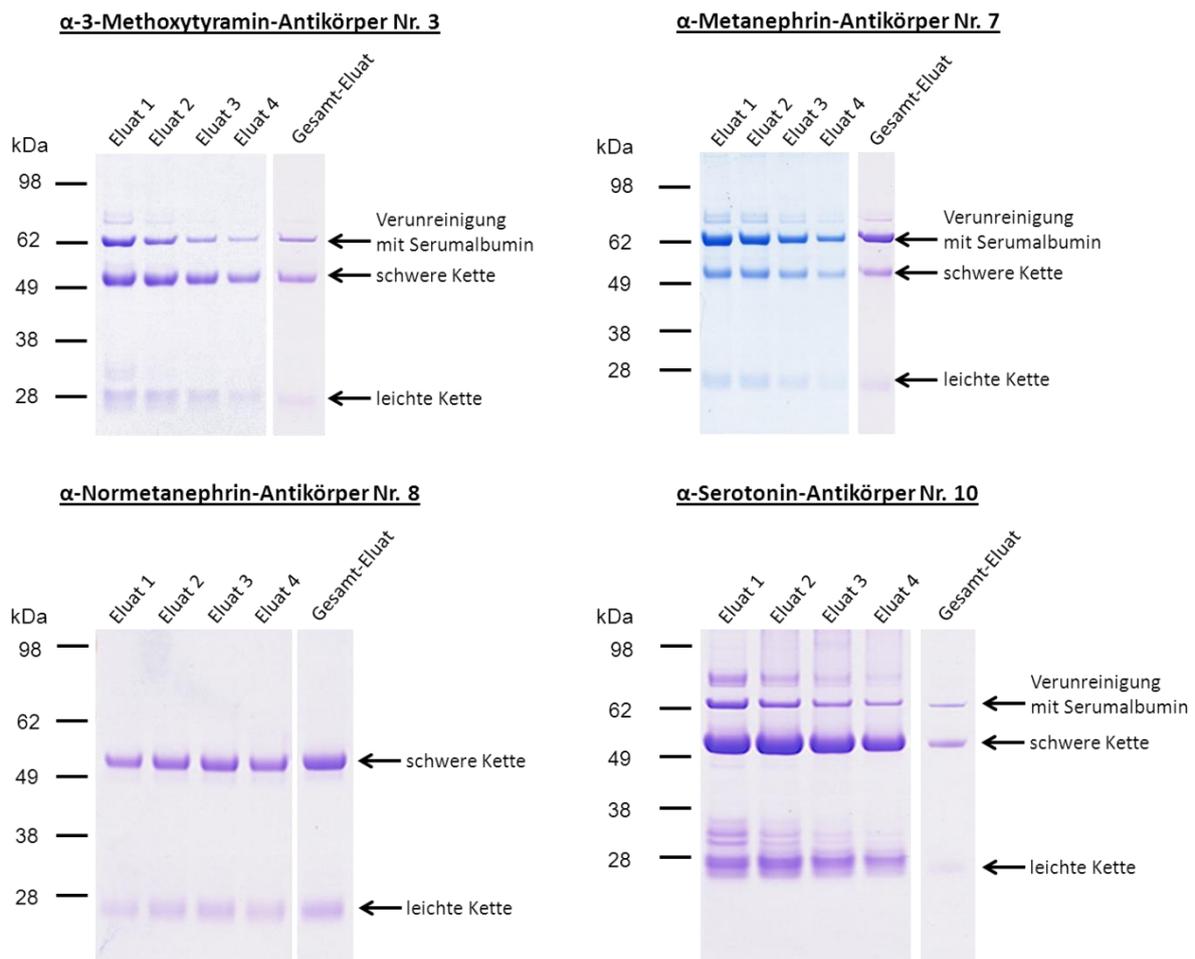


Abbildung 17: Ergebnis der Aufreinigung der Kaninchen-Antiseren. Die Eluate der Antikörperaufreinigung wurden mittels LDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Da die Elution in 4 Schritten erfolgte, wurden die 4 Eluate zunächst einzeln und anschließend die vereinigten Eluate auf dem Gel aufgetragen. Der α -3-Methoxytyramin-Antikörper Nr. 3 wurde mittels Affinitätschromatographie an Ova-DOPA aufgereinigt. Alle 4 Eluate wurden zu einem Gesamt-Eluat vereinigt. Der α -Metanephrin-Antikörper Nr. 7 wurde zweistufig aufgereinigt, zuerst über eine prä-Adsorption an NMN-TG, Ova-DOPA und SERO-TG und anschließend über Affinitätschromatographie an MN-TG. Hier wurden die Eluate 1-3 zu einem Gesamt-Eluat vereinigt. Beim α -Normetanephrin-Antikörper Nr. 8 wurden zunächst die Immunglobuline des Isotyps G aus dem Antiserum mittels Protein A/G herausgefangen und diese anschließend mit Hilfe der Affinitätschromatographie an NMN-TG aufgereinigt. Alle 4 Eluate wurden zu einem Gesamt-Eluat vereinigt. Der α -Serotonin-Antikörper Nr. 10 wurde zunächst über Affinitätschromatographie an SERO-TG aufgereinigt. Die beiden Eluate 1 und 2 wurden anschließend vereinigt und mittels Streptavidin-Sepharose nochmals aufgereinigt.

Abbildung 17 zeigt, dass nur die Aufreinigung des Normetanephrin-Antiserums einen Antikörper ohne Verunreinigungen lieferte. Die anderen drei Antikörper sind mit Serumalbumin bzw. weiteren Proteinen verunreinigt, welche trotz zweistufiger Aufreinigung nicht vollständig entfernt werden konnten. Es zeigte sich jedoch, dass diese Verunreinigungen im Assay keine Störungen hervorrufen, daher wurden die Gesamt-Eluate ohne weitere Aufreinigung zur Entfernung des Serumalbumins bzw. der anderen Proteine für die Immobilisierung der Antikörper auf den Mikrosphären eingesetzt.

Die Entscheidung, welche der vier Eluate zu einem Gesamt-Eluat vereinigt wurden, wurde anhand des Ergebnisses der LDS-PAGE und der Proteinbestimmung nach Bradford getroffen. Nur Eluate mit ausreichend hoher Reinheit und ähnlich hohem Proteingehalt wurden zu einem Gesamt-Eluat vereinigt. Als ausreichend rein wurden Eluate angesehen, die nur eine Verunreinigung mit Serumalbumin aufwiesen, jedoch keine starke Verunreinigung mit weiteren Proteinen zeigten.

Beim α -3-Methoxytyramin-AK und beim α -Normetanephrin-AK wurden aufgrund ausreichend hoher Reinheit und ähnlich hohem Proteingehalt alle vier Eluate zu einem Gesamt-Eluat vereinigt. Beim α -Metanephrin-AK wurden aufgrund einer deutlichen Reduktion der Proteinmenge in Eluat 4 nur die Eluate 1-3 vereinigt, um die Proteinkonzentration im Gesamt-Eluat nicht zu stark zu verringern. Beim α -Serotonin-AK wurden nur die beiden ersten Eluate vereinigt, da diese eine etwas höhere Proteinmenge enthielten als die Eluate 3 und 4. Diese beiden Eluate wurden anschließend mittels Streptavidin-Sepharose weiter aufgereinigt, was zu einer starken Reduktion der Proteinmenge führte, wie in Abbildung 17 an den schwachen Banden für das Gesamt-Eluat zu sehen ist. Allerdings konnte durch diesen weiteren Aufreinigungsschritt die Verunreinigung mit anderen Proteinen als Serumalbumin entfernt werden. Die in den jeweiligen Eluaten erhaltenen Proteinmengen sind in Tabelle 45 im Anhang aufgeführt. In Tabelle 18 sind die Ergebnisse der Proteinbestimmung nach Vereinigung der Eluate gezeigt. Diese Gesamt-Eluate wurden anschließend für die Immobilisierung auf MagPlex Mikrosphären eingesetzt.

Tabelle 18: Ergebnisse der Proteinbestimmung für die Gesamt-Eluate.

Antikörper	Ausgangs-	Protein-	Volumen	Protein-
	volumen			
	Antiserum			
	[mL]	[μ g]	[mL]	[μ g/mL]
α -3-Methoxytyramin Nr. 3	1,35	74,8	0,6	124,6
α -Metanephrin Nr. 7	5,5	469,5	2,0	234,7
α -Normetanephrin Nr. 8	4,7	193,2	1,45	133,2
α -Serotonin Nr. 10 [▲]	2,7	34,6	0,53	65,3

[▲] Das Ergebnis für den α -Serotonin-Antikörper Nr. 10 bezieht sich auf das Gesamt-Eluat nach Aufreinigung mittels Streptavidin-Sepharose, welche zu einem starken Proteinverlust führte. Dies erklärt den wesentlich geringeren Proteingehalt im Gesamt-Eluat im Vergleich zu den anderen Antikörpern.

Die Ergebnisse in Tabelle 18 zeigen, dass die Gesamt-Ausbeute bei der Antikörperaufreinigung gering ist. Um die Ursache für die hohen Verluste zu ermitteln,

wurden vom Sepharose-Material jeweils vor und nach Elution der Antikörper kleine Mengen entnommen und ebenfalls auf einem SDS-Gel analysiert. Dabei werden beim Denaturieren des Sepharose-Materials die gebundenen Antikörper gelöst und ebenfalls denaturiert und können im SDS-Gel aufgetrennt werden. Dabei zeigte sich, dass auch nach der Elution (die Elution erfolgte bei pH 2.5 für insgesamt 35 min) noch große Mengen an Antikörper auf dem Sepharose-Material gebunden waren (Daten nicht gezeigt). Selbst härtere Bedingungen wie eine zusätzlich hohe Salzkonzentration, alkalische Bedingungen oder Harnstoff konnten keine vollständige Elution der Antikörper bewirken.

4.3 Identifizierung geeigneter Antikörper

Die aufgereinigten Antikörper wurden auf MagPlex Mikrosphären immobilisiert und als Fängerantikörper im nicht-kompetitiven, multiplexen Immunoassay eingesetzt. Die Immobilisierungskonzentration betrug standardmäßig 50 µg/mL bei allen Immobilisierungen. Es wurden sowohl singleplexe als auch multiplexe Ansätze getestet, um eine Aussage über die Kreuzreaktivität der jeweiligen Antikörper treffen zu können. Für die Identifizierung eines geeigneten Antikörpers wurden der Verlauf der Standardkurve, die Signalintensität, das Hintergrundsignal sowie die Kreuzreaktivität beurteilt. Folgend sind exemplarisch die Ergebnisse für eine Charge der aufgereinigten Antikörper gezeigt. Auch hier ergaben sich Chargen-spezifische Unterschiede im Hinblick auf Signalintensitäten, Hintergrundsignale sowie Kreuzreaktivitäten. Abbildung 18 zeigt die Standardkurven für die aufgereinigten α -3-Methoxytyramin-Antikörper.

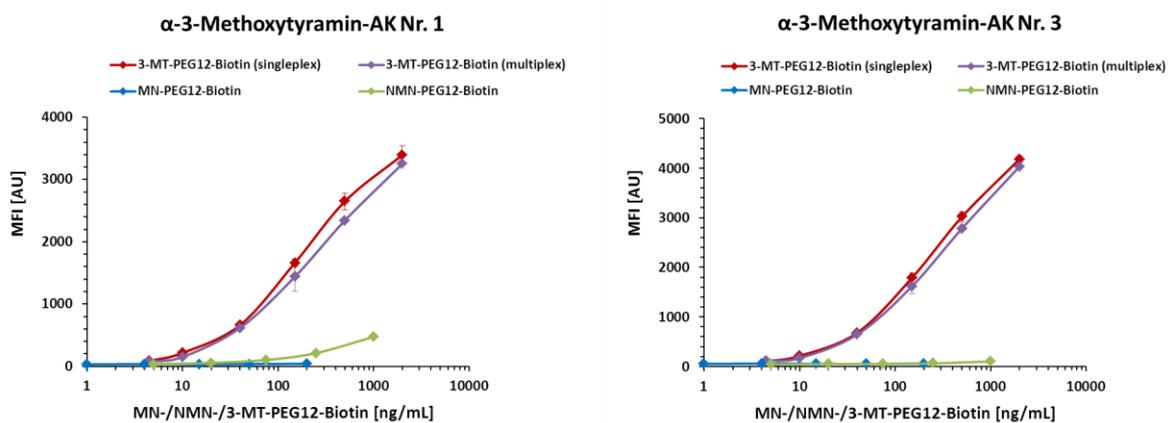


Abbildung 18: Test der α -3-Methoxytyramin-AK im nicht-kompetitiven Assay zur Identifizierung eines geeigneten Antikörpers. Um einen als Fängerantikörper geeigneten α -3-Methoxytyramin-AK zu identifizieren, wurden singleplexe Assays mit jeweils einem der Analyten sowie ein multiplexer Assay durchgeführt, um die Kreuzreaktivität zu den Metanephrienen zu testen.

In Abbildung 18 ist zu sehen, dass sich grundsätzlich beide Antikörper für den Einsatz als Fängerantikörper im multiplexen Assay eignen. Jedoch zeigt der α -3-Methoxytyramin-AK Nr. 1 eine deutliche Kreuzreaktivität zu Normetanephrin. Das Hintergrundsignal ist bei beiden Antikörpern niedrig, es beträgt bei AK Nr. 1 32 MFI und bei AK Nr. 3 45 MFI. Daher wurde für die weitere Entwicklung des Dopamin- bzw. 3-Methoxytyramin-Assays der Antikörper Nr. 3 verwendet.

Abbildung 19 zeigt die Standardkurven für die aufgereinigten α -Metanephrin-Antikörper.

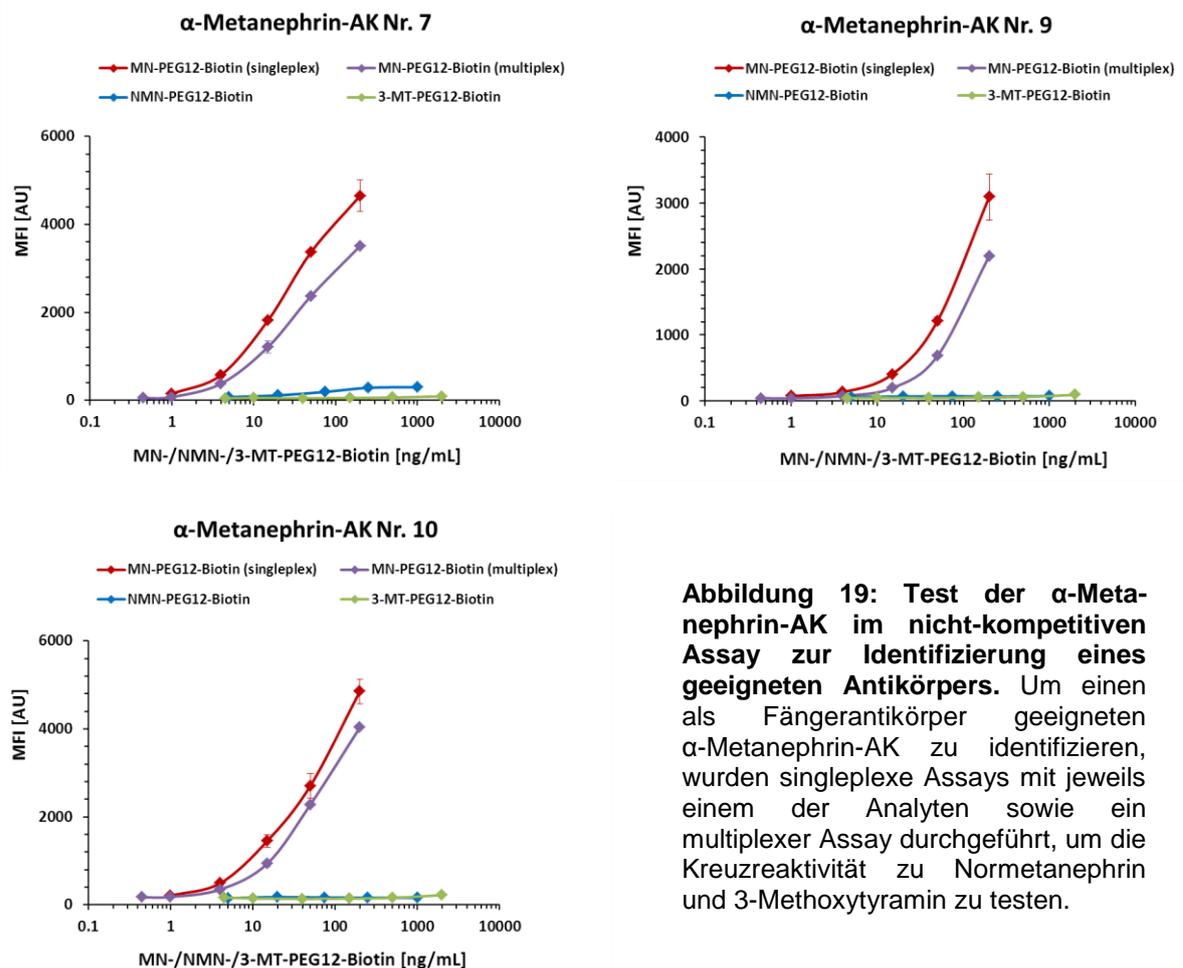


Abbildung 19: Test der α -Metanephrin-AK im nicht-kompetitiven Assay zur Identifizierung eines geeigneten Antikörpers. Um einen als Fängerantikörper geeigneten α -Metanephrin-AK zu identifizieren, wurden singleplexe Assays mit jeweils einem der Analyten sowie ein multiplexer Assay durchgeführt, um die Kreuzreaktivität zu Normetanephrin und 3-Methoxytyramin zu testen.

Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, kann mit allen drei α -Metanephrin-Antikörpern eine Standardkurve mit guten Signalen generiert werden. Antikörper Nr. 7 zeigt eine leichte Kreuzreaktivität zu Normetanephrin, die jedoch nur zwischen 0,3-2 % liegt. Bei der Standardkurve von Antikörper Nr. 9 steigt das Signal erst ab 10 ng/mL an, die Kurve zeigt daher bei niedrigen Metanephrinkonzentrationen einen etwas zu flachen Verlauf. Das Hintergrundsignal liegt bei AK Nr. 7 bei 63 MFI, bei AK Nr. 9 bei 56 MFI und bei AK Nr. 10 bei 140 MFI. Prinzipiell eignen sich hier alle Antikörper für eine Verwendung im Adrenalin-

bzw. Metanephrin-Assay, für die Entwicklungs- und Validierungsphase wurde AK Nr. 7 aufgrund der guten Sensitivität, des guten Kurvenverlaufs und des niedrigen Hintergrundsignals ausgewählt.

Abbildung 20 zeigt die Standardkurven für die aufgereinigten α -Normetanephrin-Antikörper.

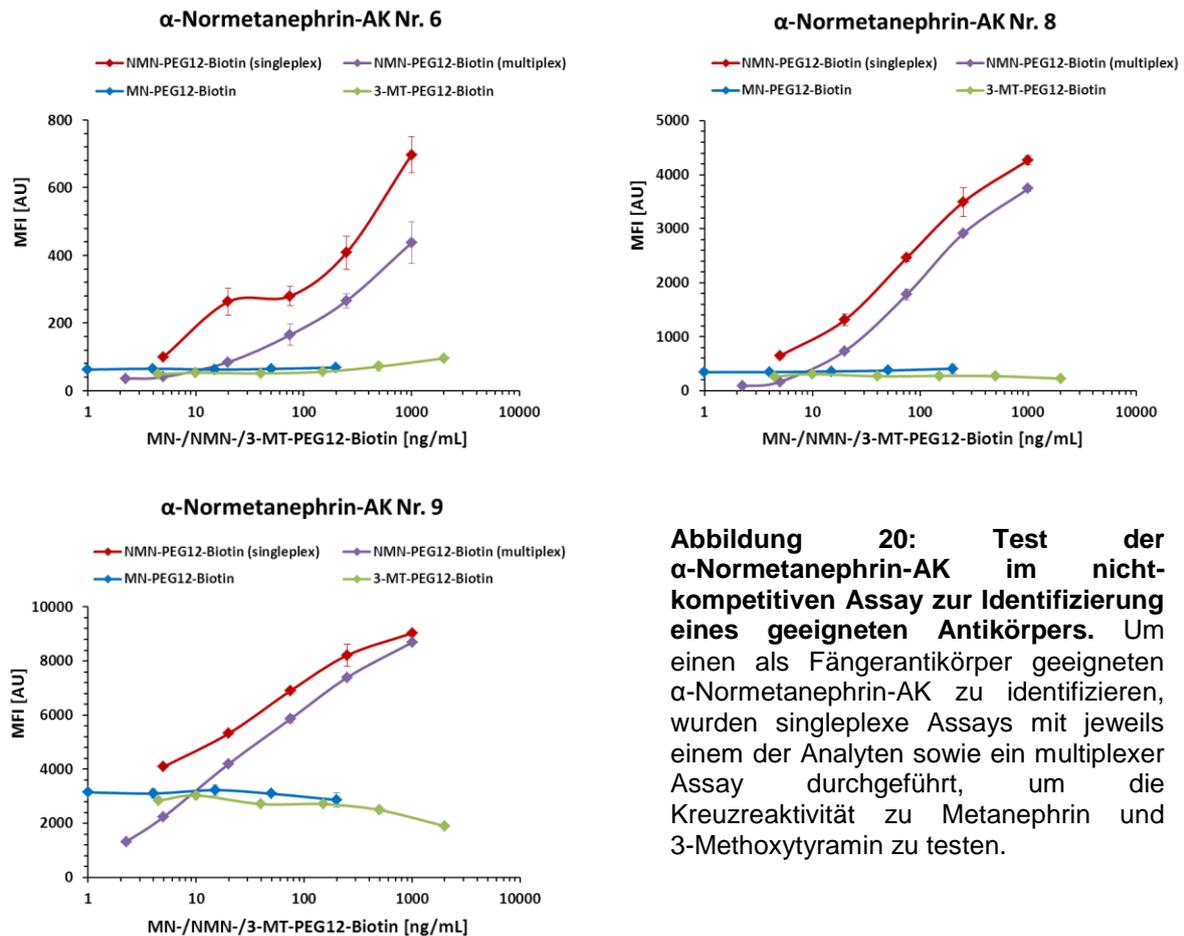


Abbildung 20: Test der α -Normetanephrin-AK im nicht-kompetitiven Assay zur Identifizierung eines geeigneten Antikörpers. Um einen als Fängerantikörper geeigneten α -Normetanephrin-AK zu identifizieren, wurden singleplexe Assays mit jeweils einem der Analyten sowie ein multiplexer Assay durchgeführt, um die Kreuzreaktivität zu Metanephrin und 3-Methoxytyramin zu testen.

Abbildung 20 zeigt, dass bei den α -Normetanephrin-Antikörpern nur mit AK Nr. 8 eine gute Standardkurve erhalten werden konnte. AK Nr. 6 zeigt einen instabilen Verlauf im singleplexen Ansatz sowie auch hohe Schwankungen im Multiplex. AK Nr. 9 weist ein sehr hohes Hintergrundsignal von 3292 MFI im singleplexen Ansatz auf, jedoch nicht im multiplexen Ansatz. Auch für AK Nr. 8 ist das Hintergrundsignal im singleplexen Ansatz hoch (418 MFI), im multiplexen Ansatz hingegen sehr niedrig (16 MFI). Daher wurde für die weitere Entwicklung des nicht-kompetitiven Noradrenalin- bzw. Normetanephrin-Assays der AK Nr. 8 verwendet.

Abbildung 21 zeigt die Standardkurven für die aufgereinigten α -Serotonin-Antikörper. Die α -Serotonin-Antikörper wurden bei diesem Versuch nur im Singleplex getestet.

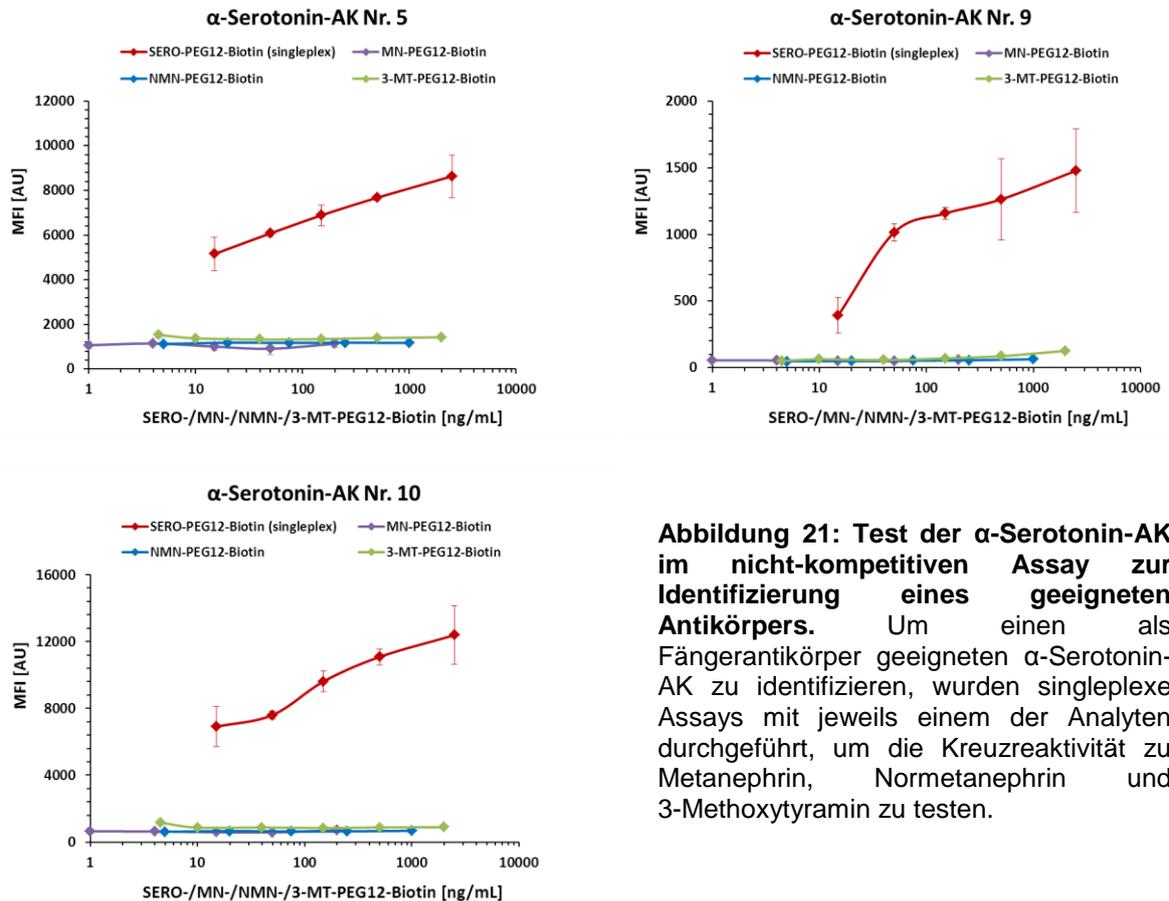


Abbildung 21: Test der α -Serotonin-AK im nicht-kompetitiven Assay zur Identifizierung eines geeigneten Antikörpers. Um einen als Fängerantikörper geeigneten α -Serotonin-AK zu identifizieren, wurden singleplexe Assays mit jeweils einem der Analyten durchgeführt, um die Kreuzreaktivität zu Metanephrin, Normetanephrin und 3-Methoxytyramin zu testen.

Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, zeigt der α -Serotonin-Antikörper Nr. 5 einen guten Kurvenverlauf. Jedoch weist er ein sehr hohes Hintergrundsignal von 1066 MFI auf. AK Nr. 9 zeigt einen sehr schlechten Verlauf der Standardkurve mit starken Schwankungen. AK Nr. 10 weist ebenfalls etwas höhere Schwankungen auf, das Hintergrundsignal liegt hier bei 630 MFI. Keiner der Antikörper zeigt eine nennenswerte Kreuzreaktivität zu den Metanephrinen. Prinzipiell sind daher sowohl AK Nr. 5 als auch AK. Nr. 10 für den Einsatz im Serotonin-Assay geeignet, für die weitere Entwicklung des Assays wurde aber nur Antikörper Nr. 10 verwendet.

4.4 Optimierung der multiplexen Immunoassays

Im Rahmen der Optimierung der multiplexen Immunoassays für Catecholamine, Metanephrine und Serotonin wurde nochmals überprüft, welches Acylierungsreagenz am geeignetsten ist. Darüber hinaus wurden verschiedene Konzentrationen für das Acylierungsreagenz, verschiedene Inkubationszeiten für die Acylierungsreaktion sowie die enzymatische Umwandlung, verschiedene Puffer sowie verschiedene Streptavidine im Assay getestet. Zudem wurde versucht, das hohe Hintergrundsignal im Serotonin-Assay zu reduzieren.

Verifizierung der Eignung des Acylierungsreagenzes im multiplexen Immunoassay

Da das Acylierungsreagenz bisher nur in einem indirekten, singleplexen Ansatz mit Mikrosphären, die mit dk-a-rb-IgG-AK beladen waren, getestet wurde, wurde die Eignung von NHS-PEG₁₂-Biotin als Acylierungsreagenz im nicht-kompetitiven Ansatz mit immobilisierten spezifischen Fängerantikörpern nochmals überprüft. Zusätzlich wurde getestet, ob ein Acylierungsreagenz mit zwei Biotin-Molekülen zu einer Steigerung der Signalintensitäten führt, da somit nicht nur ein sondern zwei markierte Streptavidine binden können. Dafür wurden die in Tabelle 12 dargestellten Acylierungsreagenzien eingesetzt. NHS-Biotin wurde nicht mehr getestet, da mit diesem Acylierungsreagenz bereits im Vorversuch für alle Analyten keine Signale erhalten werden konnten. Abbildung 22 und Tabelle 19 zeigen die Ergebnisse für den Einsatz unterschiedlicher Acylierungsreagenzien im multiplexen Assay.

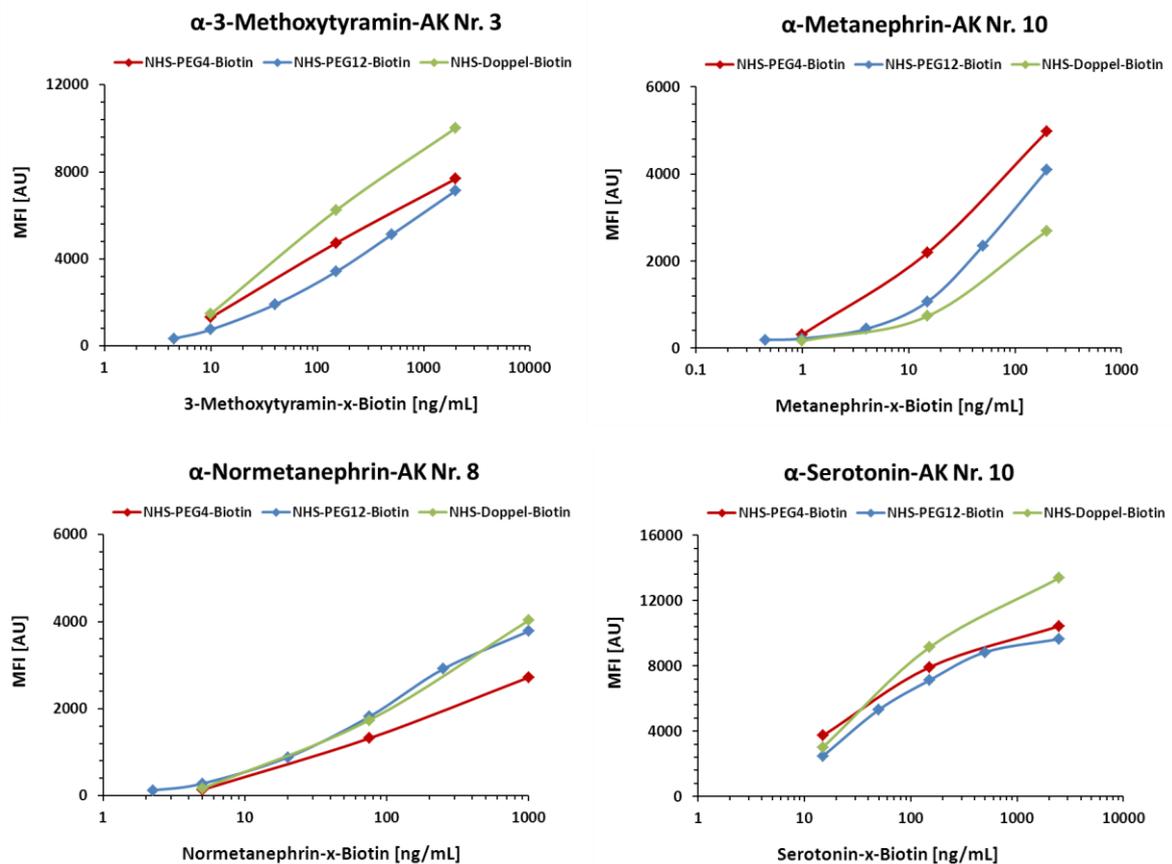


Abbildung 22: Test verschiedener Acylierungsreagenzien im multiplexen Assay. Da die Acylierungsreagenzien bisher nur im Vorversuch getestet wurden, wurden NHS-PEG₄-Biotin, NHS-PEG₁₂-Biotin und ein NHS-Doppel-Biotin nochmals im finalen multiplexen Assay getestet. Durch Verwendung eines Acylierungsreagenzes mit zwei Biotin-Molekülen wurde eine Steigerung der Signalintensitäten erwartet.

Tabelle 19: Hintergrundsignale bei der Verwendung verschiedener Acylierungsreagenzien im multiplexen Assay.

Acylierungsreagenz	3-Methoxytyramin [MFI]	Metanephrin [MFI]	Normetanephrin [MFI]	Serotonin [MFI]
NHS-PEG ₄ -Biotin	1279	136	52	1493
NHS-PEG ₁₂ -Biotin	71	120	16	33
NHS-Doppel-Biotin	603	143	51	516

Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, eignen sich prinzipiell alle Acylierungsreagenzien, es gibt jedoch Analyt-spezifische Unterschiede. Für 3-Methoxytyramin konnten zwar mit NHS-PEG₄-Biotin und NHS-Doppel-Biotin höhere Signale erhalten werden als mit NHS-PEG₁₂-Biotin, allerdings war das Hintergrundsignal bei NHS-PEG₁₂-Biotin wesentlich niedriger als bei den anderen Acylierungsreagenzien. Für Metanephrin wurden die höchsten Signale mit NHS-PEG₄-Biotin erhalten, die niedrigsten, entgegen der Erwartungen, mit NHS-Doppel-Biotin. Die Hintergrundsignale waren mit allen Reagenzien

vergleichbar. Für Normetanephrin konnten mit NHS-PEG₁₂-Biotin und NHS-Doppel-Biotin vergleichbare Signalintensitäten erzielt werden, mit NHS-PEG₄-Biotin waren die Signalintensitäten jedoch wesentlich geringer. Zudem war hier das Hintergrundsignal bei NHS-PEG₁₂-Biotin am niedrigsten. Auch bei Serotonin sind die Signalintensitäten bei NHS-PEG₄-Biotin und NHS-Doppel-Biotin am höchsten, jedoch sind hier auch die Hintergrundsignale sehr hoch.

Da mit dem NHS-Doppel-Biotin die erwartete Steigerung der Signalintensitäten nur mäßig ausfiel und vor allem bei Metanephrin die Signalintensitäten sogar geringer waren als bei den anderen Acylierungsreagenzien, wurde das NHS-Doppel-Biotin nicht weiter im Assay eingesetzt. Mit NHS-PEG₄-Biotin konnten zwar bei allen Analyten bis auf Normetanephrin höhere Signalintensitäten erzielt werden als mit NHS-PEG₁₂-Biotin, jedoch waren für 3-Methoxytyramin und Serotonin die Hintergrundsignale sehr hoch.

Aufgrund der Tatsache, dass mit NHS-PEG₄-Biotin keine wesentliche Verbesserung der Assays erzielt werden konnte und es dazu noch zu einer Erhöhung des Hintergrundsignals kam, wurde für die weitere Assayentwicklung weiterhin, wie bereits im Vorversuch ermittelt, NHS-PEG₁₂-Biotin als Acylierungsreagenz verwendet.

Test verschiedener Konzentrationen des Acylierungsreagenzes

Für die Acylierung im ELISA wird das Acylierungsreagenz in einer Konzentration von 50 mg/mL eingesetzt. Es wurde untersucht, ob auch eine geringere Menge an Acylierungsreagenz eingesetzt werden kann. Dies wäre nicht nur mit reduzierten Kosten verbunden, sondern auch mit einer Reduktion des Hintergrundsignals, welches zu einem großen Teil durch das Acylierungsreagenz hervorgerufen wird.

Da hier bei allen Analyten derselbe Effekt, nämlich die Reduktion der Signalintensität, auftrat, ist exemplarisch nur das Ergebnis für Adrenalin (Metanephrin) gezeigt, bei welchem die stärkste Reduktion des Signals beobachtet werden konnte. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse für den Test verschiedener Konzentrationen des Acylierungsreagenzes bei der Acylierung von Adrenalin im multiplexen Catecholamin-Assay.

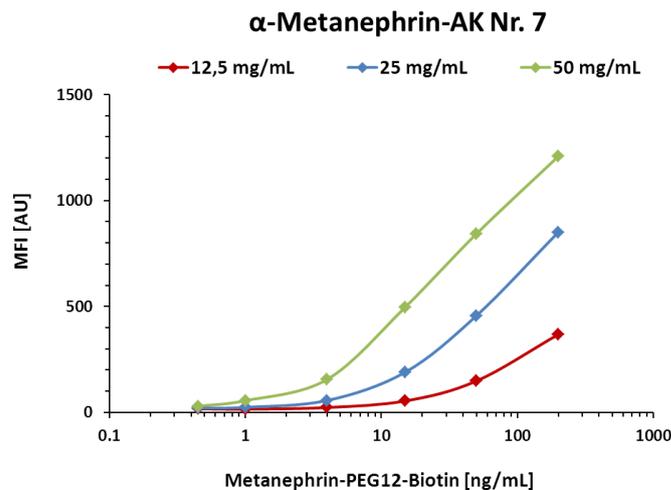


Abbildung 23: Test verschiedener Konzentrationen des Acylierungsreagenzes am Beispiel Adrenalin. Für die Acylierung von Adrenalin wurde NHS-PEG₁₂-Biotin in den Konzentrationen 12,5 mg/mL, 25 mg/mL und 50 mg/mL eingesetzt. Anschließend wurden die enzymatische Umwandlung und der multiplexe Catecholamin-Assay mit dem α -Metanephrin-Antikörper Nr. 7 durchgeführt.

Die Reduktion der Menge an Acylierungsreagenz führt erwartungsgemäß zu einer Reduktion der Signale, jedoch ist dieser Effekt bei der Acylierung von Adrenalin am stärksten ausgeprägt. Hier wird die Signalintensität sehr stark reduziert, wenn weniger Acylierungsreagenz eingesetzt wird. Da bei Adrenalin bzw. Metanephrin die Signale schon bei Einsatz von 50 mg/mL verhältnismäßig niedrig sind, sollten die Signalintensitäten nicht weiter reduziert werden. Daher wird die Konzentration von 50 mg/mL für die Acylierung der Catecholamine, Metanephrine und Serotonin beibehalten.

Ermittlung der optimalen Inkubationszeit für die Acylierung und enzymatische Umwandlung im Catecholamin-Assay

Im 3-CAT-ELISA von LDN erfolgt die Acylierung mit NHS-Biotin für 15 min und die enzymatische Umwandlung der acylierten Catecholamine für 30 min. Da im multiplexen Assay NHS-PEG₁₂-Biotin für die Acylierung eingesetzt wird und dieses durch seine Größe eine andere Kinetik aufweist als das wesentlich kleinere NHS-Biotin, wurde getestet, wie sich unterschiedlich lange Inkubationszeiten für die Acylierung auf die Signalintensitäten in der Standardkurve auswirken. Zudem wurde versucht, durch Erhöhung der Inkubationszeit für die enzymatische Umwandlung eine vollständigere Umsetzung der Catecholamine und damit eine höhere Signalintensität zu erreichen. Für die Acylierung wurden Inkubationszeiten von 15 min, 30 min und 1 h getestet, für die enzymatische Umwandlung Inkubationszeiten von 30 min, 1 h und 2 h. Das Ergebnis dieses Versuchs ist am Beispiel von Dopamin in Abbildung 24 anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses (S/N-Verhältnis, *signal to noise ratio*) dargestellt.

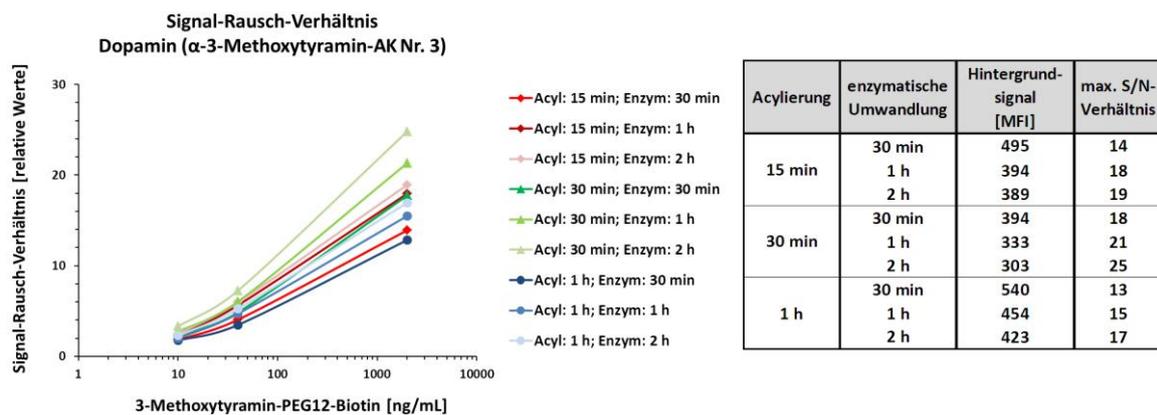


Abbildung 24: Test verschiedener Inkubationszeiten für die Acylierung und enzymatische Umwandlung im Dopamin-Assay. Für die Acylierung von Dopamin wurden Inkubationszeiten von 15 min, 30 min und 1 h getestet, für die enzymatische Umwandlung Inkubationszeiten von 30 min, 1 h und 2 h. Anschließend wurde der multiplexe Catecholamin-Assay mit dem α -3-Methoxytyramin-AK Nr. 3 durchgeführt.

Abbildung 24 zeigt, dass sich die erhaltenen Signal-Rausch-Verhältnisse für die verschiedenen Inkubationszeiten für Acylierung und enzymatische Umwandlung nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Demzufolge erhält man zwar bei einer Acylierungsdauer von 30 min und einer Dauer für die enzymatische Umwandlung von 2 h das beste Signal-Rausch-Verhältnis sowie das niedrigste Hintergrundsignal, doch ist eine Dauer für die enzymatische Umwandlung von 2 h zeitaufwendig und die erhaltenen Signalintensitäten sind dadurch nur unwesentlich höher. Ein guter Kompromiss stellt eine Acylierungsdauer von 30 min und eine Dauer für die enzymatische Umwandlung von 1 h dar. Hier erhält man ebenfalls ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis und ein niedriges Hintergrundsignal. Mitunter am schlechtesten schneidet die Kombination aus 15 min Acylierung und 30 min enzymatischer Umwandlung, wie sie im LDN ELISA eingesetzt wird, ab. Hier ist das Signal-Rausch-Verhältnis schlechter sowie das Hintergrundsignal wesentlich höher. Allgemein sind jedoch die Hintergrundsignale für diesen Antikörper bei allen Kombinationen hoch.

Ermittlung eines geeigneten Puffersystems

Während der Entwicklungsphase wurden zunächst zwei verschiedene Puffer, das Blocking Reagent for ELISA/0,05 % Tween 20 und PBS/0,5 % BSA/0,05 % Tween 20 als Puffersysteme für die Mikrosphären sowie das Streptavidin eingesetzt. Der vor allem bei den Vorversuchen eingesetzte Puffer aus PBS/0,5 % BSA/0,05 % Tween 20 wurde in der späteren Entwicklungsphase nicht mehr verwendet, da das im Puffer enthaltene BSA zu Störungen führen könnte, da als Trägerprotein für die Immunisierung ebenfalls BSA

verwendet wurde und sich somit zu einem gewissen Anteil auch α -BSA-Antikörper auf den Mikrosphären befinden. Um Kreuzreaktivitäten im multiplexen Ansatz zu eliminieren, wurde jedoch zusätzlich LowCross-Puffer als Assaypuffer getestet. Der Vergleich zwischen den beiden Puffersystemen ist in Abbildung 25 dargestellt.

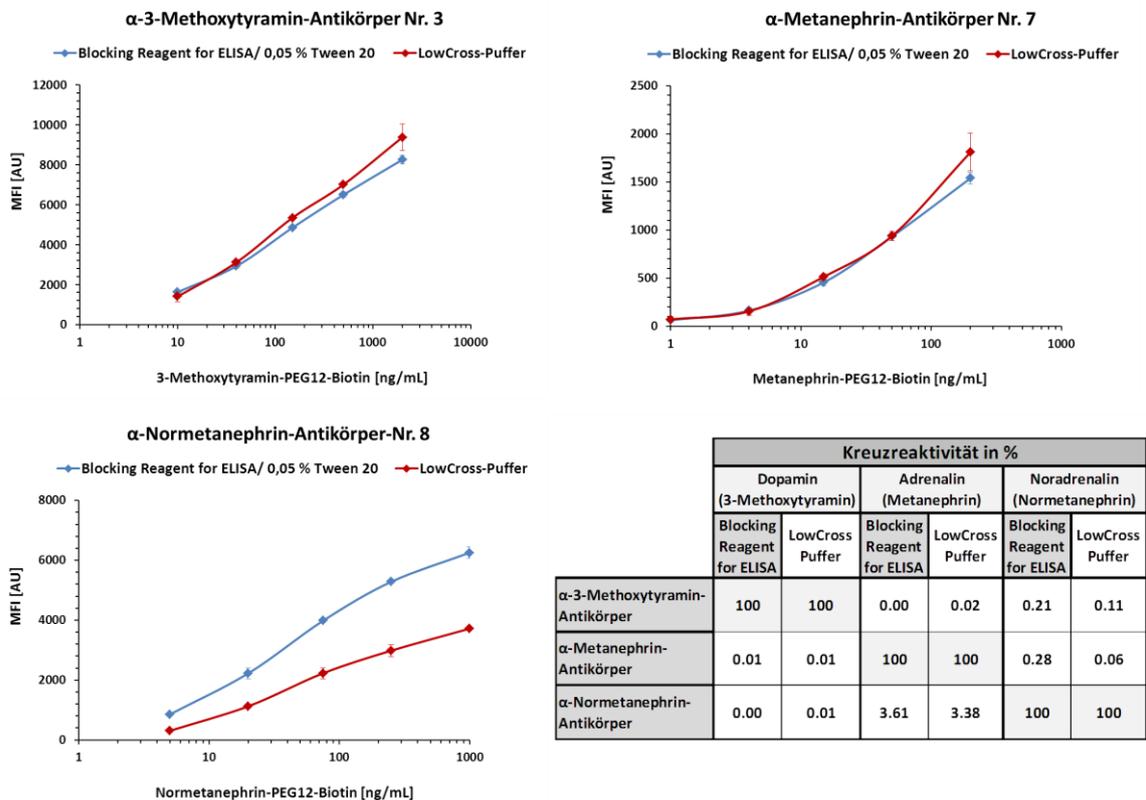


Abbildung 25: Test unterschiedlicher Puffersysteme für Mikrosphären und Streptavidin im multiplexen Catecholamin-Assay. Als Puffersystem für Mikrosphären und Streptavidin im multiplexen Catecholamin-Assay wurden Blocking Reagent for ELISA/ 0,05 % Tween 20 sowie LowCross-Puffer getestet. Es wurde untersucht, inwieweit das Puffersystem die Signalintensitäten und den Verlauf der Standardkurve beeinflusst und ob sich durch Einsatz eines speziellen Puffers zur Reduktion von unspezifischen Bindungen die Kreuzreaktivität reduzieren lässt.

Abbildung 25 zeigt, dass für den α -3-Methoxytyramin-AK Nr. 3 sowie den α -Metanephrin-AK Nr. 7 beide Puffersysteme geeignet sind und vergleichbare Signalintensitäten liefern. Die Kreuzreaktivität zu den anderen Analyten ist für beide Antikörper in beiden Puffersystemen gering. Für den α -Normetanephrin-AK Nr. 8 jedoch können große Unterschiede zwischen den beiden Puffersystemen festgestellt werden. Durch Verwendung des LowCross-Puffers kommt es zu einer starken Reduktion der Signalintensitäten, jedoch wird die Kreuzreaktivität zu Adrenalin kaum reduziert. Daher wirkt sich die Verwendung von LowCross-Puffer nachteilig auf den multiplexen Catecholamin-Assay aus und folglich wird das Blocking Reagent for ELISA/0,05 % Tween 20 als Puffersystem beibehalten.

Ermittlung eines geeigneten Streptavidin-Phycoerythrins

Es konnte beobachtet werden, dass das Hintergrundsignal bei den multiplexen Catecholamin- bzw. Metanephrin/Serotonin-Assays sehr stark vom verwendeten Streptavidin-Phycoerythrin abhängt. Daher wurden sechs verschiedene kommerziell erhältliche sowie drei sonderangefertigte Streptavidine getestet und ermittelt, mit welchem das niedrigste Hintergrundsignal erhalten wird. Durch Reduktion des Hintergrundsignals verbessert sich auch das Signal-Rausch-Verhältnis des Assays. Da für alle Analyten ähnliche Ergebnisse erhalten wurden, zeigt Abbildung 26 die Ergebnisse des Versuchs zur Identifizierung eines geeigneten Streptavidins am Beispiel des α -3-Methoxytyramin-Antikörpers Nr. 3.

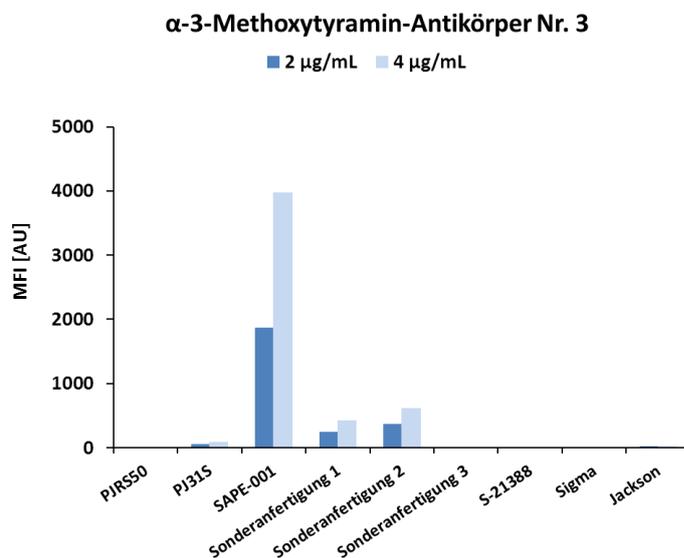


Abbildung 26: Test verschiedener Streptavidine. Um ein für die multiplexen Assays geeignetes Streptavidin-Phycoerythrin zu ermitteln, wurden verschiedene Streptavidine in den Konzentrationen 2 µg/mL und 4 µg/mL mit den Mikrosphären, auf welchen die spezifischen Antikörper immobilisiert waren, inkubiert. Es wurde das Hintergrundsignal gemessen, welches die einzelnen Streptavidine auf den Mikrosphären erzeugen.

In Abbildung 26 ist zu sehen, dass das Hintergrundsignal sehr stark vom verwendeten Streptavidin abhängt. Mit den Streptavidinen der Firma Moss Inc. (SAPE-001, Sonderanfertigung 1 und 2) wird ein sehr hohes Hintergrundsignal erzeugt, diese sind daher für den Einsatz im Assay nicht geeignet. Das Streptavidin PJ31S erzeugt ebenfalls ein erhöhtes Hintergrundsignal und ist daher nicht geeignet. Das Streptavidin Jackson zeigt ebenfalls eine leichte Erhöhung des Hintergrundsignals. Daher können im Assay nur die Streptavidine PJRS50, S-21388, Sigma und die Sonderanfertigung 3 von Life Technologies verwendet werden. Auf Grund der besseren Verfügbarkeit wurde für die weitere Entwicklung das Streptavidin-R-Phycoerythrin PJRS50 eingesetzt.

Reduktion des Hintergrundsignals im Metanephrin/Serotonin-Assay

Für den Metanephrin/Serotonin-Assay wurde ein ungewöhnlich hohes Hintergrundsignal von mehreren Tausend MFI erhalten. Dies war bedingt durch die Tatsache, dass bei diesem Assay nach der Acylierung kein Waschschrift erfolgt, sondern der Acylierungsansatz direkt im multiplexen Assay eingesetzt wird. Da nach einer Acylierungszeit von 15 min jedoch noch sehr viel aktives NHS-PEG₁₂-Biotin im Ansatz vorhanden ist, führt dies dazu, dass auch die auf den Mikrosphären immobilisierten Antikörper acyliert werden. Somit kann das Streptavidin-Phycoerythrin nicht nur an biotinylierte Metanephrene oder biotinyliertes Serotonin binden, sondern auch an biotinylierte Antikörper. Dies erzeugt folglich ein sehr hohes Hintergrundsignal. Um dies zu verhindern, wurde nach der Acylierung Glycin oder Ethanolamin zum Acylierungsansatz hinzugegeben, damit das überschüssige NHS-PEG₁₂-Biotin mit den freien NH₂-Gruppen dieser Reagenzien abreagieren kann und somit später nicht die Antikörper auf den Mikrosphären acyliert. Es wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen für Glycin und Ethanolamin getestet, die Ergebnisse sind in Abbildung 27 am Beispiel von Serotonin dargestellt.

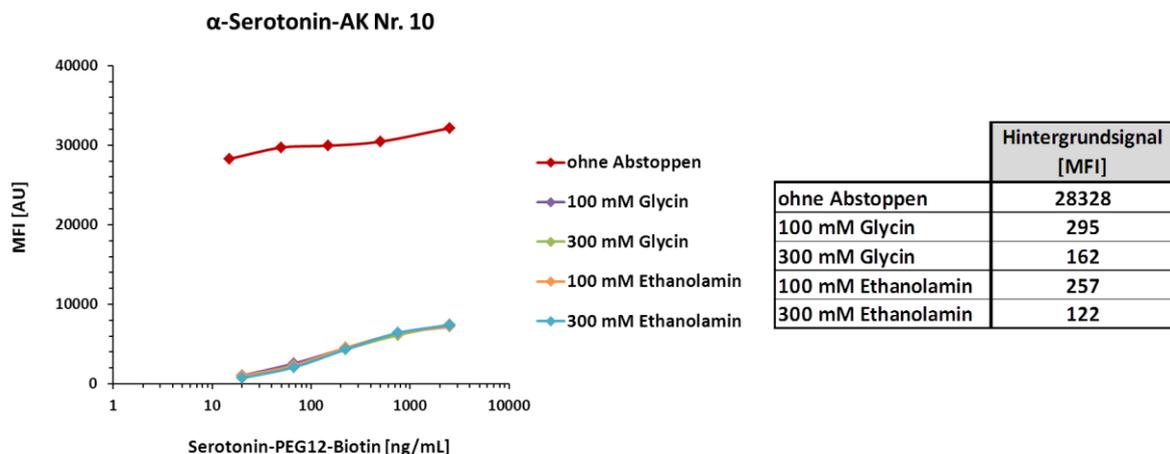


Abbildung 27: Abstoppen der Acylierungsreaktion im Metanephrin/Serotonin-Assay. Überschüssiges Acylierungsreagenz nach der Acylierung der Metanephrene und von Serotonin führt zu einer Acylierung der Antikörper auf den Mikrosphären und damit zu einem hohen Hintergrundsignal. Um dies zu vermeiden wurden unterschiedliche Konzentrationen an Glycin und Ethanolamin nach der Acylierung zum Ansatz gegeben. Die freien NH₂-Gruppen dieser Reagenzien sollen überschüssiges NHS-PEG₁₂-Biotin abfangen, damit es zu keiner Biotinylierung der Antikörper mehr kommt. Auf diese Weise wurde eine starke Reduktion des Hintergrundsignals erreicht.

In Abbildung 27 ist zu sehen, dass das sehr hohe Hintergrundsignal, welches ohne Abstoppen der Acylierungsreaktion auftrat, durch Abreagieren des überschüssigen

NHS-PEG₁₂-Biotins mit Glycin oder Ethanolamin stark reduziert werden kann. Das niedrigste Hintergrundsignal wurde bei Einsatz von 300 mM Ethanolamin erhalten, wobei auch 300 mM Glycin zu einer ähnlich starken Reduktion führten. Mit 100 mM der beiden Reagenzien wird zwar auch eine sehr starke Reduktion erreicht, jedoch ist das Hintergrundsignal doppelt so hoch wie bei Einsatz von 300 mM des jeweiligen Reagenzes. Daher wird für die weitere Entwicklung 300 mM Ethanolamin zum Abstoppen der Acylierungsreaktion im Metanephrin/Serotonin-Assay eingesetzt.

4.5 Auswahl von geeignetem Probenmaterial – Generierung von Qualitätskontrollen

In der Einleitung wurde bereits ausführlich beschrieben, dass viele Krankheitsbilder mit der Veränderung der Konzentration von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Plasma und im Urin sowie auch in anderen Körperflüssigkeiten einhergehen. Daher wäre eine Anwendung des multiplexen Catecholamin- und Metanephrin/Serotonin-Assays für Plasma und Urin wünschenswert. Im Folgenden wird gezeigt, dass die Anwendung der Assays für die Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin erfolgreich demonstriert werden konnte, während die Entwicklung der Assays für die Quantifizierung der Analyten in Plasmaproben noch nicht erfolgreich abgeschlossen werden konnte. Die Gründe hierfür sind in Abschnitt 5.4 erläutert.

4.5.1 Auswahl eines geeigneten Urinspenders

Für die Validierung von Immunoassays sollte, sofern möglich, Probenmaterial eingesetzt werden, dessen Matrix derjenigen Probenmatrix entspricht, in welcher später auch die Quantifizierung der Analyten im Assay durchgeführt werden soll. Dabei sollten Proben verwendet werden, die den gewünschten Analyten in unterschiedlichen Konzentrationen, verteilt über den gesamten Bereich der Standardkurve, enthalten. Es ist jedoch schwierig, ein solches Set an Proben zu erhalten, da bei gesunden Spendern die Konzentrationen für die Catecholamine, Metanephrine und Serotonin nur im untersten Bereich der Standardkurve liegen. Daher ist es in solchen Fällen sinnvoll, durch *Spiken* mit synthetisch hergestellten Substanzen eine hohe Konzentration der Analyten in der Urinprobe zu simulieren. Hierfür wurde ein gesunder Urinspender ausgewählt, dessen endogene Konzentrationen an Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin sehr niedrig sind, damit durch *Spiken* mit verschiedenen Mengen an synthetischen Substanzen

Urinproben hergestellt werden konnten, deren Analytkonzentrationen über den gesamten Bereich der Standardkurve verteilt sind. Zusätzlich wurde ein synthetisch hergestellter Urin getestet, bei welchem keine endogenen Catecholamine, Metanephrine oder Serotonin vorhanden sind. Tabelle 20 zeigt die endogenen Konzentrationen an Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin für die getesteten Urinspender sowie den synthetischen Urin.

Tabelle 20: Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin in Urinproben von gesunden Spendern sowie in synthetisch hergestelltem Urin zur Identifizierung einer geeigneten Urinprobe für die Generierung von Qualitätskontrollen.

Spender Nr.	Adrenalin [ng/mL]	Noradrenalin [ng/mL]	Dopamin [ng/mL]	MN [ng/mL]	NMN [ng/mL]	3-MT [ng/mL]	Serotonin [ng/mL]
1	3,3	3,8	116,8	26,2	5,3	8,2	41,8
2	4,8	5,8	247,3	88,1	16,9	20,1	90,6
3	11,2	7,0	235,8	107,0	12,6	17,8	99,1
4	6,9	9,9	344,2	629,2	88,7	91,3	414,2
5	4,3	3,9	160,5	296,8	24,1	27,7	98,1
6	7,3	6,4	266,6	164,3	17,8	21,0	81,6
7	2,3	0,7	35,4	23,8	2,9	3,7	10,9
8	5,5	5,0	208,3	129,4	14,3	23,0	99,2
9	16,3	6,6	252,6	357,7	39,9	38,3	138,6
10	9,3	8,7	350,5	693,9	67,0	53,9	282,9
11	1,1	0,6	15,4	80,7	13,5	7,3	13,4
12	0,6	4,4	54,7	32,4	5,2	6,5	8,7
synthetischer Urin	0,38	0,7	1,4	0,4	0,6	0,6	< 1,01

Tabelle 20 zeigt, dass 3 der 12 Urinspender (Spender Nr. 7, 11 und 12) vergleichsweise geringe endogene Konzentrationen an Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin aufweisen. Zudem sind die Konzentrationen der Analyten im synthetischen Urin unterhalb des Detektionslimits. Da sich jedoch ein für die Generierung von Qualitätskontrollen geeigneter humaner Urin identifizieren ließ, wurde der synthetische Urin nicht weiter verwendet. Für die Generierung von Qualitätskontrollen wurde folglich der Urin von Spender 7, 11 und 12 eingesetzt.

4.5.2 Qualitätskontrollen für die Validierung der multiplexen Immunoassays

Die Urinproben der Spender 7, 11 und 12 wurden wie unter Punkt 3.2.5.7 beschrieben mit den in Tabelle 14 aufgelisteten Konzentrationen an Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin, Metanephrin, Normetanephrin, 3-Methoxytyramin und Serotonin *gespikt*. Anschließend wurden die Qualitätskontrollen in den beiden multiplexen Immunoassays gemessen und die Wiederfindungsrate bestimmt. Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse für die Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin in den Qualitätskontrollen.

Tabelle 21: Wiederfindungsrate in den *gespikten* Urinproben. Die Quantifizierung der Analyten erfolgte mit Hilfe der multiplexen Immunoassays. WFR = Wiederfindungsrate

Analyt	Sollwert [ng/mL]	Spender 7 [ng/mL]	WFR [%]	Spender 11 [ng/mL]	WFR [%]	Spender 12 [ng/mL]	WFR [%]
Adrenalin	10	11,6	116	14,0	140	10,2	102
	20	24,7	123	22,9	114	23,7	119
	30	36,4	121	31,0	103	32,0	107
	100	144,5	145	113,3	113	103,1	103
	150	149,3	100	186,9	125	145,8	97
Noradrenalin	50	44,5	89	57,2	114	48,1	96
	100	91,1	91	91,2	91	96,0	96
	150	148,3	99	149,2	99	162,5	108
	500	722,1	144	609,5	122	598,2	120
	750	830,7	111	1069,4	143	805,9	107
Dopamin	100	96,5	97	140,4	140	110,0	110
	200	209,8	105	213,4	107	237,6	119
	300	311,2	104	309,1	103	387,4	129
	1000	1438,2	144	1255,2	126	1427,4	143
	1500	1600,8	107	2015,2	134	2113,8	141
Metanephrin	1,5	< LLOQ	-	< LLOQ	-	1,7	112
	15	14,7	98	26,5	177	7,4	49
	150	188,1	125	190,6	127	165,1	110
	1500	956,7	64	1740,5	116	1242,1	83
Normetanephrin	2,5	2,9	114	0,9	35	3,5	141
	25	19,6	78	32,1	128	20,7	83
	250	250,6	100	300,8	120	262,4	105
	2500	> ULOQ	-	> ULOQ	-	2144,2	86
3-Methoxytyramin	2	2,0	101	1,3	65	2,0	102
	20	16,1	81	24,7	123	15,1	76
	200	285,0	143	250,5	125	195,3	98
	2000	2342,2	117	2051,0	103	> ULOQ	-
Serotonin	2	3,5	173	1,0	50	2,9	145
	20	22,0	110	27,0	135	19,0	95
	200	246,8	123	247,8	124	216,7	108
	2000	2235,2	112	1439,4	72	1719,9	86

Tabelle 21 zeigt, dass durch Zusatz von synthetisch hergestellten Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin Validierungs- bzw. Qualitätskontrollen generiert werden konnten, deren Analytkonzentrationen über den gesamten Bereich der Standardkurve verteilt sind. Dazu wurde die jeweils endogene Konzentration der Analyten von der ermittelten Konzentration in den *gespikten* Proben abgezogen. Der Versuch zeigt, dass mit Hilfe der beiden multiplexen Immunoassays Catecholamine, Metanephrine und Serotonin in humanem Urin erfolgreich quantifiziert werden konnten. Die Wiederfindungsrate lag für die meisten Proben zwischen 75 % und 125 %, es gab jedoch einige Proben mit einer erhöhten Wiederfindungsrate von bis zu 150 %. Proben mit einer Wiederfindungsrate < 70 % waren selten, dies lag oft daran, dass hier die Konzentrationen der Analyten nahe des LLOQ lagen. Für die Validierung des Catecholamin-Assays wurden anschließend die *gespikten* Urinproben von Spender 11, für die Validierung des Metanephrin/Serotonin-Assays die *gespikten* Urinproben von Spender 12 verwendet.

4.6 Validierung der multiplexen Immunoassays

Im Anschluss an die Entwicklungsphase wurde mit Hilfe der generierten Validierungs- und Qualitätskontrollen die Validierung des multiplexen Catecholamin-Assays sowie des multiplexen Metanephrin/Serotonin-Assays durchgeführt. Die Validierung der multiplexen Immunoassays erfolgte in Anlehnung an die „*Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*“ der *US Food and Drug Administration* [126]. Dabei wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Assays sowie der sich daraus ergebende dynamische Bereich, die Intra- und Interassay-Präzision, die Wiederfindungsrate, die Verdünnungslinearität, die Selektivität sowie die Kurzzeitstabilität und die Stabilität der Analyten gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen bestimmt.

4.6.1 Ermittlung eines geeigneten Kalibrierkurvenmodells

Als Kalibrierkurvenmodell wurde für alle Analyten ein 5-parametrischer logistischer Kurvenfit mit einer Gewichtung von $1/Y$ gewählt. Eine Gewichtung wurde gewählt, da die Variabilität nicht über den gesamten Bereich der Kurve konstant war und angenommen wurde, dass die Residuen mit zunehmender Konzentration ebenfalls größer wurden. Mit einem 5-parametrischen logistischen Kalibrierkurvenmodell und einer Gewichtung von $1/Y$ konnte für alle Analyten die beste Kurvenanpassung erhalten werden. Dies wurde anhand

des erhaltenen Bestimmtheitsmaßes R^2 sowie der Wiederfindungsrate ermittelt. Die Ergebnisse für die Kurvenanpassung sind in Tabelle 22 und Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 22: Ergebnisse der Kurvenanpassung für die Catecholamine. Angegeben sind die Mittelwerte aus vier Versuchen, bei denen die Standards jeweils in Triplikaten gemessen wurden. Es wurde ein 5-parametrischer logistischer Kurvenfit mit einer Gewichtung von $1/Y$ angewendet. WFR = Wiederfindungsrate, R^2 = Bestimmtheitsmaß.

Analyt	Standard	Soll-	gemessene	% CV	WFR [%]	R^2
		konzentration [ng/mL]	Konzentration [ng/mL]			
Dopamin	A/B 1	2	2,1	4	105	0,997
	A/B	4,5	4,5	6	99	
	B	10	9,8	3	98	
	C	40	41	2	102	
	D	150	159	3	106	
	E	500	458	2	92	
	F	2000	2244	7	112	
Adrenalin	A/B 1	0,2	0,9	78	427	0,991
	A/B	0,45	0,6	27	140	
	B	1	1,0	14	104	
	C	4	4,2	9	105	
	D	15	16	12	103	
	E	50	52	5	103	
	F	200	211	7	106	
Noradrenalin	A/B 1	1	1,0	3	100	0,998
	A/B	2,25	2,3	2	102	
	B	5	5,0	2	100	
	C	20	20	2	99	
	D	75	78	3	104	
	E	250	242	2	97	
	F	1000	1053	1	105	

Tabelle 23: Ergebnisse der Kurvenanpassung für die Metanephrine und Serotonin. Angegeben sind die Mittelwerte aus vier Versuchen, bei denen die Standards jeweils in Triplikaten gemessen wurden. Es wurde ein 5-parametrischer logistischer Kurvenfit mit einer Gewichtung von $1/Y$ angewendet. WFR = Wiederfindungsrate, R^2 = Bestimmtheitsmaß.

Analyt	Standard	Soll- konzentration [ng/mL]	gemessene Konzentration [ng/mL]	% CV	WFR [%]	R^2
Metanephrin	A/B 1	1,5	1,6	24	111	0,995
	A/B	4,9	5,1	1	105	
	B	16	16	2	99	
	C	54	54	3	101	
	D	180	182	3	101	
	E	600	596	4	99	
	F	2000	2080	4	104	
Normetanephrin	A/B 1	2,2	2,2	2	101	0,999
	A/B	7,3	7,3	2	100	
	B	24	24	2	101	
	C	81	81	3	100	
	D	270	274	3	101	
	E	900	900	5	100	
	F	3000	3120	3	104	
3-Methoxytyramin	A/B 1	1,8	1,9	0	101	0,998
	A/B	6,1	5,9	0	97	
	B	20	21	4	103	
	C	68	70	6	103	
	D	225	214	5	95	
	E	750	772	3	103	
	F	2500	2576	3	103	
Serotonin	A/B 1	1,8	1,8	5	97	0,999
	A/B	6,1	6,1	2	101	
	B	20	20	2	100	
	C	68	68	3	101	
	D	225	230	1	102	
	E	750	735	2	98	
	F	2500	2577	2	103	

Tabelle 22 und Tabelle 23 zeigen, dass für alle Analyten das 5-parametrische logistische Kurvenanpassungsmodell mit einer Gewichtung von $1/Y$ eine sehr gute Kurvenanpassung liefert. Die Werte für die Wiederfindungsrate liegen für alle Analyten außer Adrenalin über den gesamten Bereich der Standardkurve im Bereich zwischen 80 % und 120 %. Bei

Adrenalin ergibt die Kurvenanpassung für die Standards A/B 1 und A/B schlechte Werte sowohl für die Wiederfindungsrate als auch für den Variationskoeffizienten, allerdings liegen diese Standards bereits unterhalb des LOD des Adrenalin Assays (siehe Tabelle 24). Dies ist auch der Fall für den Metanephrin Standard A/B 1, auch hier ist der CV > 20 %. Für alle anderen Analyten beträgt der CV über den gesamten Bereich der Standardkurve weniger als 10 %. Für das Bestimmtheitsmaß R^2 gilt in allen Fällen > 0,99.

4.6.2 Ermittlung der unteren Nachweisgrenze (Limit of detection)

Für die Bestimmung der unteren Nachweisgrenze (LOD) wurde der Standard A (Konzentration = 0 ng/mL) in einem Experiment 20-mal hintereinander gemessen und der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten sowie die Standardabweichung berechnet. Die untere Nachweisgrenze ergibt sich dann aus folgender Formel:

$$\text{LOD [MFI]} = \text{Mittelwert}_{\text{Standard A}} + 3 \times \text{SD}_{\text{Standard A}}$$

Für diesen Wert wurde dann mit Hilfe des 5-parametrisch logistischen Kurvenfits der LOD in ng/mL berechnet.

Tabelle 24 zeigt die Ergebnisse für die Ermittlung des LOD für den multiplexen Catecholamin- und Metanephrin/Serotonin-Assay.

Tabelle 24: Untere Nachweisgrenze (LOD) für die Catecholamine, Metanephriene und Serotonin im multiplexen Immunoassay.

Analyt	Mittelwert Standard A [MFI]	SD Standard A [MFI]	Mittelwert + 3x SD [MFI]	Mittelwert + 3x SD [ng/mL]	LOD [ng/mL]
Dopamin	433	45	566	2,15	2,2
Adrenalin	55	22	122	1,64	1,6
Noradrenalin	65	17	118	0,84	0,8
Metanephrin	90	9	117	3,48	3,5
Normetanephrin	240	22	307	2,32	2,3
3-Methoxytyramin	296	32	393	0,89	0,9
Serotonin	110	10	141	1,60	1,6

4.6.3 Ermittlung der unteren Bestimmungsgrenze (Lower limit of quantification)

Die untere Bestimmungsgrenze (LLOQ) ist die kleinste quantitativ erfassbare Konzentration des Analyten und definiert als derjenige Punkt, an welchem der Variationskoeffizient (CV) für die Probe noch $< 30\%$ ist und die Wiederfindungsrate innerhalb des Bereichs von $75 - 125\%$ liegt. Für die Bestimmung des LLOQ wurde ausgehend von Standard D eine Verdünnungsreihe angefertigt, bei welcher der Standard D 8-mal 1:2 verdünnt und im Assay gemessen wurde.

Tabelle 25 zeigt die Ergebnisse für die Ermittlung des LLOQ für den multiplexen Catecholamin- und Metanephrin/Serotonin-Assay.

Tabelle 25: Untere Bestimmungsgrenze (LLOQ) für die Catecholamine, Metanephriene und Serotonin im multiplexen Immunoassay. Der LLOQ wurde in 3 Experimenten bestimmt, dabei wurde der Standard D 8-mal 1:2 verdünnt und jede Verdünnung in Triplikaten im Assay gemessen. Der angegebene Variationskoeffizient bezieht sich dabei auf die Messung der Triplikate für die entsprechende Verdünnung.

Analyt	Versuch Nr.	LLOQ [ng/mL]	CV [%]	WFR [%]	LLOQ [ng/mL]
Dopamin	1	2,34	4	92	2,3
	2	2,34	28	116	
	3	2,34	44 (11*)	93	
Adrenalin	1	0,47	3	85	1,9
	2	1,88	9	92	
	3	1,88	14	86	
Noradrenalin	1	1,17	19	112	2,3
	2	2,34	12	83	
	3	2,34	26	79	
Metanephrin	1	5,63	22	81	11,3
	2	11,25	10	101	
	3	11,25	7	75	
Normetanephrin	1	8,44	7	83	8,4
	2	4,22	5	82	
	3	8,44	12	74	
3-Methoxytyramin	1	0,88	18	93	1,8
	2	0,88	3	99	
	3	1,76	7	83	
Serotonin	1	7,03	2	86	7,0
	2	7,03	7	86	
	3	3,52	5	78	

*bei Versuch 3 beträgt der Variationskoeffizient für den LLOQ bei Dopamin 11 % bezogen auf die Fluoreszenzintensitäten. Aufgrund einer ungünstigen Kurvenanpassung erhöht sich hier der CV auf 44 % für die zurückgerechneten Konzentrationen. Da bei Versuch 1 und 2 der LLOQ für Dopamin auch bei 2,34 ng/mL liegt, wird dieser Wert als LLOQ definiert, da hier gute Kurvenanpassungen vorliegen und der Wert als vertrauenswürdig angesehen werden kann.

4.6.4 Ermittlung der oberen Bestimmungsgrenze (Upper limit of quantification)

Die obere Bestimmungsgrenze (ULOQ) ist die maximale Konzentration eines Analyten, die noch mit ausreichender Präzision und Richtigkeit bestimmt werden kann. Für die Bestimmung des ULOQ wurden zwei zusätzliche Standards, F1 und F2, hergestellt, die oberhalb des obersten Standards F lagen. Als ULOQ wurde diejenige Konzentration bestimmt, bei welcher der CV < 20 % war und die Wiederfindungsrate zwischen 80-120 %

lag. Tabelle 26 zeigt die Ergebnisse für die Ermittlung des ULOQ für den multiplexen Catecholamin- und Metanephrin/Serotonin-Assay.

Tabelle 26: Obere Bestimmungsgrenze (ULOQ) für die Catecholamine, Metanephriene und Serotonin im multiplexen Immunoassay.

Analyt	Standard	Sollwert [ng/mL]	Konzentration [ng/mL]	CV [%]	WFR [%]	ULOQ [ng/mL]
Dopamin	E	500	450	14	90	500
	F	2000	1980	36	99	
	F1	4000	3718	26	93	
	F2	8000	11213	23	140	
Adrenalin	E	50	53	13	106	50
	F	200	174	31	87	
	F1	400	502	57	126	
	F2	800	980	38	122	
Noradrenalin	E	250	249	5	100	4000
	F	1000	913	20	91	
	F1	2000	2101	19	105	
	F2	4000	4569	19	114	
Metanephrin	E	600	555	7	92	2000
	F	2000	2278	4	114	
	F1	4000	5428	55	136	
	F2	8000	7123	37	89	
Normetanephrin	E	900	898	12	100	3000
	F	3000	3091	10	103	
	F1	6000	5374	24	90	
	F2	12000	17948	69	150	
3-Methoxytyramin	E	750	679	10	91	750
	F	2500	3230	15	129	
	F1	5000	5495	44	110	
	F2	10000	9028	26	90	
Serotonin	E	750	744	13	99	10000
	F	2500	2672	9	107	
	F1	5000	4444	8	89	
	F2	10000	11121	13	111	

Wie in Tabelle 26 zu sehen ist, ist der ULOQ für Noradrenalin, Metanephrin, Normetanephrin und Serotonin gleich dem höchsten Standard F, bei Noradrenalin und Serotonin erfüllen sogar die zusätzlichen Standards F1 und F2 die Anforderungskriterien. Für Dopamin, Adrenalin und 3-Methoxytyramin hingegen zeigten sich bei der

Durchführung der Validierungsversuche schon bei Standard F Variationskoeffizienten von > 30 % bzw. eine Wiederfindungsrate > 120 %. Diese hohen % CV-Werte bzw. Wiederfindungsraten stellen allerdings eine Ausnahme dar, die nur im Rahmen dieses Validierungsversuches auftrat. Generell konnten auch für diese drei Analyten die Anforderungskriterien bei Standard F erfüllt werden. Dies ist in Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27: Obere Bestimmungsgrenze (ULOQ) für den Dopamin-, Adrenalin- und 3-Methoxytyramin-Assay. Da im eigentlichen Versuch zur Bestimmung des ULOQ der Variationskoeffizient bzw. die Wiederfindungsrate von Standard F im Dopamin-, Adrenalin- und 3-Methoxytyramin-Assay sehr hoch war, wurde anhand von drei weiteren Versuchen, bei welchen die Standards jeweils in Triplikaten gemessen wurden, gezeigt, dass auch bei diesen Analyten der Standard F die Kriterien für den ULOQ erfüllt. Angegeben ist jeweils der Mittelwert aus 9 Messwerten, der CV bezieht sich ebenfalls auf alle 9 Messwerte. WFR = Wiederfindungsrate.

Analyt	Standard	Sollwert [ng/mL]	Konzentration [ng/mL]	CV [%]	WFR [%]	ULOQ [ng/mL]
Dopamin	E	500	462	19	92	2000
	F	2000	2163	10	108	
Adrenalin	E	50	52	26	104	200
	F	200	206	15	103	
3-Methoxytyramin	E	750	780	7	104	2500
	F	2500	2546	19	102	

Somit konnte gezeigt werden, dass für alle Analyten der Standard F die Anforderungskriterien für den ULOQ erfüllt. Für Adrenalin Standard E ist der CV mit 26 % zwar etwas zu hoch, hier wurde aber in Tabelle 26 gezeigt, dass der Standard E auch niedrigere Variationskoeffizienten aufweisen kann. Daher kann für alle Analyten der oberste Standard F als ULOQ definiert werden.

4.6.5 Dynamischer Bereich

Der dynamische Bereich eines Assays ist der Bereich zwischen der niedrigsten und höchsten Konzentration eines Analyten, für welchen die geforderte Präzision und Richtigkeit bewiesen wurde. Hier wurde der dynamische Bereich als der Bereich zwischen LLOQ und ULOQ definiert. Tabelle 28 zeigt den dynamischen Bereich für die einzelnen Analyten im Catecholamin- und Metanephrin/Serotonin-Assay.

Tabelle 28: Dynamischer Bereich für die einzelnen Analyten im multiplexen Immunoassay.

Analyt	Dopamin	Adrenalin	Noradrenalin	MN	NMN	3-MT	Serotonin
LLOQ [ng/mL]	2,3	1,9	2,3	11,3	8,4	1,8	7,0
ULOQ [ng/mL]	2000	200	4000	2000	3000	2500	10000

4.6.6 Ermittlung der Intra- und Interassay Präzision sowie der Wiederfindungsrate

Für die Bestimmung der Intraassay-Präzision wurde eine *gespikte* Urinprobe mit einer mittleren Konzentration der Analyten in drei Experimenten zwischen 12- und 20-mal innerhalb eines Assays gemessen. Für die Bestimmung der Interassay-Präzision wurden ebenfalls *gespikte* Urinproben verwendet. Es wurden zwei Urinproben mit niedrigen, zwei mit mittleren und ein oder zwei Urinproben mit hohen Konzentrationen der Analyten in vier Experimenten, jeweils in Triplikaten gemessen. Die Intraassay-Präzision sollte einen Variationskoeffizienten $< 15\%$ aufweisen. Die Interassay-Präzision sollte für jede Konzentration einen Variationskoeffizienten $< 20\%$ aufweisen, für niedrige Konzentrationen wird auch ein CV $< 30\%$ akzeptiert. Die Wiederfindungsrate sollte dabei zwischen 80% und 120% liegen. Tabelle 29 und Tabelle 30 zeigen die Ergebnisse für die Bestimmung der Intra- und Interassay-Präzision sowie der Wiederfindungsrate für den multiplexen Catecholamin- bzw. Metanephrin/Serotonin-Assay. Werte, die unterhalb des LLOQ bzw. oberhalb des ULOQ lagen wurden nicht in die Berechnung miteinbezogen.

Tabelle 29: Intraassay-Präzision im multiplexen Immunoassay. Für die Bestimmung der Intraassay-Präzision wurde eine *gespikte* Urinprobe mit einer mittleren Konzentration der Analyten in drei Experimenten zwischen 12- und 20-mal innerhalb eines Assays gemessen. WFR = Wiederfindungsrate.

Analyt	Intraassay-Präzision	Intraassay-Präzision	WFR
	Fluoreszenz- intensitäten	zurückgerechnete Konzentrationen	
	[%]	[%]	[%]
Dopamin	3-10	8-29	83-115
Adrenalin	8-15	15-29	81-106
Noradrenalin	3-12	6-24	66-89
Metanephrin	7-10	15-28	73-96
Normetanephrin	4-8	6-14	80-89
3-Methoxytyramin	4-5	11-13	88-93
Serotonin	5-11	7-15	81-107

Tabelle 30: Interassay-Präzision im multiplexen Immunoassay. Für die Bestimmung der Interassay-Präzision wurden *gespikte* Urinproben verwendet. Es wurden zwei Urinproben mit niedrigen, zwei mit mittleren und ein oder zwei Urinproben mit hohen Konzentrationen der Analyten in vier Experimenten jeweils in Triplikaten gemessen. WFR = Wiederfindungsrate.

Analyt	Interassay-Präzision	Interassay-Präzision	WFR
	Fluoreszenz-intensitäten	berechnete Konzentrationen	
	[%]	[%]	[%]
Dopamin	2-3	2-11	96-114
Adrenalin	4-27	9-34	95-119
Noradrenalin	2-12	2-12	79-86
Metanephrin	8-27	9-18	86-98
Normetanephrin	8-9	4-14	82-95
3-Methoxytyramin	7-10	2-16	75-95
Serotonin	8-18	3-21	94-102

Tabelle 29 zeigt, dass die Intraassay-Präzision für die Fluoreszenzeinheiten bei allen Analyten < 15 % ist, jedoch ist die Intraassay-Präzision für die zurückgerechneten Konzentrationen nur bei Normetanephrin, 3-Methoxytyramin und Serotonin ebenfalls < 15 %. Für die Catecholamine ist die Intraassay-Präzision für die zurückgerechneten Konzentrationen bei einem der drei Versuche sehr hoch gewesen (24-29 %), für die anderen beiden Versuche lag sie unterhalb von 16 %. Die Wiederfindungsrate lag für alle Analyten bis auf Noradrenalin und Metanephrin im Bereich zwischen 80-120 %, für Noradrenalin und Metanephrin war die Wiederfindungsrate bei zwei bzw. einem der Versuche zu niedrig.

Tabelle 30 zeigt, dass die Assays für Dopamin, Metanephrin, Normetanephrin und Serotonin die Anforderung von < 20 % bzw. < 30 % für niedrige Konzentrationen für die Interassay-Präzision erfüllen und dabei eine Wiederfindungsrate zwischen 80 % und 120 % aufweisen. Bei Adrenalin werden die Kriterien ebenfalls nahezu erfüllt, hier betrug jedoch der CV für eine der Proben, die im Bereich des LLOQ lag, 34 %. Ebenso erfüllt der Noradrenalin-Assay die Kriterien bis auf eine etwas zu niedrige Wiederfindungsrate bei geringen Noradrenalin-Konzentrationen. Dasselbe gilt für 3-Methoxytyramin.

4.6.7 Bestimmung der Verdünnungslinearität

Die Verdünnungslinearität gibt an, ob bzw. inwiefern man in einer Probe, in welcher die Konzentration des zu bestimmenden Analyten oberhalb des ULOQ liegt, die Analytkonzentration durch Verdünnen in den dynamischen Bereich des Assays bringen kann und ob diese über einen weiten Bereich von Verdünnungen linear verläuft. Dabei sollte die Linearität der zurückgerechneten Werte für die Konzentration des Analyten gegeben sein. Tabelle 31 und Tabelle 32 zeigen die Ergebnisse für die Bestimmung der Verdünnungslinearität.

Tabelle 31: Verdünnungslinearität der einzelnen Analyten im multiplexen Catecholamin-Assay.

Analyt (Sollwert)	Verdünnungs- faktor	ermittelte Konzentration [ng/mL]	ermittelte Konzentration x Verdünnungsfaktor [ng/mL]	WFR* [%]
Dopamin (2000 ng/mL)	1	1943,5	1944	100
	50	34,8	1738	89
	100	18,3	1826	94
	200	9,4	1871	96
	400	4,0	1581	81
Adrenalin (200 ng/mL)	1	> ULOQ	> ULOQ	-
	50	3,6	180,5	90
	100	2,2	223,3	112
	200	0,8	166,0	83
	400	0,6	250,0	125
Noradrenalin (1000 ng/mL)	1	790,7	790,7	100
	50	14,8	739,5	95
	100	7,5	750,3	95
	200	4,0	795,3	101
	400	1,9	772,0	98

* Die Wiederfindungsrate bezieht sich auf die Konzentration, die in der unverdünnten Urinprobe gemessen wurde. Ist die Konzentration für die unverdünnte Urinprobe > ULOQ wurde die Wiederfindungsrate auf den Sollwert bezogen.

Tabelle 31 zeigt, dass für Dopamin und Noradrenalin die Verdünnungslinearität bis zu einem Verdünnungsfaktor von 400 gegeben ist. Allerdings ist die Verdünnungslinearität bei Adrenalin nur bis zu einem Faktor von 200 gegeben und da es sich um einen multiplexen Assay handelt, ist demnach der maximale Verdünnungsfaktor für alle drei Analyten 200.

Tabelle 32: Verdünnungslinearität der einzelnen Analyten im multiplexen Metanephrin/Serotonin-Assay.

Analyt (Sollwert)	Verdünnungs- faktor	ermittelte Konzentration [ng/mL]	ermittelte Konzentration x Verdünnungsfaktor [ng/mL]	WFR* [%]
Metanephrin (1500 ng/mL)	1	1207,3	1207,3	100
	10	142,2	1422,0	118
	20	72,1	1442,6	119
	40	31,7	1266,9	105
	80	14,5	1159,2	96
	160	7,1	1128,5	93
	320	2,6	845,9	70
Normetanephrin (2500 ng/mL)	1	2274,7	2274,7	100
	10	246,2	2461,9	108
	20	130,2	2604,7	115
	40	61,0	2441,2	107
	80	30,4	2430,4	107
	160	14,2	2268,3	100
	320	6,5	2092,8	92
3-Methoxytyramin (2000 ng/mL)	1	2103,3	2103,3	100
	10	197,2	1971,9	94
	20	112,3	2245,4	107
	40	50,2	2007,2	95
	80	28,3	2265,9	108
	160	11,3	1800,5	86
	320	4,9	1575,5	75
Serotonin (2000 ng/mL)	1	1996,7	1996,7	100
	10	200,2	2002,0	100
	20	108,3	2165,4	108
	40	50,5	2018,3	101
	80	28,1	2251,2	113
	160	12,1	1929,6	97
	320	5,8	1843,2	92

* Die Wiederfindungsrate bezieht sich auf die Konzentration, die in der unverdünnten Urinprobe gemessen wurde.

Wie in Tabelle 32 zu sehen ist, ist die Verdünnungslinearität für alle Analyten bis zu einer Verdünnung von 1:160 gegeben, jedoch kann man hier schon eine Reduktion der Wiederfindungsrate beobachten. Da dies bis zu einem Verdünnungsfaktor von 80 noch

nicht der Fall ist, können Urinproben für den multiplexen Metanephrin/Serotonin-Assay bis zu 1:80 verdünnt werden.

4.6.8 Ermittlung der Selektivität

Um die Selektivität der Assays zu bestimmen und Kreuzreaktivitäten in den multiplexen Immunoassays und damit eine Verfälschung der Messwerte auszuschließen, wurde die Kreuzreaktivität der Antikörper zu strukturell ähnlichen Substanzen sowie zu den Catecholaminen, Metanephrinen und zu Serotonin im Assay ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 zusammengefasst.

Tabelle 33: Kreuzreaktivität der Antikörper in % zu strukturell ähnlichen Substanzen.

Substanz	c [mg/mL]	α -3-MT AK Nr. 3	α -MN AK Nr. 7	α -NMN AK Nr. 8	α -SERO AK Nr. 10
Multiplexer Catecholamin-Assay					
Dopamin	0,002	100	0,09	0,03	-
Adrenalin	0,0002	0,99	100	10,23	-
Noradrenalin	0,001	0,81	0,46	100	-
Metanephrin	10	< 0,0001	0,001	0,0002	-
Normetanephrin	10	0,0001	0,0001	0,002	-
3-Methoxytyramin	10	0,002	< 0,0001	0,0001	-
MOPEG	10	0,0001	< 0,0001	0,0001	-
Tyramin	10	0,001	0,0001	0,0001	-
Phenylalanin	10	< 0,0001	< 0,0001	0,0002	-
Kaffeesäure	10	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	-
L-DOPA	10	0,001	0,0004	0,0001	-
Homovanillinsäure	10	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	-
Tyrosin	10	< 0,0001	< 0,0001	0,0001	-
3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure	10	< 0,0001	< 0,0001	0,0001	-
Multiplexer Metanephrin/Serotonin-Assay					
3-Methoxytyramin	0,0025	100	0,02	0,0008	0,13
Metanephrin	0,002	0,14	100	1,6	0,16
Normetanephrin	0,003	0,16	0,07	100	0,11
Serotonin	0,0025	0,11	0,02	< 0,0001	100
Adrenalin	1	0,0003	< 0,0001	0,0001	0,0003
Noradrenalin	1	0,0005	0,002	0,001	0,001
Dopamin	1	0,004	0,006	0,009	0,005
Tryptamin	10	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Melatonin	10	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,003
5-HIAA	10	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Phenylalanin	10	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Histidin	10	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Tyramin	10	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
5-Hydroxytryptophan	10	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,001

Wie in Tabelle 33 zu sehen ist, sind der α -3-Methoxytyramin-Antikörper Nr. 3, der α -Metanephrin-Antikörper Nr. 7 und der α -Serotonin-Antikörper Nr. 10 sehr spezifisch für ihr Antigen. Die Kreuzreaktivität zu den anderen, im multiplexen Assay enthaltenen Analyten liegt unterhalb 1 %, die Kreuzreaktivität zu den anderen Substanzen, die nicht im Multiplex enthalten sind, sogar unterhalb von 0,01 %. Eine Ausnahme stellt hier der α -Normetanephrin-Antikörper Nr. 8 dar. Dieser zeigt eine sehr hohe Kreuzreaktivität von 10 % zu Adrenalin und eine erhöhte Kreuzreaktivität von 1,6 % zu Metanephrin. Die Kreuzreaktivität zu allen anderen Substanzen dagegen liegt unterhalb von 0,1 %. Allerdings konnte in weiteren Versuchen gezeigt werden, dass diese Kreuzreaktivität von der Charge der Antikörperaufreinigung abhängig ist. Bei einer anderen Charge, bei welcher der α -Normetanephrin-Antikörper Nr. 8 ebenfalls mit derselben Strategie aufgereinigt wurde, lag die Kreuzreaktivität zu Adrenalin bei 0,14 % (siehe Anhang Tabelle 46). Für diesen Antikörper bestehen also im Hinblick auf die Kreuzreaktivität zu Adrenalin große Chargen-abhängige Unterschiede.

4.6.9 Robustheit: Kurzzeitstabilität und Stabilität gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen

In diesen Versuchen wurde die Robustheit der Assays bzw. die Analytstabilität in Bezug auf die Lagerungstemperatur sowie –zeit und die Anzahl der Einfrier- und Auftauzyklen für die Validierungs- bzw. Qualitätskontrollen bestimmt. Für die Kurzzeitstabilität wurde ermittelt, wie sich die Wiederfindungsrate verändert, wenn die Urinproben für 2 h, 4 h oder 24 h bei RT oder 4 °C gelagert werden. Des Weiteren wurde getestet, inwiefern sich drei Einfrier- und Auftauzyklen auf die Wiederfindungsrate in den Proben auswirken.

Tabelle 34 und Tabelle 35 zeigen die Ergebnisse für die Versuche zur Ermittlung der Robustheit und Stabilität der Analyten.

Tabelle 34: Ermittlung der Kurzzeitstabilität und der Stabilität gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen für die Catecholamine im multiplexen Immunoassay.

Analyt (Sollwert)	Kurzzeitstabilität					Stabilität gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen		
	Zeit	Raumtemperatur		4 °C		Zyklus- zahl	Lagerung: -20 °C Auftauen bei RT [▲]	
		c [ng/mL]	WFR* [%]	c [ng/mL]	WFR* [%]		c [ng/mL]	WFR* [%]
Dopamin (200 ng/mL)	0 h	205,4	100	205,4	100	0	188,8	100
	2 h	226,8	110	225,5	110	1	208,6	110
	4 h	213,1	104	219,6	107	2	186,7	99
	24 h	249,7	122	230,9	112	3	181,7	96
Adrenalin (20 ng/mL)	0 h	22,6	100	22,6	100	0	16,4	100
	2 h	27,8	123	23,3	103	1	15,8	96
	4 h	26,4	117	22,3	98	2	21,3	130
	24 h	29,8	132	28,4	126	3	19,4	118
Noradrenalin (100 ng/mL)	0 h	86,2	100	86,2	100	0	75,6	100
	2 h	91,3	106	93,3	108	1	83,0	110
	4 h	93,8	109	88,4	103	2	78,0	103
	24 h	104,4	121	91,0	106	3	73,9	98

* Die Wiederfindungsrate bezieht sich auf die Konzentration, die in der frisch aufgetauten Urinprobe (0 h bzw. 0 Zyklen) gemessen wurde.

▲Die frisch aufgetaute Urinprobe (0 Zyklen) wurde zuerst bei 4 °C aufgetaut und anschließend bis zum vollständigen Auftauen bei RT gelagert.

Für Dopamin konnte gezeigt werden, dass eine Lagerung für 4 h bei RT und für 24 h bei 4 °C ohne eine wesentliche Veränderung der Wiederfindungsrate möglich ist. Für die Lagerung bei RT für 24 h kann ein leichter Anstieg der Wiederfindungsrate beobachtet werden, sodass diese nicht mehr im Bereich 80-120 % liegt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Dopamin gegenüber drei Einfrier- und Auftauzyklen stabil ist. Adrenalin kann für 4 h bei RT und 4 °C gelagert werden, jedoch nicht für 24 h, da hier bei beiden Temperaturen die Wiederfindungsrate auf über 120 % steigt. Auch Adrenalin ist gegenüber drei Einfrier- und Auftauzyklen stabil, hier sind jedoch die gemessenen Konzentrationen für die frisch aufgetaute Probe und für die Probe mit einem Zyklus etwas zu niedrig, was zu den erhöhten Werten für die Wiederfindungsrate nach 2 und 3 Zyklen führt. Noradrenalin zeigte sich als sehr stabiler Analyt, es kann für 24 h bei RT und 4 °C gelagert werden und ist gegenüber drei Einfrier- und Auftauzyklen stabil.

Tabelle 35: Ermittlung der Kurzzeitstabilität und der Stabilität gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen für die Metanephrine und Serotonin im multiplexen Immunoassay.

Analyt (Sollwert)	Kurzzeitstabilität					Stabilität gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen		
	Zeit	Raumtemperatur		4 °C		Zyklus- zahl	Lagerung: -20 °C Auftauen bei RT [▲]	
		c [ng/mL]	WFR* [%]	c [ng/mL]	WFR* [%]		c [ng/mL]	WFR* [%]
Metanephrin (15 ng/mL)	0 h	9,9	100	9,9	100	0	11,7	100
	2 h	11,1	112	11,6	117	1	7,7	66
	4 h	13,3	134	12,1	122	2	11,2	95
	24 h	14,1	142	11,9	120	3	10,7	92
Normeta- nephrin (25 ng/mL)	0 h	19,9	100	19,9	100	0	16,3	100
	2 h	20,5	103	20,6	104	1	14,8	91
	4 h	21,8	110	20,9	105	2	16,7	103
	24 h	22,0	111	20,4	103	3	15,7	97
3-Methoxy- tyramin (20 ng/mL)	0 h	16,7	100	16,7	100	0	15,6	100
	2 h	17,4	105	18,5	111	1	13,7	87
	4 h	19,4	116	18,9	113	2	15,5	99
	24 h	21,1	127	18,6	112	3	16,3	104
Serotonin (20 ng/mL)	0 h	24,7	100	24,7	100	0	16,6	100
	2 h	22,3	90	23,7	96	1	13,5	82
	4 h	25,7	104	24,9	101	2	15,0	91
	24 h	24,1	97	24,0	97	3	15,1	91

* Die Wiederfindungsrate bezieht sich auf die Konzentration, die in der frisch aufgetauten Urinprobe (0 h bzw. 0 Zyklen) gemessen wurde.

▲Die frisch aufgetaute Urinprobe (0 Zyklen) wurde zuerst bei 4 °C aufgetaut und anschließend bis zum vollständigen Auftauen bei RT gelagert.

Für Metanephrin konnte gezeigt werden, dass eine Lagerung für 24 h bei 4 °C sowie eine Lagerung für 2 h bei RT ohne starke Veränderung der Wiederfindungsrate möglich ist. Bei einer Lagerzeit von 4 h oder länger bei RT steigt die Wiederfindungsrate stark an. Metanephrin ist gegenüber drei Einfrier- und Auftauzyklen stabil, der niedrige Wert für die Probe nach einem Zyklus wird als Ausreißer gewertet. Jedoch ist allgemein die Wiederfindungsrate in den Proben sehr niedrig, die gemessenen Konzentrationen liegen deutlich unterhalb des Sollwertes. Normetanephrin kann bei 4 °C und RT für 24 h gelagert werden und ist auch gegenüber drei Einfrier- und Auftauzyklen stabil, jedoch ist auch hier die Wiederfindungsrate allgemein zu niedrig, die gemessenen Konzentrationen weichen zum Teil sehr stark vom Sollwert ab. 3-Methoxytyramin kann bei 4 °C für 24 h gelagert werden, bei RT dagegen nur 4 h, nach 24 h ist die Wiederfindungsrate deutlich höher.

Auch gegenüber drei Einfrier- und Auftauzyklen ist 3-Methoxytyramin stabil. Wie für die anderen Analyten kann allerdings auch hier eine allgemein zu niedrige Wiederfindungsrate festgestellt werden. Serotonin zeigte sich als sehr stabiler Analyt, der für 24 h bei 4 °C und RT gelagert werden kann und gegenüber drei Einfrier- und Auftauzyklen stabil ist. Die Wiederfindungsrate ist hier nur bei dem Versuch zur Einfrier- und Auftaustabilität allgemein zu niedrig, beim Versuch zur Kurzzeitstabilität liegen die gemessenen Konzentrationen sogar etwas über dem Sollwert.

4.7 Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin aus *Dry Urine Test*-Filterkarten

Das Sammeln von Urinproben mit Hilfe von *Dry Urine Test*-Filterkarten stellt eine einfache Alternative zu Urinsammelröhrchen dar, welche die Lagerung und den Versand der Proben vereinfacht und auch von ungeschultem Personal durchgeführt werden kann. Im Gegensatz zu konventionellen Urinsammelröhrchen müssen die Proben nicht gekühlt oder in gefrorenem Zustand verschickt werden, was eine fehlerhafte Bestimmung der Catecholamine, Metanephrine und Serotonin durch falsche Lagerung oder Transporttemperatur vermeidet. Es wurde ermittelt, ob für die Bestimmung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin in humanem Urin mit Hilfe der multiplexen Immunoassays dieselben Ergebnisse erhalten werden, wenn die Urinproben mit Urinsammelröhrchen oder mit den *Dry Urine Test*-Filterkarten gesammelt wurden. Zum Vergleich wurde ebenfalls eine frische Urinprobe gemessen, um den Effekt des Einfrierens bzw. der Trocknung für 24 h bei RT bei den Filterkarten zu ermitteln. Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in Tabelle 36 und Abbildung 28 dargestellt.

Tabelle 36: Wiederfindungsrate in % für die Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin aus *Dry Urine Test*-Filterkarten. Die gemessenen Konzentrationen wurden aufgrund der Verdünnung bei der Elution mit dem Faktor 3 multipliziert, die jeweiligen Sollkonzentrationen können aus Abbildung 28 entnommen werden.

Analyt	Urinprobe 1		Urinprobe 2	
	Istwert [ng/mL]	Wiederfindungsrate [%]	Istwert [ng/mL]	Wiederfindungsrate [%]
Dopamin	135,7	136	399,5	133
Adrenalin	9,8	98	26,8	89
Noradrenalin	50,2	100	174,4	116
Metanephrin	95,8	120	263,6	119
Normetanephrin	119,5	100	375,2	113
3-Methoxytyramin	112,0	112	291,4	105
Serotonin	122,3	122	227,7	82

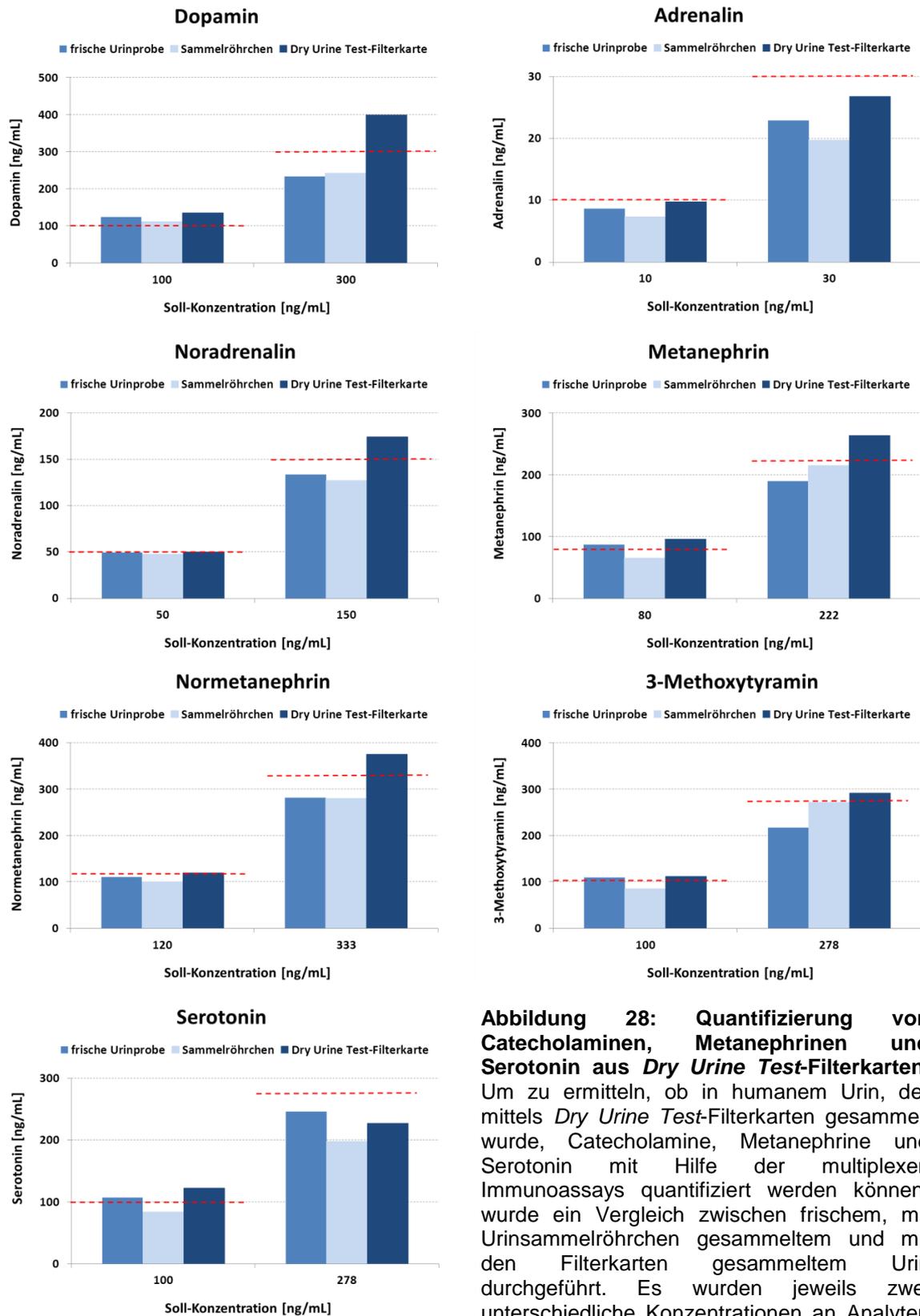


Abbildung 28: Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin aus *Dry Urine Test-Filterkarten*. Um zu ermitteln, ob in humanem Urin, der mittels *Dry Urine Test-Filterkarten* gesammelt wurde, Catecholamine, Metanephrine und Serotonin mit Hilfe der multiplexen Immunoassays quantifiziert werden können, wurde ein Vergleich zwischen frischem, mit Urinsammelröhrchen gesammeltem und mit den Filterkarten gesammeltem Urin durchgeführt. Es wurden jeweils zwei unterschiedliche Konzentrationen an Analyten einer Urinprobe zugesetzt und diese mit Hilfe der zwei unterschiedlichen Sammelmethode vorbereitet und anschließend im multiplexen Assay gemessen. Die gestrichelten roten Linien zeigen die Soll-Konzentrationen an.

In Tabelle 36 ist zu sehen, dass die Wiederfindungsrate für alle Analyten bis auf Dopamin sehr gut ist und im Bereich zwischen 80 % und 120 % liegt. Bei Dopamin ist die Wiederfindungsrate mit 133 % bzw. 136 % leicht erhöht. Daher eignen sich die *Dry Urine Test*-Filterkarten sehr gut für das Sammeln von Urinproben für die Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin in den multiplexen Immunoassays. Abbildung 28 zeigt den Vergleich zwischen frischem Urin, mit Urinsammelröhrchen gesammeltem Urin und mit *Dry Urine Test*-Filterkarten gesammeltem Urin. Dabei ist die Wiederfindungsrate allgemein bei allen Sammelmethoden gut, weder das Einfrieren bei den Urinsammelröhrchen noch das Trocknen der Filterkarten für 24 h bei RT reduziert oder erhöht die Wiederfindungsrate zu stark. Allerdings ist bei Adrenalin die Wiederfindungsrate für Urinprobe 2 bei frischem Urin sowie dem Urin aus den Sammelröhrchen etwas zu niedrig, ebenso bei Serotonin.

4.8 Vergleich der multiplexen Immunoassays mit den gängigen Methoden zur Quantifizierung von Catecholaminen und Metanephrinen im Urin

Um zu überprüfen, ob die neu entwickelten nicht-kompetitiven, multiplexen Immunoassays für Catecholamine, Metanephrine und Serotonin vergleichbare Ergebnisse liefern wie die gängigen Methoden zur Quantifizierung von Catecholaminen und Metanephrinen in humanem Urin, wurde ein Vergleich zwischen den multiplexen Immunoassays und den kompetitiven ELISAs der Firma LDN durchgeführt. Dazu wurden zunächst *gespikte* Urinproben sowie zwei Kontrollen aus dem 3-CAT ELISA Fast Track, dem 2-MET Urine ELISA Fast Track und dem Serotonin-ELISA Fast Track verwendet, die parallel im multiplexen Immunoassay und im ELISA gemessen wurden. Aufgrund der unterschiedlichen Acylierungsreagenzien im multiplexen Assay (NHS-PEG₁₂-Biotin) und im ELISA (NHS-Biotin) musste die Probenvorbereitung für beide Formate getrennt erfolgen. Das Ergebnis dieses Vergleichs ist in Abbildung 29 dargestellt.

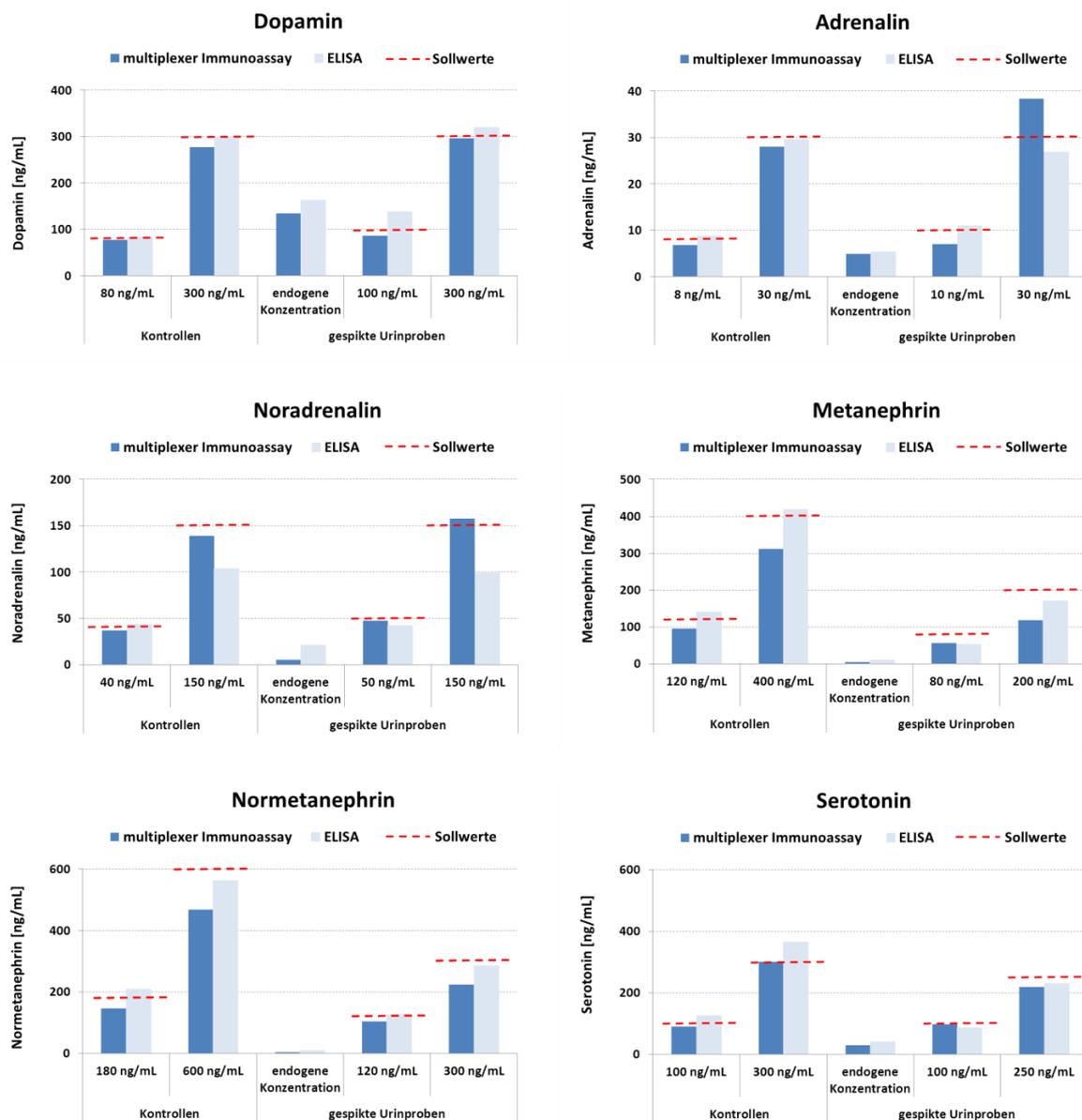


Abbildung 29: Vergleich zwischen den multiplexen Immunoassays und kommerziell erhältlichen ELISAs der Firma LDN. Für den Vergleich zwischen dem multiplexen Catecholamin-Assay und dem LDN 3-CAT ELISA bzw. zwischen dem multiplexen Metanephrin/Serotonin-Assay und dem LDN 2-MET Urine ELISA und Serotonin-ELISA wurden *gespikte* Urinproben sowie die LDN Kit-Kontrollen verwendet. Die Proben wurden parallel im multiplexen Assay und im ELISA gemessen.

Wie in Abbildung 29 zu sehen ist, stimmen die mit Hilfe des multiplexen Catecholamin-Assays bestimmten Konzentrationen sehr gut mit denen im 3-CAT-ELISA bestimmten Konzentrationen überein, ebenso der Serotonin-Assay mit dem Serotonin-ELISA, für die Metanephrine ist die Übereinstimmung zwischen multiplexem Assay und 2-MET Urine ELISA ebenfalls akzeptabel. Für Dopamin quantifiziert der multiplexe Assay geringfügig weniger als der Dopamin-ELISA, die Übereinstimmung zwischen den beiden Assays sowie mit den Sollwerten ist dennoch sehr gut. Für Adrenalin ist die Übereinstimmung bei

den Kit-Kontrollen und bei Bestimmung der endogenen Konzentration in der Urinprobe sehr gut, für die *gespikten* Urinproben unterscheiden sich die quantifizierten Mengen stärker. Bei Noradrenalin ist die Übereinstimmung bei niedrigen Konzentrationen sehr gut, bei höheren Konzentrationen quantifiziert der multiplexe Assay mehr als der ELISA und ist dabei näher am Sollwert als der ELISA, liefert also hier die besseren Werte. Allerdings quantifiziert der multiplexe Assay wesentlich weniger endogenes Noradrenalin in der Urinprobe. Für Metanephrin und Normetanephrin ist die Übereinstimmung zwischen den beiden Formaten akzeptabel, hier werden mit dem multiplexen Assay etwas geringere Konzentrationen erhalten als mit dem ELISA, die quantifizierten Mengen liegen ebenfalls unterhalb des Sollwertes, es wird also generell etwas zu wenig Metanephrin bzw. Normetanephrin gemessen. Für Serotonin hingegen ist die Übereinstimmung zwischen multiplexem Assay und ELISA sehr gut, auch entsprechen die im multiplexen Assay quantifizierten Mengen der Sollkonzentration. Für 3-Methoxytyramin war kein kommerziell erhältlicher ELISA verfügbar, daher konnte hier kein Vergleich durchgeführt werden.

Insgesamt konnte die Übereinstimmung zwischen den neu entwickelten multiplexen Catecholamin- und Metanephrin/Serotonin-Assays mit kommerziell erhältlichen ELISAs anhand *gespikter* Urinproben demonstriert werden und gezeigt werden, dass mit den multiplexen Assays Catecholamine, Metanephrine und Serotonin im Urin richtig quantifiziert werden können. Im Anschluss wurde folglich mit der Quantifizierung der Catecholamine, Metanephrine und Serotonin im Urin von Patienten mit verschiedenen Krankheitsbildern und im Urin von Alpha-Adrenozeptor-Knockout-Mäusen fortgefahren (siehe Kapitel 4.9 und 4.10). Allerdings konnte auch hier beobachtet werden, dass im Noradrenalin- bzw. Normetanephrin-Assay eine Unterquantifizierung von endogenem Noradrenalin bzw. Normetanephrin stattfindet.

Um die Ursache für diese Beobachtung aufzuklären, wurde nun ein weiterer Vergleich zwischen den beiden Methoden durchgeführt, bei welchem die Catecholamine, Metanephrine und Serotonin in Patientenproben parallel mit den multiplexen Catecholamin- und Metanephrin/Serotonin-Assays sowie mit den kommerziell erhältlichen ELISAs quantifiziert wurden. Zudem wurde in den für den Vergleich verwendeten Proben die Konzentration der Catecholamine und Metanephrine mittels HPLC am Universitätsklinikum in Tübingen bestimmt. Es handelte sich dabei um Urinproben von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen, unter anderem um Patienten mit einem Phäochromozytom, einem Paragangliom, einer Nebennierenraumforderung oder mit pulmonaler Hypertonie.

Um die Ergebnisse zu vergleichen, wurden Korrelationsdiagramme erstellt sowie der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Abbildung 30 zeigt die Korrelationsdiagramme für den Vergleich zwischen multiplexem Immunoassay, ELISA und den HPLC-Messungen. Im Anhang sind die mit der jeweiligen Methode bestimmten Konzentrationen der Analyten in Tabelle 47 und Tabelle 48 gelistet.

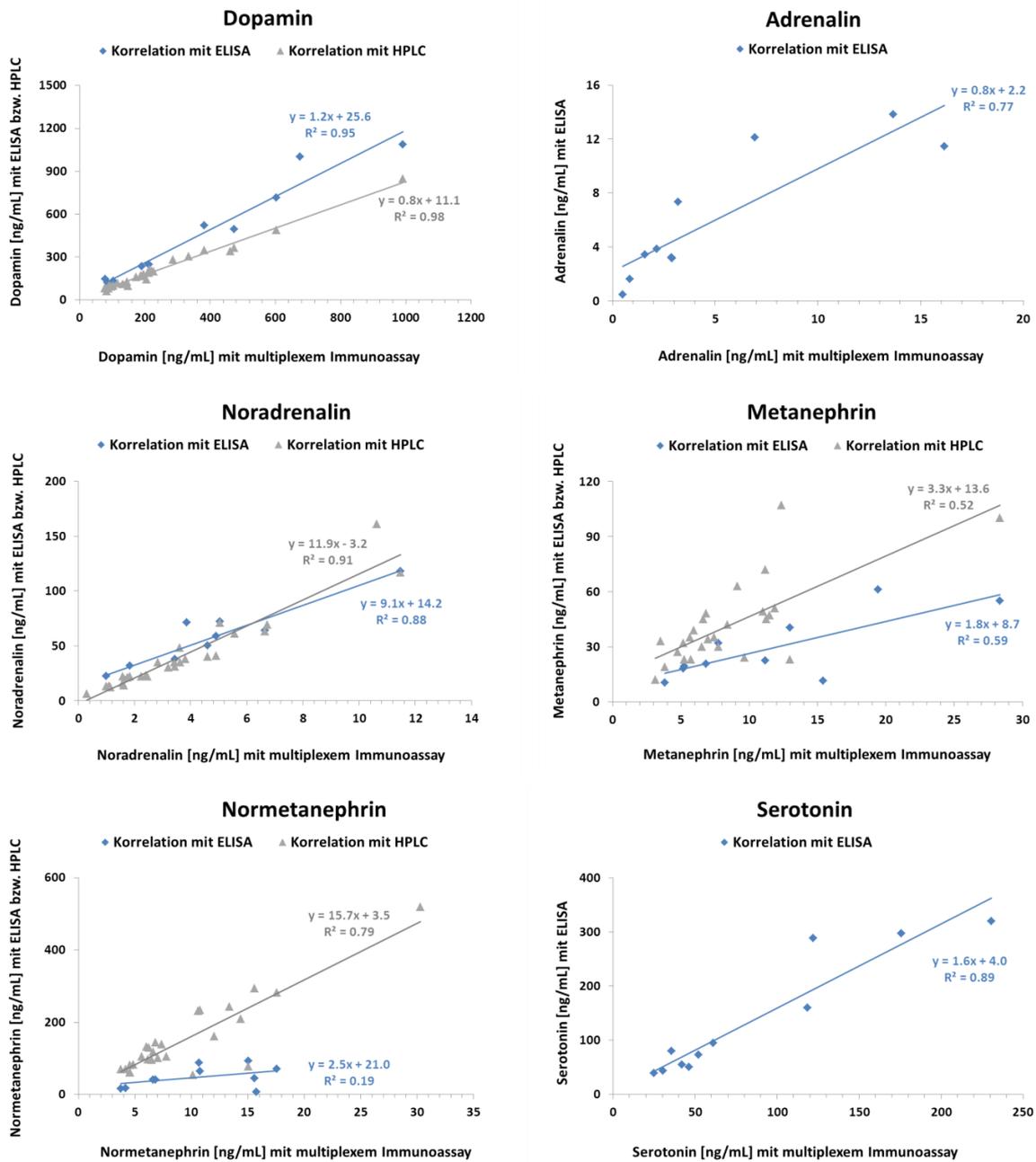


Abbildung 30: Korrelationsdiagramme für den Vergleich zwischen den multiplexen Immunoassays und kommerziell erhältlichen kompetitiven ELISAs bzw. HPLC-Messungen. 30 humane Urinproben, für welche bereits HPLC-Referenzmessungen vorhanden waren, wurden vom Universitätsklinikum in Tübingen für den Vergleich von multiplexem Immunoassay mit kommerziell erhältlichen ELISAs und HPLC-Messungen bereitgestellt. 11 dieser Proben wurden parallel im multiplexen Immunoassay und im ELISA vermessen. Zudem wurden die im multiplexen Assay bestimmten Konzentrationen mit den mittels HPLC gemessenen Konzentrationen verglichen. Auf der x-Achse sind dabei die im multiplexen Immunoassay ermittelten Konzentrationen der Analyten aufgetragen, auf der y-Achse die im ELISA bzw. mit HPLC ermittelten Werte. Es wurde jeweils eine lineare Regression durchgeführt. Bei Adrenalin, Metanephrin und Normetanephrin wurde jeweils ein sehr hoher Wert nicht in die Berechnung einbezogen, da dies zu einem falsch hohen Bestimmtheitsmaß R^2 geführt hätte. Für Adrenalin ist die Korrelation mit HPLC nicht gezeigt, da hier bei den HPLC-Messungen die Konzentration nur bei drei der 30 Proben oberhalb des LLOQ lag. Für Serotonin waren keine HPLC-Referenzmessungen verfügbar.

Des Weiteren wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet, um eine weitere Aussage bezüglich der Übereinstimmung der Methoden treffen zu können. Tabelle 37 zeigt den Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman sowie den Pearson Korrelationskoeffizienten, welcher aus den Bestimmtheitsmaßen aus Abbildung 30 berechnet wurde. Zudem sind die Ergebnisse für die lineare Regression gelistet.

Tabelle 37: Korrelationskoeffizienten nach Spearman und Pearson sowie die Ergebnisse der linearen Regression für den Vergleich zwischen multiplexem Immunoassay, kompetitivem ELISA und den HPLC-Messungen des Universitätsklinikums in Tübingen.

Analyt	Korrelationskoeffizienten					
	multiplexer Immunoassay & ELISA (n=11)			multiplexer Immunoassay & HPLC (n=30)		
	Spearman r_s	Pearson R	Zusammenhang	Spearman r_s	Pearson R	Zusammenhang
Dopamin	0,96	0,98	perfekt	0,98	0,99	perfekt
Adrenalin	0,89	0,88	hoch	1,0	-	perfekt*
Noradrenalin	0,92	0,94	perfekt	0,98	0,95	perfekt
Metanephrin	0,79	0,77	deutlich	0,70	0,72	deutlich
Normetanephrin	0,53	0,43	mäßig	0,76	0,89	deutlich
Serotonin	0,94	0,94	perfekt	-	-	-

Ergebnisse der linearen Regression		
Dopamin	ELISA = 1,16 Multiplex + 25,59	HPLC = 0,82 Multiplex +11,07
Adrenalin	ELISA = 0,76 Multiplex + 2,17	-
Noradrenalin	ELISA = 9,11 Multiplex + 14,22	HPLC = 11,89 Multiplex -3,22
Metanephrin	ELISA = 1,76 Multiplex + 8,73	HPLC = 3,3 Multiplex +13,56
Normetanephrin	ELISA = 2,54 Multiplex + 21,02	HPLC = 15,68 Multiplex +3,49
Serotonin	ELISA = 1,55 Multiplex + 4,03	-

* Für Adrenalin konnte kein Korrelationsdiagramm für den Vergleich zwischen multiplexem Immunoassay und HPLC erstellt werden, da hier die AdrenalinKonzentrationen nur bei drei der 30 Proben oberhalb des LLOQ der HPLC-Methode lagen (5 ng/mL). Allerdings wurden für diese 27 Proben auch im multiplexen Immunoassay Konzentrationen < 5 ng/mL ermittelt, sodass man auch hier von einer sehr guten Korrelation zwischen multiplexem Immunoassay und den HPLC-Messungen ausgehen kann.

Wie aus Tabelle 37 hervorgeht, korreliert der multiplexe Immunoassay für Catecholamine sehr gut sowohl mit dem kompetitiven ELISA der Firma LDN als auch mit den HPLC-Messungen. Für Metanephrin ist die Korrelation zwischen multiplexen Immunoassay und dem kompetitiven ELISA sowie den HPLC-Messungen gut, für Normetanephrin zeigt sich zwar ebenfalls eine gute Korrelation mit den HPLC-Messungen, jedoch nur eine mäßige

Korrelation mit dem kompetitiven ELISA. Für Serotonin ist die Korrelation mit dem ELISA sehr gut.

Das beste Ergebnis wurde für Dopamin erhalten. Hier besteht ein perfekter Zusammenhang zwischen den Ergebnissen im multiplexen Immunoassay und den Ergebnissen im ELISA bzw. der HPLC. Die Steigung von 1,16 aus der linearen Regression gibt an, dass der ELISA im Durchschnitt leicht höhere Konzentrationen ergibt als der multiplexe Assay, wohingegen die Steigung von 0,82 aus der linearen Regression für den Vergleich mit HPLC zeigt, dass mit der HPLC im Durchschnitt etwas niedrigere Konzentrationen gemessen werden als im multiplexen Assay.

Für Adrenalin besteht ebenfalls ein hoher Zusammenhang zwischen den Ergebnissen aus dem multiplexen Assay und aus dem ELISA. Die Steigung von 0.76 zeigt an, dass der ELISA geringere Mengen an Adrenalin quantifiziert als der multiplexe Assay, jedoch konnte beobachtet werden, dass dies hauptsächlich für hohe Konzentrationen gilt. Im niedrigen Konzentrationsbereich ergeben sich im ELISA leicht höhere Konzentrationen als im multiplexen Assay (siehe Anhang Tabelle 47). Für den Vergleich mit den HPLC-Messungen standen nur 3 Messwerte zur Verfügung, die restlichen 27 lagen bei beiden Methoden unterhalb von 5 ng/mL, dem LLOQ der HPLC-Methode. Allerdings konnte beobachtet werden, dass im multiplexen Assay deutlich höhere Konzentrationen gemessen werden als mit der HPLC-Methode (siehe Anhang Tabelle 47).

Für Noradrenalin besteht ebenfalls ein perfekter Zusammenhang zwischen dem multiplexen Assay und dem ELISA bzw. den HPLC-Messungen. Jedoch zeigen hier die Steigungen von 9,11 bzw. 11,89 dass im multiplexen Assay wesentlich weniger Noradrenalin gemessen wird als im ELISA oder mittels HPLC. Im Mittel quantifiziert der multiplexe Immunoassay demnach etwa 10-mal weniger Noradrenalin als die anderen beiden Methoden.

Für Metanephrin ergibt sich nur ein deutlicher Zusammenhang zwischen den jeweiligen Messmethoden und auch hier werden im ELISA bzw. mittels HPLC höhere Metanephrinkonzentrationen gemessen als im multiplexen Assay.

Für Normetanephrin ergibt sich für den Vergleich mit dem ELISA nur ein mäßiger Zusammenhang, für den Vergleich mit der HPLC jedoch ein deutlicher Zusammenhang. Wie auch bereits bei Noradrenalin festgestellt, sind die quantifizierten Mengen an Normetanephrin im multiplexen Assay wesentlich geringer als die im ELISA oder mittels HPLC quantifizierten Mengen, wobei sich auch hier die im ELISA und mittels HPLC bestimmten Konzentrationen sehr stark unterscheiden (siehe Anhang Tabelle 48).

Für Serotonin ist der Zusammenhang zwischen multiplexem Assay und ELISA perfekt, hier werden im ELISA leicht höhere Konzentrationen gemessen als im multiplexen Assay (Steigung 1,55).

Um zu klären, woher die starke Abweichung der quantifizierten Noradrenalin- bzw. Normetanephrinmenge zwischen multiplexem Immunoassay und ELISA bzw. HPLC kommt, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Zunächst wurde mit Hilfe einer Urinprobe mit zugesetztem synthetischen Noradrenalin (*gespikter* Urinprobe) und verschiedenen Urinproben von Patienten getestet, wie hoch die Wiederfindungsrate im multiplexen Assay und im ELISA ist. Dafür wurden auch die für den multiplexen Assay mit NHS-PEG₁₂-Biotin acylierten Proben im ELISA vermessen um auszuschließen, dass die Unterquantifizierung mit dem Acylierungsreagenz zusammenhängt. Die Urinprobe, welcher 50 ng/mL Noradrenalin zugesetzt wurden, wurde ebenfalls ohne Zusatz von Noradrenalin vermessen, um die endogene Konzentration an Noradrenalin in dieser Probe zu bestimmen. Die bestimmte endogene Konzentration wurde dann von der Konzentration, die in der *gespikter* Probe gemessen wurde, abgezogen. Das Ergebnis ist in Abbildung 31 dargestellt.

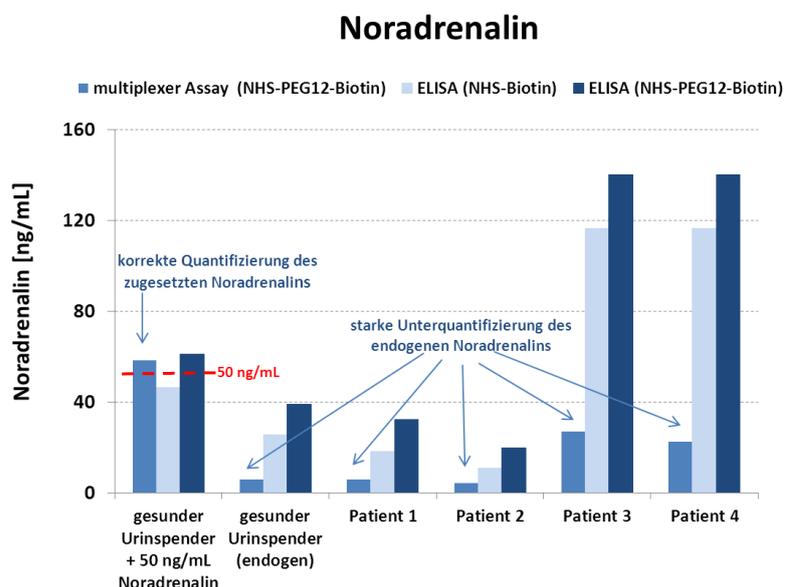


Abbildung 31: Vergleich der im multiplexen Assay und im ELISA quantifizierten Menge an Noradrenalin. Um zu ermitteln, worin der Grund für die Unterquantifizierung des Noradrenalins im multiplexen Immunoassay liegt, wurden zu einer Urinprobe eines gesunden Probanden 50 ng/mL Noradrenalin zugesetzt. Zudem wurde diese Urinprobe ohne Zusatz gemessen, um die endogene Konzentration an Noradrenalin in dieser Probe zu ermitteln. Ebenso wurden vier Patientenproben analysiert. Zusätzlich wurden die für den multiplexen Immunoassay mit NHS-PEG₁₂-Biotin acylierten Proben im ELISA vermessen, um einen Einfluss des Acylierungsreagenzes auf diesen Effekt auszuschließen.

Wie in Abbildung 31 zu sehen ist, konnte mit diesem Versuch die Unterquantifizierung von endogenem Noradrenalin im multiplexen Assay bestätigt werden. Sowohl beim gesunden Urinspender als auch bei den vier Patienten wird im multiplexen Immunoassay wesentlich weniger Noradrenalin quantifiziert als im ELISA. Jedoch sind die Konzentrationen, die im ELISA in den mit NHS-PEG₁₂-Biotin acylierten Proben ermittelt wurden, wesentlich höher und entsprechen in etwa den Konzentrationen, wie sie im ELISA gemessen wurden, der dem Herstellerprotokoll entsprechend mit NHS-Biotin durchgeführt wurde. Daher kann ausgeschlossen werden, dass die Unterquantifizierung im multiplexen Assay durch das Acylierungsreagenz zustande kommt. Vergleicht man nun jedoch die gemessenen Konzentrationen für die Urinprobe, welcher 50 ng/mL Noradrenalin zugesetzt wurden, kann man sehen, dass hier sowohl der ELISA als auch der multiplexe Immunoassay richtig quantifizieren. Die Wiederfindungsrate beträgt hier für den multiplexen Immunoassay 117 % und für den ELISA (NHS-Biotin) 93 % sowie für den ELISA (NHS-PEG₁₂-Biotin) 122 %. Somit konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass im multiplexen Assay zwar das in eine Urinprobe *gespikte*, synthetisch hergestellte Noradrenalin richtig quantifiziert wird, jedoch nicht das endogen in einer Urinprobe enthaltene Noradrenalin.

Um nun eine Ursache für diese Beobachtung zu ermitteln wurde überprüft, ob die Unterquantifizierung im multiplexen Assay mit dem Vorhandensein zweier verschiedener Stereoisomere des Noradrenalins zusammenhängen könnte. Zwar wurde nur synthetisch hergestelltes L-Noradrenalin zu der Urinprobe zugesetzt, demzufolge dasselbe Stereoisomer, das auch natürlicherweise beim Menschen vorkommt, jedoch erfolgte die Immunisierung der Kaninchen gegen die D- sowie L-Form von Noradrenalin. Um einen möglichen Zusammenhang hiermit zu klären, wurde der Versuch wie oben beschrieben wiederholt, dabei aber auch Noradrenalin in D- und L-Form der Urinprobe zugesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 32 dargestellt.

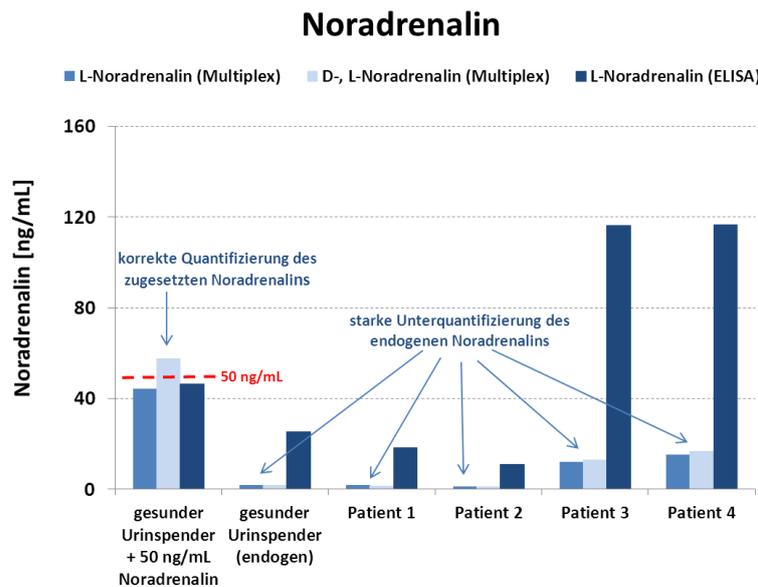


Abbildung 32: Vergleich der im multiplexen Assay und im ELISA quantifizierten Menge an Noradrenalin bei Verwendung unterschiedlicher Stereoisomere des Noradrenalins. Um zu ermitteln, ob der Grund für die Unterquantifizierung des Noradrenalins im multiplexen Immunoassay mit dem Vorhandensein zweier verschiedener Stereoisomere des Noradrenalins zusammenhängt, wurde für die Erstellung der Standardkurve ein synthetisch hergestelltes L-Noradrenalin sowie ein synthetisch hergestelltes D- und L-Noradrenalin-Gemisch verwendet. Zudem wurde zu einer Urinprobe eines gesunden Probanden 50 ng/mL L-Noradrenalin bzw. das Gemisch aus D- und L-Noradrenalin zugesetzt. Des Weiteren wurde diese Urinprobe ohne Zusatz gemessen, um die endogene Konzentration an Noradrenalin in dieser Probe zu ermitteln. Ebenso wurden vier Patientenproben analysiert. Die im multiplexen Assay quantifizierten Noradrenalin-Konzentrationen wurden mit den im ELISA gemessenen Konzentrationen verglichen.

Wie in Abbildung 32 zu sehen ist, besteht kein Unterschied zwischen der Verwendung von L-Noradrenalin und D,L-Noradrenalin im multiplexen Immunoassay. Sowohl zur Urinprobe zugesetztes L-Noradrenalin als auch D,L-Noradrenalin werden korrekt quantifiziert und mit beiden Substanzen werden in den Patientenproben dieselben endogenen Noradrenalin-Konzentrationen bestimmt. Jedoch sind diese wesentlich geringer als die im ELISA quantifizierten endogenen Noradrenalin-Konzentrationen. Dass die in diesem Versuch im multiplexen Assay bestimmten Noradrenalin-Konzentrationen niedriger sind, als die im vorherigen Versuch ermittelten Konzentrationen liegt an der Verwendung unterschiedlicher Mikrosphären-Chargen in den beiden multiplexen Immunoassays. Demzufolge liegt die Diskrepanz zwischen der Quantifizierung von endogenem Noradrenalin im multiplexen Assay und im ELISA nicht an der Chiralität von Noradrenalin.

Eine weitere Ursache für die starke Unterquantifizierung von endogenem Noradrenalin im multiplexen Immunoassay könnte darin liegen, dass das endogene Noradrenalin im Gegensatz zum frisch *gespiktem* Noradrenalin durch andere Bestandteile im Urin maskiert sein könnte. Es könnte daher sein, dass die Bindungsstelle für den Antikörper, der im

multiplexen Assay verwendet wird, blockiert ist und dieser daher nicht an sein Antigen binden kann, während der im ELISA verwendete Antikörper trotzdem oder an einer anderen Stelle bindet. Daher wurde versucht, nach der Elution der modifizierten Analyten von der Extraktionsplatte durch Erhitzen der salzsauren Extrakte für 1 h bei 90 °C eventuell vorhandene Maskierungen der Epitope zu entfernen. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 33 dargestellt.

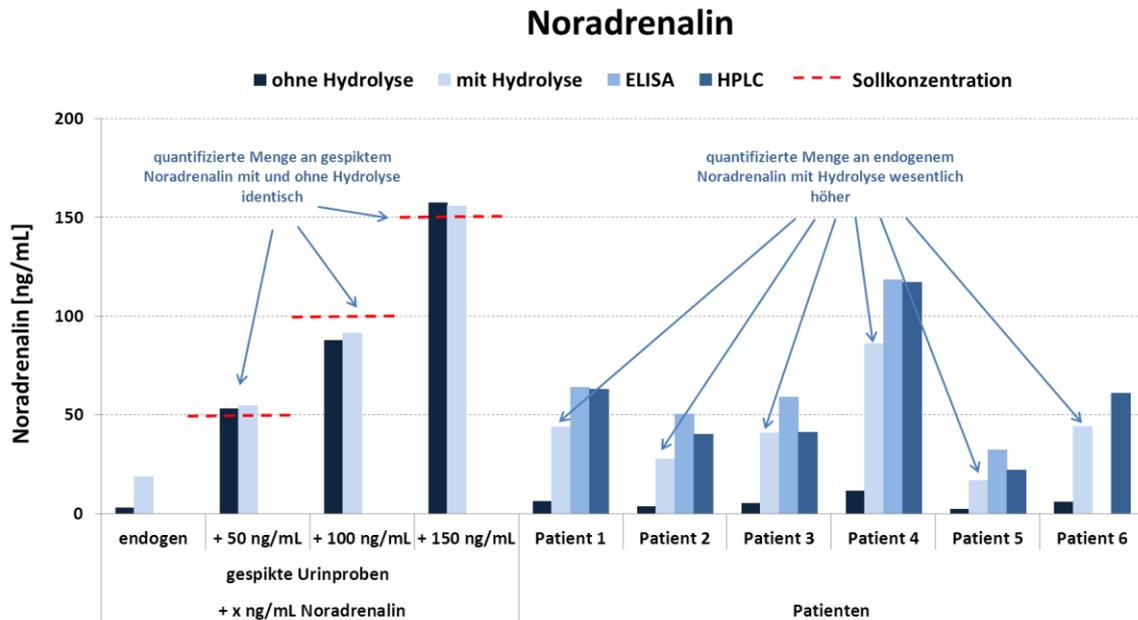


Abbildung 33: Quantifizierung von Noradrenalin im multiplexen Immunoassay nach saurer Hydrolyse und Vergleich mit ELISA- und HPLC-Messungen. Um zu ermitteln, ob der Grund für die Unterquantifizierung des endogenen Noradrenalins im multiplexen Immunoassay durch eine Maskierung der Epitope zu Stande kommt, wurde nach der Elution von der Extraktionsplatte die Hälfte der salzsauren Extrakte für 1 h bei 90 °C hydrolysiert, die andere Hälfte in dieser Zeit bei 4 °C gelagert. Nach Abkühlen auf RT wurden die Extrakte enzymatisch umgewandelt und im multiplexen Catecholamin-Assay analysiert. Es wurden sowohl *gespikte* Urinproben mit frisch zugesetztem synthetisch hergestelltem Noradrenalin als auch Patientenproben gemessen. Die Messergebnisse für die Patienten mit und ohne Hydrolyse wurden mit den Ergebnissen aus ELISA- und HPLC-Messungen für diese Patienten verglichen. Für Patient 6 stand kein Messwert für den ELISA zur Verfügung.

Wie in Abbildung 33 zu sehen ist, ist die gemessene Konzentration an endogenem Noradrenalin nach saurer Hydrolyse wesentlich höher als ohne Hydrolyse und liegt nahe an den im ELISA oder mit HPLC ermittelten Konzentrationen. Während sowohl ohne Hydrolyse als auch mit Hydrolyse für die *gespikten* Urinproben dieselben Konzentrationen ermittelt werden und diese den Sollkonzentrationen entsprechen, erfolgt ohne Hydrolyse weiterhin eine starke Unterquantifizierung des endogenen Noradrenalins. Mit Hydrolyse jedoch werden im multiplexen Catecholamin-Assay ähnliche Konzentrationen in den Patientenproben ermittelt wie bei der Quantifizierung mittels ELISA oder HPLC.

4.9 Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Patienten

Nach Abschluss der Entwicklungs- und Validierungsphase sowie dem Vergleich mit den kompetitiven ELISAs der Firma LDN anhand *gespikter* Urinproben wurden der multiplexe Catecholamin-Immunoassay zur Quantifizierung von Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin sowie der multiplexe Metanephrin/Serotonin-Immunoassay zur Quantifizierung von Metanephrin, Normetanephrin, 3-Methoxytyramin und Serotonin für die Quantifizierung dieser Analyten in humanem Urin von Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsbildern eingesetzt. Dies diente dazu, die Anwendbarkeit der entwickelten Assays für humanen Patientenurin zu demonstrieren und zu zeigen, dass Unterschiede in der Konzentration dieser Analyten im Urin zuverlässig erfasst und damit gesunde von kranken Individuen unterschieden werden können. Dazu stand Urin von Patienten mit einem histologisch gesicherten Phäochromozytom zur Verfügung, bei denen vor und nach operativer Entfernung des Tumors Urin gesammelt wurde. Des Weiteren wurden die Catecholamine, Metanephrine und Serotonin in Urinproben von Patienten mit Gedächtnisstörungen bestimmt. Darüber hinaus stand ein großes Set an Urinproben von Patienten mit verschiedenen Nierenerkrankungen für die Demonstration der Anwendbarkeit der multiplexen Immunoassays zur Verfügung. Die Durchführung der multiplexen Assays erfolgte hier ohne saure Hydrolyse zur Verbesserung der Wiederfindungsrate des endogenen Noradrenalins bzw. Normetanephrins, da die Quantifizierung der Analyten in den Patientenproben bereits durchgeführt wurde, nachdem im Vergleich mit den kompetitiven ELISAs der Firma LDN anhand *gespikter* Urinproben eine sehr gute Übereinstimmung gezeigt werden konnte. Der Vergleich mit den HPLC-Messungen sowie die Versuche zur sauren Hydrolyse wurden erst im Anschluss an die Messung der Patientenproben durchgeführt, um die dort beobachtete Unterquantifizierung des Noradrenalins bzw. Normetanephrins abzuklären.

4.9.1 Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Patienten mit einem Phäochromozytom

Bei den von der Charité - Universitätsmedizin in Berlin bereitgestellten Urinproben handelt es sich um Urin von drei weiblichen Patienten mit einem histologisch gesicherten Phäochromozytom der rechten oder linken Nebenniere. Bei diesen Patientinnen wurde Spontanurin jeweils vor und nach der laparoskopischen Adrenalektomie gesammelt. Die Urinproben wurden mit Hilfe der multiplexen Immunoassays analysiert. Da es sich um Spontanurin handelte, erfolgte zusätzlich die Bestimmung von Kreatinin als Referenz. Die Konzentrationen der Analyten bei den Phäochromozytom-Patienten wurden mit der Konzentration dieser Analyten bei gesunden Spendern verglichen. Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin der Phäochromozytom-Patienten.

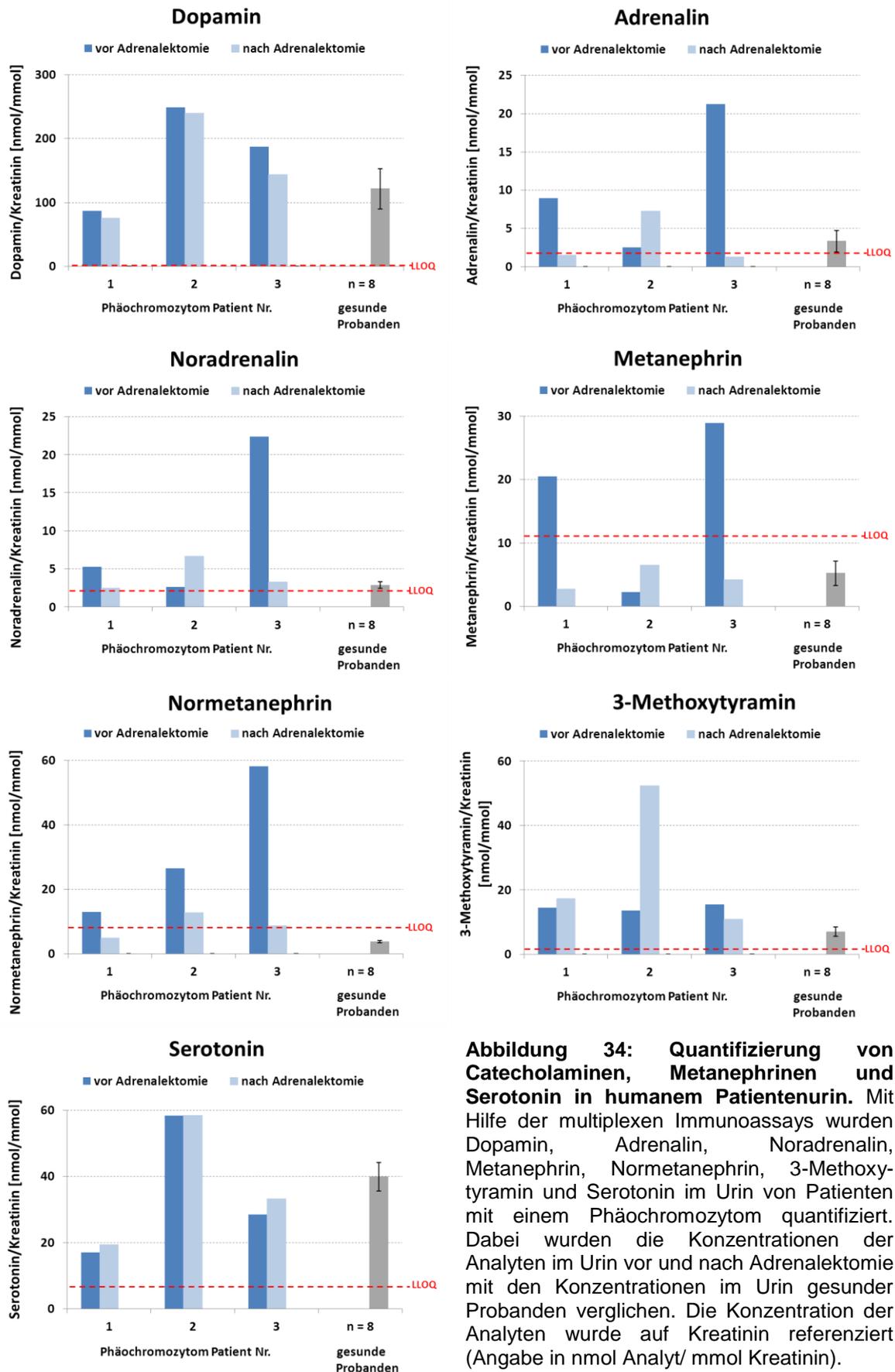


Abbildung 34: Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin in humanem Patientenurin. Mit Hilfe der multiplexen Immunoassays wurden Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin, Metanephrin, Normetanephrin, 3-Methoxytyramin und Serotonin im Urin von Patienten mit einem Phäochromozytom quantifiziert. Dabei wurden die Konzentrationen der Analyten im Urin vor und nach Adrenalectomie mit den Konzentrationen im Urin gesunder Probanden verglichen. Die Konzentration der Analyten wurde auf Kreatinin referenziert (Angabe in nmol Analyt/ mmol Kreatinin).

Abbildung 34 zeigt die Konzentrationen für die Catecholamine, Metanephrene und Serotonin, die mittels der multiplexen Immunoassays im Urin der Phäochromozytom-Patienten ermittelt wurden.

Für Dopamin konnte ermittelt werden, dass kein wesentlicher Unterschied zwischen der Dopaminkonzentration im Urin der Patienten vor und nach der laparoskopischen Adrenalektomie besteht und dass diese Konzentrationen auch im Bereich der Dopaminkonzentration im Urin gesunder Probanden liegen. Für Adrenalin konnte bei den Patienten 1 und 3 erwartungsgemäß eine starke Reduktion der AdrenalinKonzentration im Urin nach operativer Entfernung des Tumors festgestellt werden. Während vor der Operation die AdrenalinKonzentration weit über der Konzentration von Adrenalin im Urin gesunder Spender lag, lag die Konzentration nach der Operation sogar knapp unterhalb des LLOQ und somit wieder im gleichen Bereich wie bei gesunden Spendern. Eine Ausnahme bildet jedoch Patient 2, bei dem nach der Adrenalektomie eine Erhöhung der AdrenalinKonzentration im Urin beobachtet wurde. Hier war die AdrenalinKonzentration im Urin vor der operativen Entfernung des Tumors im Vergleich zu den gesunden Probanden nicht erhöht. Dasselbe Ergebnis wurde für Noradrenalin und Metanephrin erhalten. Bei Metanephrin liegen die Konzentrationen im Urin von Patient 2 vor und nach der Operation unterhalb des LLOQ, allerdings ist dieser für den Metanephrin-Assay auch sehr hoch. Für Normetanephrin wird für alle Patienten das erwartete Ergebnis erhalten, nämlich die starke Reduktion der Normetanephrinkonzentration im Urin nach der Adrenalektomie in einen Konzentrationsbereich, der bei gesunden Spendern ermittelt wurde. Für 3-Methoxytyramin wird ein ähnliches Ergebnis erhalten wie für Dopamin, allerdings stellt Patient 2 auch hier eine Ausnahme dar, da sich die 3-Methoxytyraminkonzentration im Urin nach der Operation stark erhöht. Bei Serotonin besteht ebenfalls kein Konzentrationsunterschied im Urin vor und nach der Adrenalektomie, hier liegen die Konzentrationen in beiden Fällen in einem ähnlichen Bereich wie bei gesunden Probanden.

4.9.2 Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Patienten mit Gedächtnisstörungen

Als eine weitere Anwendung der multiplexen Immunoassays wurden Catecholamine, Metanephrine und Serotonin im Urin von Patienten mit Gedächtnisstörungen quantifiziert. Diese Patienten litten vorwiegend an einer leichten kognitiven Störung oder aber an einer Alzheimer- bzw. Parkinson-Demenz. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, kommt es bei Morbus Alzheimer zu einer Schädigung von Neuronen, besonders von cholinergen und noradrenergen Neuronen, bei Morbus Parkinson dagegen zu einer Schädigung dopaminerger Neuronen. Dabei soll es auch zu einer Reduktion der Catecholamine im Plasma und im Urin von Alzheimer-Patienten kommen [56]. Um dies zu überprüfen, wurden die im Urin von Patienten gemessenen Konzentrationen der Analyten mit denen gesunder Probanden verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 35 dargestellt.

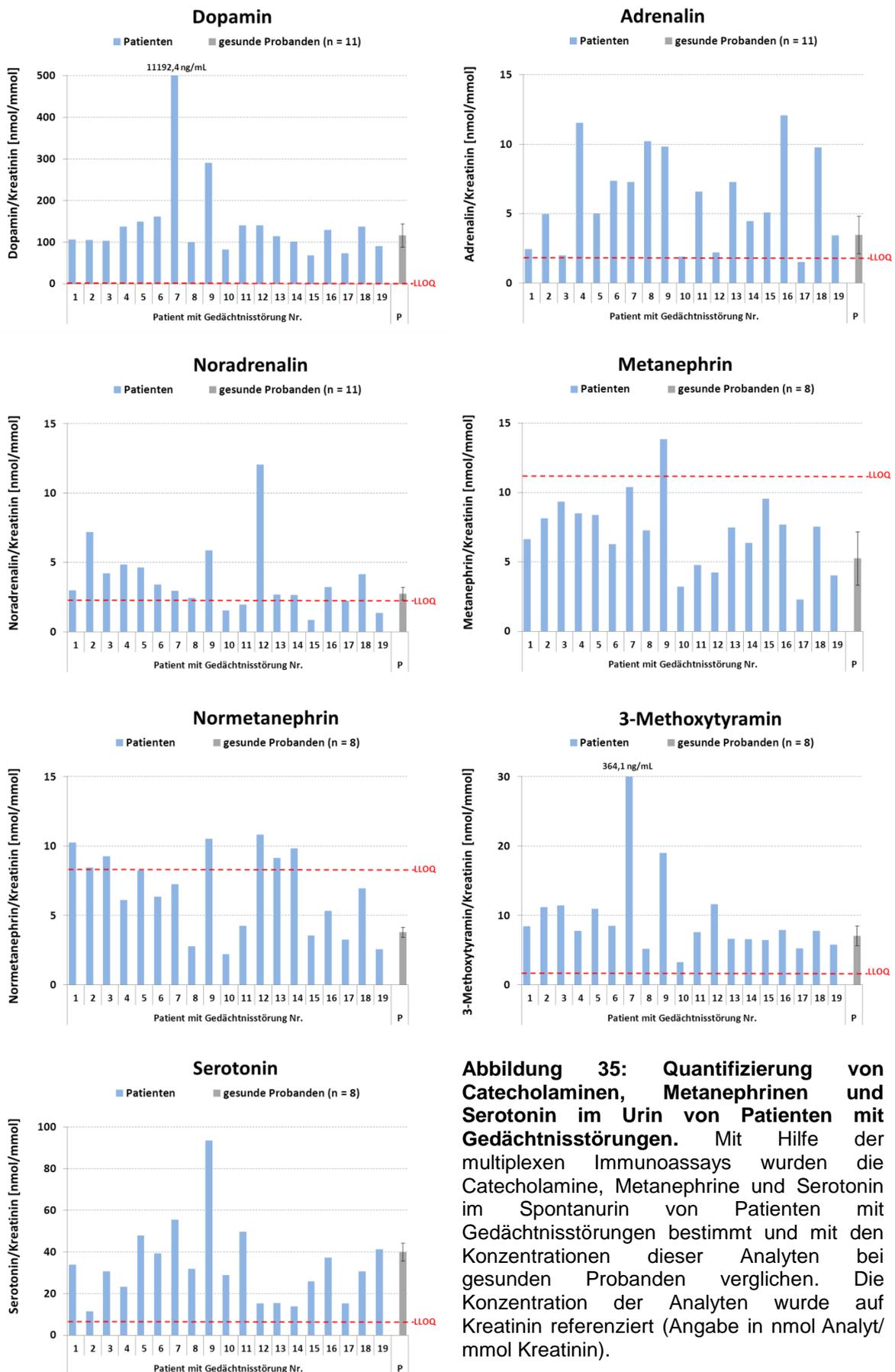


Abbildung 35: Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Patienten mit Gedächtnisstörungen. Mit Hilfe der multiplexen Immunoassays wurden die Catecholamine, Metanephrine und Serotonin im Spontanurin von Patienten mit Gedächtnisstörungen bestimmt und mit den Konzentrationen dieser Analyten bei gesunden Probanden verglichen. Die Konzentration der Analyten wurde auf Kreatinin referenziert (Angabe in nmol Analyt/mmol Kreatinin).

Wie in Abbildung 35 zu sehen ist, konnten mit Hilfe der multiplexen Immunoassays die Catecholamine, Metanephrine und Serotonin erfolgreich im Spontanurin von Patienten mit verschiedenen Gedächtnisstörungen quantifiziert werden. Man kann für alle Analyten deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten beobachten. So gibt es sowohl Patienten mit wesentlich höheren als auch Patienten mit wesentlich niedrigeren Konzentrationen der Analyten als bei den gesunden Probanden. Um eine statistische Aussage darüber treffen zu können, bei welchen Patienten die Konzentration der Analyten im Urin tatsächlich stark von derjenigen der anderen Patienten abweicht, wurde der Ausreißertest nach Grubbs zur Bestimmung von Ausreißern durchgeführt. Demnach weisen nur 3 der 19 Patienten signifikant höhere Konzentrationen auf als die anderen Patienten. Patient 7 und 9 zeigen eine signifikant höhere Konzentration an Dopamin (PG = 4,129 bei Patient 7, PG = 3,366 bei Patient 9) und 3-Methoxytyramin (PG = 4,126 bei Patient 7, PG = 2,998 bei Patient 9) im Urin, Patient 9 auch eine deutlich erhöhte Konzentration an Serotonin (PG = 3,092). Patient 12 hingegen zeigt eine signifikant erhöhte Konzentration an Noradrenalin (PG = 3,246). Um zu beurteilen, bei welchen Patienten die Konzentration der Analyten im Urin stark von derjenigen bei den gesunden Probanden abweicht, wurde ermittelt, bei welchen Patienten die Konzentration der Analyten höher oder niedriger ist als der Mittelwert der Konzentration bei gesunden Spendern plus 3x der Standardabweichung des Mittelwerts. Die Ergebnisse sind in Tabelle 38 dargestellt.

Tabelle 38: Patienten mit einer höheren (>) oder niedrigeren (<) Konzentration der Analyten im Urin als der Mittelwert der Konzentration $\pm 3x$ SD bei gesunden Spendern.

Patient Nr.	Konzentration niedriger (<) oder höher (>) als Mittelwert $\pm 3x$ SD bei den gesunden Spendern?						
	Dopamin	Adrenalin	Noradrenalin	MN	NMN	3-MT	Serotonin
1	-	-	-	-	>	-	-
2	-	-	>	-	>	-	<
3	-	-	-	-	>	>	-
4	-	>	>	-	>	-	<
5	-	-	>	-	>	-	-
6	-	-	-	-	>	-	-
7	>	-	-	-	>	>	>
8	-	>	-	-	-	-	-
9	>	>	>	>	>	>	>
10	-	-	-	-	<	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	>	-	>	>	<
13	-	-	-	-	>	-	<
14	-	-	-	-	>	-	<
15	-	-	<	-	-	-	<
16	-	>	-	-	>	-	<
17	-	-	-	-	-	-	<
18	-	>	-	-	>	-	-
19	-	-	-	-	<	-	-

Tabelle 38 zeigt, dass bei fast allen Patienten die Konzentration mindestens eines Analyten um mehr als $3x$ SD vom Mittelwert bei gesunden Spendern abweicht, für Patient 9 sogar bei allen Analyten. Auffällig ist, dass bei Serotonin die Konzentration im Urin der Patienten meistens viel niedriger ist als bei den gesunden Spendern. Kombiniert man nun die Ergebnisse des Ausreißertests nach Grubbs und die Ergebnisse aus Abbildung 35 und Tabelle 38 so kann man sagen, dass bei den Patienten 7, 9 und 12 eine signifikante Erhöhung der Konzentration einiger Analyten im Vergleich zu anderen Patienten und gesunden Spendern vorliegt, bei den Patienten 4, 8, 16 und 18 die Adrenalin-konzentration wesentlich höher ist als bei gesunden Spendern und Patient 2 eine wesentlich höhere Konzentration an Noradrenalin aufweist als gesunde Spender. Des Weiteren kann man bei Patient 15 eine wesentlich geringere Noradrenalin-konzentration

und bei den Patienten 2, 12, 13, 14 und 17 eine wesentlich geringere Serotoninkonzentration als bei gesunden Probanden feststellen. Für alle anderen Patienten, die in Tabelle 38 gelistet sind, bestehen keine oder nur geringe Konzentrationsunterschiede im Vergleich zu den gesunden Spendern.

4.9.3 Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Patienten mit verschiedenen Nierenerkrankungen

Neben den Urinproben der Phäochromozytom-Patienten und der Patienten mit Gedächtnisstörungen standen Urinproben von Patienten zur Verfügung, bei denen verschiedene Nierenerkrankungen diagnostiziert wurden. Da die Ausscheidung von Catecholaminen, Metanephrinen und ihren Metaboliten und Konjugaten über den Urin erfolgt, wirkt sich eine veränderte Nierenfunktion auf die Konzentration der Analyten im Plasma und im Urin aus. Demzufolge sinkt zum Beispiel die Exkretion von Catecholaminen und konjugierten Metanephrinen im Urin bei fortgeschrittenem Nierenversagen merklich, was zu einer Erhöhung der Catecholamine, konjugierten Metanephrine und des Metaboliten Vanillinmandelsäure im Plasma führt [132-134]. Daher wurde in den Urinproben dieser Patienten mit Hilfe der multiplexen Immunoassays untersucht, ob sich Unterschiede in den Konzentrationen von Catecholaminen, freien Metanephrinen und Serotonin im Vergleich zu gesunden Probanden ermitteln lassen. Es handelte sich dabei um Patienten mit einer Vaskulitis (n=14), einer fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS, n=16), einer membranösen Glomerulonephritis (membranöse GN, n=8), einer IgA-Nephropathie (n=10), einer hypertensiven Nephropathie (hypertensive NP, n=12) oder einer diabetischen Nephropathie (diabetische NP, n=4). Zusätzlich zeigten einige Patienten nur minimale histologische Veränderungen (n=6) oder zeigten Symptome, waren aber ohne Befund (n=13). Diese Gruppen wurden mit gesunden Kontrollen (n=18) verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 36 dargestellt.

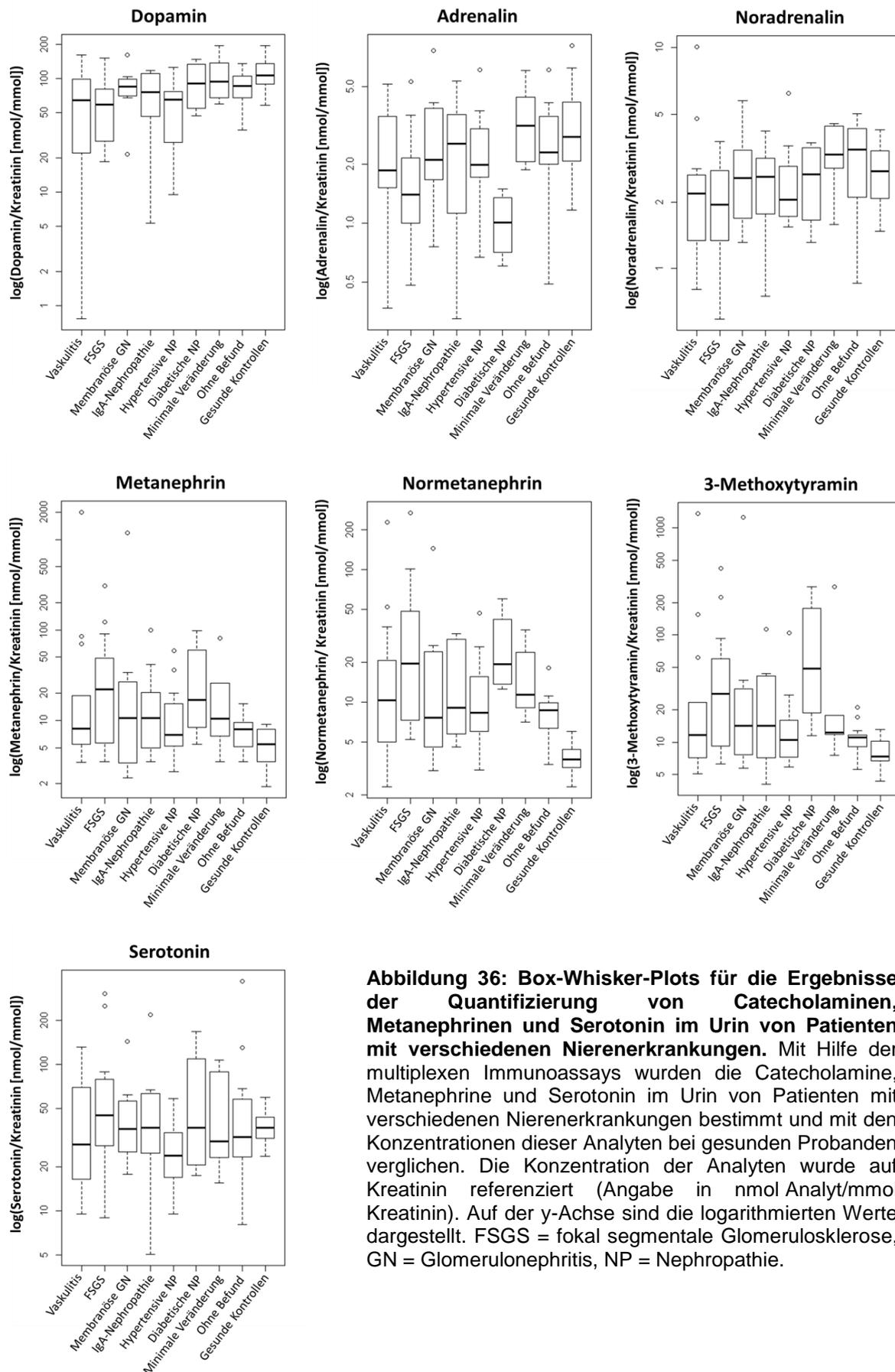


Abbildung 36: Box-Whisker-Plots für die Ergebnisse der Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Patienten mit verschiedenen Nierenerkrankungen. Mit Hilfe der multiplexen Immunoassays wurden die Catecholamine, Metanephrine und Serotonin im Urin von Patienten mit verschiedenen Nierenerkrankungen bestimmt und mit den Konzentrationen dieser Analyten bei gesunden Probanden verglichen. Die Konzentration der Analyten wurde auf Kreatinin referenziert (Angabe in nmol Analyt/mmol Kreatinin). Auf der y-Achse sind die logarithmierten Werte dargestellt. FSGS = fokal segmentale Glomerulosklerose, GN = Glomerulonephritis, NP = Nephropathie.

Wie in Abbildung 36 zu sehen ist, gibt es für manche Analyten und Patientengruppen größere Unterschiede in der Konzentration als für andere. Auffällig ist beispielsweise die niedrige Adrenalinkonzentration und erhöhte Konzentration an 3-Methoxytyramin bei den Patienten mit diabetischer Nephropathie. Ebenso ist auffällig, dass alle Patientengruppen eine höhere Normetanephrinkonzentration aufweisen als die gesunden Kontrollen. Um zu beurteilen, ob sich die Konzentrationen der Analyten bei den unterschiedlichen Patienten signifikant von den Konzentrationen bei gesunden Probanden unterscheiden, wurden t-Tests bzw. Wilcoxon-Tests durchgeführt und jeweils die p-Werte berechnet. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf 1 % festgesetzt, entsprechend einem p-Wert von 0,01. In Tabelle 39 sind p-Werte für diejenigen Gruppen dargestellt, bei denen ein signifikanter Unterschied in der Analytkonzentration zwischen erkrankten und gesunden Personen nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 39: p-Werte für den Vergleich der Analytkonzentrationen bei Patienten mit einer Nierenerkrankung und gesunden Probanden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht, wenn $p < 0,01$ ist. Es sind nur diejenigen Gruppen aufgeführt, für welche ein signifikanter Unterschied in der Analytkonzentration zwischen erkrankten und gesunden Personen ermittelt werden konnte. FSGS = fokale segmentale Glomerulosklerose.

Analyten	Erkrankung	p-Werte
		Vergleich Patienten – gesunde Probanden
Dopamin	Vaskulitis	0,0030
	FSGS	0,00020
	hypertensive Nephropathie	0,00030
Adrenalin	FSGS	0,0021
	diabetische Nephropathie	0,0019
Noradrenalin	-	-
Metanephrin	FSGS	0,0037
Normetanephrin	FSGS	0,0000021
	diabetische Nephropathie	0,0025
	ohne Befund	0,00056
3-Methoxytyramin	FSGS	0,00050
	diabetische Nephropathie	0,0019
Serotonin	-	-

Die p-Werte zeigen, dass für die Patienten mit fokal segmentaler Glomerulosklerose und diabetischer Nephropathie signifikante Unterschiede zu gesunden Probanden bei mehreren Analyten bestehen. Bei Patienten mit FSGS konnte eine signifikante Reduktion der Konzentration an Dopamin und Adrenalin im Urin ermittelt werden, auch die NoradrenalinKonzentration ist im Vergleich zu gesunden Personen, wenn auch nicht signifikant, geringer, sodass hier allgemein eine Reduktion der Catecholamine im Urin der FSGS Patienten vorliegt. Dagegen sind die Konzentrationen an Metanephrin, Normetanephrin und 3-Methoxytyramin im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant höher. Bei den Patienten mit diabetischer Nephropathie ist die AdrenalinKonzentration im Vergleich zu den gesunden Spendern stark verringert, die Konzentration an Normetanephrin und 3-Methoxytyramin hingegen stark erhöht. Die Patienten mit Vaskulitis bzw. hypertensiver Nephropathie zeigen hingegen nur eine signifikante Reduktion der Dopaminkonzentration im Urin. Auffällig ist die signifikant erhöhte Normetanephrinkonzentration bei den Patienten ohne Befund und auch Patienten, bei welchen nur minimale histologische Veränderungen festgestellt werden konnten, zeigen eine erhöhte Konzentration an Normetanephrin. Für Noradrenalin und Serotonin konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen und gesunden Probanden ermittelt werden.

Um zu untersuchen, ob es allgemein zwischen Patienten mit einer Nierenerkrankung und gesunden Probanden Unterschiede in den Konzentrationen der Analyten im Urin gibt, wurde eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. Hierzu wurden noch fünf Patienten mit in die Analyse einbezogen, von denen zwei an einer Amyloidose, zwei an einer tubulointerstitiellen Nephritis und einer an einer postinfektiösen Glomerulonephritis litten. Die Ergebnisse sind in Form einer *Heatmap* in Abbildung 37 dargestellt.

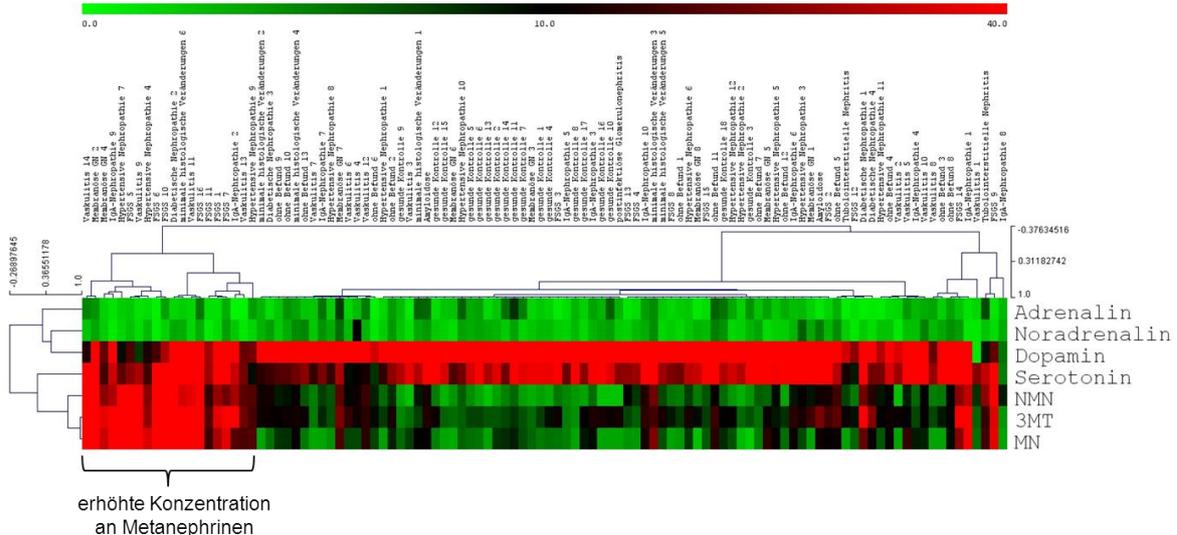


Abbildung 37: Hierarchische Clusteranalyse zur Identifizierung von Analyten mit unterschiedlichen Konzentrationen bei Patienten und gesunden Probanden. Bei den Patienten, bei welchen verschiedene Nierenerkrankungen vorlagen, wurden die Catecholamine Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin sowie Metanephrin, Normetanephrin, 3-Methoxytyramin und Serotonin im Urin mit Hilfe der multiplexen Immunoassays quantifiziert. Die erhaltenen Analytkonzentrationen wurden auf den Kreatiningehalt im Urin referenziert. Anschließend wurde mit den Daten eine hierarchische Clusteranalyse (Pearson Korrelationskoeffizient, vollständige Verknüpfung) durchgeführt, die Ergebnisse sind entsprechend der Farbcodierung dargestellt. Rot bedeutet eine hohe Konzentration des jeweiligen Analyten, grün dagegen eine niedrige Konzentration, in schwarz werden mittlere Konzentrationen dargestellt. Die einzelnen Proben sind senkrecht, die Analyten waagrecht aufgetragen.

Wie in Abbildung 37 zu sehen ist, kann eine Gruppe von Patienten identifiziert werden, die eine starke Erhöhung der Metanephrine aufweist. Dabei handelt es sich um 20 Patienten, bei denen die Konzentration an Metanephrin, Normetanephrin und 3-Methoxytyramin stark erhöht ist. Da die Konzentrationen für Dopamin und Serotonin viel höher sind als für die restlichen Analyten, sind für diese Analyten die meisten Proben rot gefärbt, jedoch kann man hier sehen, dass einige der Patienten mit erhöhter Konzentration an Metanephrinen auch eine Reduktion der Dopaminkonzentration aufweisen. Allerdings gehören diese 20 Patienten verschiedenen Gruppen an, sodass keine Verbindung zwischen einer erhöhten Konzentration an Metanephrinen und einer bestimmten Nierenerkrankung ermittelt werden konnte.

4.10 Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Alpha-Adrenozeptor-Knockout-Mäusen

In Zusammenarbeit mit der Universität in Turku, Finnland wurden in Urinproben von Mäusen mit einem Alpha-Adrenozeptor-Knockout Catecholamine, Metanephrine und Serotonin mit Hilfe der multiplexen Immunoassays quantifiziert. In der Studie der Universität Turku sollte die Rolle von Stress auf die Entwicklung von Fettleibigkeit und Stoffwechselerkrankungen bei Mäusen untersucht werden. Dazu wurden drei Versuchstiergruppen eingesetzt, zwei genmodifizierte Mausstämme und ein Wildtyp-Kontrollstamm. Dabei besitzen die beiden genmodifizierten Stämme einen Adrenozeptor-Knockout. Die erste Gruppe besitzt einen Knockout des Alpha-2A-Adrenozeptors, die zweite Gruppe einen Knockout des Alpha-2A- und des Alpha-2C-Adrenozeptors. Beide Gen-Knockouts führen zu einer erhöhten Aktivität des Sympathikus sowie einer erhöhten Catecholamin-Sekretionsrate. Es wurde im Rahmen der Studie untersucht, ob eine chronisch erhöhte Sympathikusaktivität, ein Zustand, welcher auch durch Stress hervorgerufen wird, diese Mäuse anfälliger für die Entwicklung von Fettleibigkeit macht oder ob genau das Gegenteil der Fall ist und die übermäßige und unkontrollierte Sekretion an Catecholaminen diese vor einer Gewichtszunahme schützt. Dazu wurden alle drei Stämme zunächst mit einer normalen und anschließend über einen Zeitraum von zwei Wochen mit einer fettreichen Kost (45 % Fett) ernährt. Es wurde jeweils vor und nach der Ernährung mit fettreicher Kost der 24 h Urin der Mäuse gesammelt. Um zu untersuchen, ob eine fettreiche Ernährung unterschiedliche Effekte bei den Urinkonzentrationen der Analyten bei den Knockout- und Wildtyp-Mäusen hervorruft, wurden die Proben mit Hilfe des multiplexen Catecholamin- und multiplexen Metanephrin/Serotonin-Assays analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 anhand von Box-Whisker-Plots dargestellt.

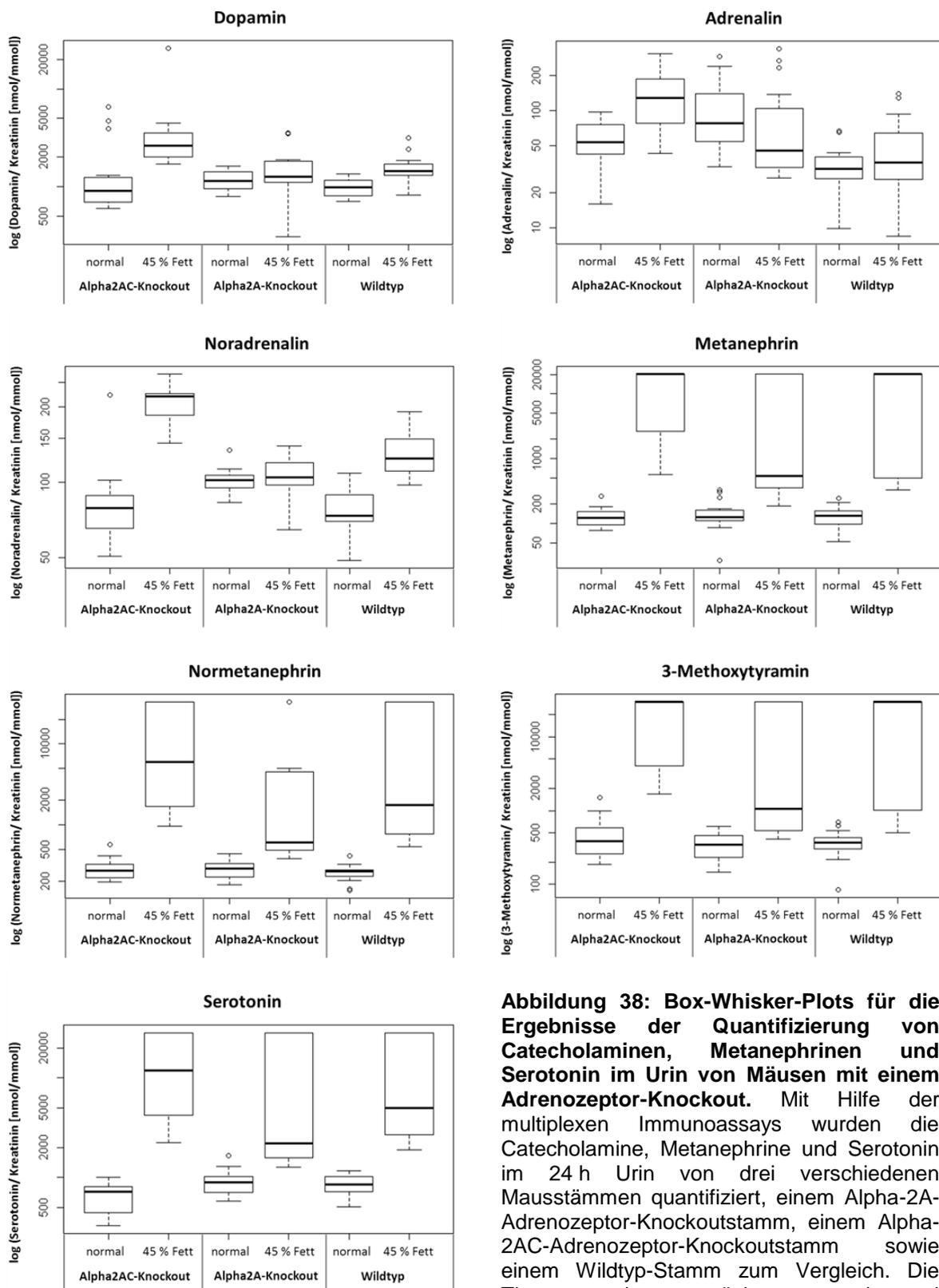


Abbildung 38: Box-Whisker-Plots für die Ergebnisse der Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Mäusen mit einem Adrenozeptor-Knockout. Mit Hilfe der multiplexen Immunoassays wurden die Catecholamine, Metanephrine und Serotonin im 24 h Urin von drei verschiedenen Mausstämmen quantifiziert, einem Alpha-2A-Adrenozeptor-Knockoutstamm, einem Alpha-2AC-Adrenozeptor-Knockoutstamm sowie einem Wildtyp-Stamm zum Vergleich. Die Tiere wurden zunächst normal und anschließend mit einer fettreichen Kost (45 % Fett) ernährt. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe betrug: Alpha-2AC-Knockout: 16 Tiere, Alpha-2A-Knockout und Wildtyp jeweils 18 Tiere.

In Abbildung 38 ist zu sehen, dass sehr deutliche Unterschiede zwischen den Konzentrationen der Analyten im Urin bei normaler Ernährung und bei fettreicher Kost bestehen, sowohl bei den beiden Knockout-Stämmen als auch beim Wildtyp. Vor allem bei dem Doppel-Knockout-Stamm Alpha-2AC sind die Unterschiede sehr deutlich ausgeprägt, hier scheint also eine fettreiche Ernährung besonders starke Auswirkungen auf die Konzentrationen von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin zu haben. Um die statistische Signifikanz dieser Unterschiede zu bestimmen, wurden t-Tests bzw. Wilcoxon-Tests durchgeführt, die berechneten p-Werte sind in Tabelle 40 zusammengefasst. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf 1 % festgesetzt, entsprechend einem p-Wert von 0,01.

Tabelle 40: p-Werte für den Vergleich zwischen normaler und fettreicher Kost für die beiden Adrenozeptor-Knockout-Stämme sowie den Wildtyp-Stamm. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen besteht, wenn $p < 0.01$ ist.

Analyt	p-Werte für den Vergleich zwischen normaler und fettreicher Kost		
	Alpha-2AC-Knockout	Alpha-2A-Knockout	Wildtyp
Dopamin	0,0013	0,16	0,000018
Adrenalin	0,001	0,086	0,4
Noradrenalin	0,0000000016	0,29	0,00000013
Metanephrin	0,0000016	0,0000053	0,00000041
Normetanephrin	0,0000022	0,0000028	0,00000041
3-Methoxytyramin	0,0000016	0,000021	0,0000011
Serotonin	0,0000021	0,0000033	0,00000041

Wie aus Tabelle 40 zu entnehmen ist, ergeben sich für den Alpha-2AC-Knockout-Stamm signifikante Unterschiede für die Konzentrationen aller Analyten im Urin zwischen normaler und fettreicher Ernährung. Dabei sind die Konzentrationen der Analyten bei fettreicher Ernährung stark erhöht. Für den Alpha-2A-Knockout-Stamm ergaben sich nur bei Metanephrin, Normetanephrin, 3-Methoxytyramin und Serotonin signifikante Unterschiede zwischen der Ernährung mit normaler und fettreicher Kost, auch hier sind die Konzentrationen bei fettreicher Ernährung stark erhöht. Für die Catecholamine konnte bei dieser Gruppe hingegen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Dies ist auch anhand der teils großen Überlappungen der Box-Whisker-Plots für die beiden Ernährungsformen bei den Catecholaminen zu sehen. Für den Wildtyp-Stamm konnten signifikante Unterschiede für alle Analyten bis auf Adrenalin ermittelt werden, auch hier bewirkt eine fettreiche Ernährung eine Erhöhung der Analytkonzentrationen.

Um nun zu vergleichen, ob auch zwischen den drei Stämmen signifikante Unterschiede bei den Konzentrationen der Analyten im Urin bestehen, wurden die p-Werte für den Vergleich zwischen den drei Gruppen bei normaler und fettreicher Kost berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 41 dargestellt.

Tabelle 41: p-Werte für den Vergleich zwischen den drei Mausstämmen für die Ernährung mit normaler oder fettreicher Kost. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen besteht, wenn $p < 0.01$ ist.

Analyt	p-Werte für den Vergleich zwischen den drei Mausstämmen					
	Alpha-2AC-Knockout vs. Wildtyp		Alpha-2A-Knockout vs. Wildtyp		Alpha-2AC-Knockout vs. Alpha-2A-Knockout	
	normal	45 % Fett	normal	45 % Fett	normal	45 % Fett
Dopamin	0,65	0,000086	0,015	0,48	0,31	0,00067
Adrenalin	0,0016	0,00069	0,0000016	0,18	0,036	0,021
Noradrenalin	0,77	0,0000012	0,000045	0,0058	0,16	0,000000018
Metanephrin	0,85	0,13	0,89	0,34	0,53	0,022
Normetanephrin	0,37	0,48	0,2	0,049	0,82	0,022
3-Methoxytyramin	0,77	0,23	0,64	0,16	0,17	0,012
Serotonin	0,013	0,58	0,25	0,072	0,0023	0,056

Aus Tabelle 41 ist zu entnehmen, dass es auch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Mausstämmen gibt. Somit besteht bei normaler Ernährung nur für die Konzentration von Adrenalin ein signifikanter Unterschied zwischen Alpha-2AC-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen. Vergleicht man die beiden Gruppen jedoch unter fettreicher Ernährung, ergeben sich signifikante Unterschiede für alle Catecholamine, nicht aber für die Metanephrine und Serotonin. Dabei haben die Alpha-2AC-Knockout-Tiere jeweils eine wesentlich höhere Konzentration der Analyten im Urin als die Wildtyp-Tiere. Zwischen den Alpha-2A-Knockout-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen gibt es bei normaler Kost signifikante Unterschiede in der Urinkonzentration von Adrenalin und Noradrenalin, bei fettreicher Kost jedoch nur noch bei Noradrenalin. Dabei haben bei normaler Ernährung die Alpha-2A-Knockout-Tiere eine höhere Adrenalin- bzw. Noradrenalin-Konzentration als die Wildtyp-Tiere, bei fettreicher Ernährung werden jedoch für die Wildtyp-Mäuse höhere Noradrenalin-Konzentrationen gemessen als für die Knockout-Mäuse. Schließlich besteht bei normaler Ernährung nur bei der Serotoninkonzentration ein Unterschied zwischen den beiden Knockout-Gruppen, hier haben die Alpha-2A-Knockout-Tiere einen etwas höheren Serotoninspiegel. Bei fettreicher Kost dagegen besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen für die Dopamin- und Noradrenalin-Konzentration im Urin.

Dabei haben die Alpha-2AC-Knockout-Mäuse einen höheren Analytspiegel im Urin als die Alpha-2A-Knockout-Tiere.

5. Diskussion

Biogene Amine übernehmen viele verschiedene Aufgaben im Körper. Sie regulieren als Hormone und Neurotransmitter wichtige Funktionen im Nervensystem und an Zielorganen, sie dienen als Bausteine verschiedener Makromoleküle und sind an vielen Stoffwechselprozessen, bei der Zellproliferation sowie bei der Genregulation beteiligt. Aufgrund ihrer vielfältigen Wirkungen im Körper stehen biogene Amine auch im Zusammenhang mit zahlreichen Erkrankungen. So spielen sie sowohl bei Erkrankungen des Nervensystems als auch bei Tumorerkrankungen und bei Stoffwechselerkrankungen eine Rolle. Zu den wichtigsten, mit biogenen Aminen assoziierten Erkrankungen des Nervensystems gehören Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Schizophrenie und Depressionen. Bei den Tumorerkrankungen ist das Phäochromozytom das wohl bekannteste Beispiel für einen Tumor, der mit einer Veränderung der Konzentration von biogenen Aminen einhergeht.

Eine große Rolle bei diesen Erkrankungen spielen vor allem die biogenen Amine aus der Gruppe der Catecholamine und Metanephriene. Catecholamine, zu denen Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin zählen, wirken als Hormone oder Neurotransmitter. Die Metanephriene, die Abbauprodukte der Catecholamine, haben hingegen keine oder nur wenige physiologische Wirkungen, dienen aber als Indikator für den Catecholamin-Stoffwechsel. Viele der oben beschriebenen Erkrankungen hängen dabei auch mit einer Veränderung der Konzentration an Catecholaminen und Metanephrienen zusammen. Bei Phäochromozytomen ist die Konzentration an Adrenalin, Noradrenalin oder Dopamin sowie die Konzentration der Metanephriene im Plasma und im Urin stark erhöht [31]. Auch beim Neuroblastom treten erhöhte Konzentrationen an Catecholaminen und ihren Metaboliten im Blut und im Urin auf [36]. Bei Morbus Parkinson kommt es zur Degeneration von Dopaminneuronen, hier könnte eine Therapiekontrolle durch Bestimmung von Dopamin und seinen Metaboliten im Urin erfolgen [45]. Ebenso kommt es bei Morbus Alzheimer zu einem Verlust von cholinergen und noradrenergen Neuronen [49, 52] und damit auch zu Veränderungen der Konzentrationen von Catecholaminen im Plasma, in der Zerebrospinalflüssigkeit und im Urin der Patienten [55, 56]. Des Weiteren spielt auch Serotonin eine wichtige Rolle bei der Diagnose und Erforschung von Erkrankungen, beispielsweise sekretieren neuroendokrine Tumoren unter anderem Serotonin [81] und sowohl bei Depressionen [87] als auch bei Migräne [92] spielt Serotonin eine wichtige Rolle.

Daher gibt es eine große Nachfrage nach Methoden, mit denen die Veränderungen in der Konzentration von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin qualitativ und quantitativ erfasst werden können. Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer sowie Tumorerkrankungen kommen aufgrund der ständig älter werdenden Gesellschaft immer häufiger vor und erfordern schnelle, zuverlässige und kostengünstige Methoden sowohl für die Diagnose als auch für die Therapiekontrolle. Aber auch bei der Suche nach Biomarkern für Erkrankungen, bei denen die Entstehung noch nicht vollständig geklärt ist und die Diagnosestellung bisher nur auf der Erhebung der Anamnese sowie der Beurteilung der Symptome basiert, z.B. bei Schizophrenie und Depressionen, sind solche Methoden für die Quantifizierung von biogenen Aminen ein hilfreiches und gefragtes Werkzeug. Nicht zuletzt steht in vielen Routinelaboratorien die Quantifizierung verschiedenster biogener Amine auf der Tagesordnung und erfordert schnelle, kostengünstige aber auch präzise Methoden.

Für die Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin in humanen Flüssigkeiten stehen derzeit verschiedene Methoden zur Verfügung. Diese sind zum einen immunologische Nachweisverfahren wie ELISAs oder Radioimmunoassays, und zum anderen chromatographische Nachweisverfahren wie die HPLC mit anschließender elektrochemischer Detektion oder Detektion mittels Massenspektrometrie [112, 135]. Jedoch bieten beide Verfahren Vor- und Nachteile. So liegt der Vorteil der immunologischen Verfahren in der einfachen und kostengünstigen Durchführung, die einen Einsatz in der Routinediagnostik ermöglicht, sie erfordern jedoch auch eine hohe Spezifität der Antikörper und ermöglichen nur den Nachweis von einem Analyten innerhalb eines Tests. Zudem liegt der Nachteil bei Radioimmunoassays in der Verwendung radioaktiv markierter Substanzen. Bei der HPLC hingegen liegt der Vorteil in der sehr guten Sensitivität der Methode, allerdings erfordert sie auch eine sorgfältige Wartung, häufige Reinigung und Erfahrung im Umgang mit dieser Technologie. Zudem sind die hohen Anschaffungskosten, vor allem in Kombination mit der Massenspektrometrie ein klarer Nachteil dieser Methode.

Daher wurden in dieser Arbeit Immunoassays für Catecholamine, Metanephrine und Serotonin entwickelt, die eine multiplexe, einfache, schnelle und präzise Quantifizierung dieser Analyten im Urin ermöglichen. Es handelt sich dabei um *Bead*-basierte Immunoassays, die den Vorteil bieten, dass aus einem geringen Probenvolumen gleichzeitig mehrere verschiedene Parameter bestimmt werden können und eine parallele Bearbeitung einer großen Anzahl an Proben möglich ist. Für die Entwicklung der multiplexen Immunoassays wurden die Analyten in zwei Gruppen zusammengefasst und

in einen 3-plex Immunoassay für Catecholamine sowie einen 4-plex Immunoassay für Metanephrine und Serotonin integriert. Im Anschluss an die Entwicklungsphase wurden diese beiden multiplexen Immunoassays in Anlehnung an die Richtlinien der FDA für die Validierung bioanalytischer Methoden [126] validiert und mit den Ergebnissen aus ELISA-Bestimmungen und HPLC-Messungen verglichen.

Anschließend wurde die Anwendbarkeit der Assays zur Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin in humanem Patientenerin gezeigt. So wurden Catecholamine und Metanephrine im Urin von Patienten mit einem Phäochromozytom quantifiziert. Darüber hinaus wurde ermittelt, ob bei Patienten mit verschiedenen Gedächtnisstörungen eine Veränderung der Konzentration von Catecholaminen, Metanephrinen oder Serotonin im Urin festgestellt werden kann. Zudem wurde bei einer größeren Anzahl an Patienten mit verschiedenen Nierenerkrankungen ermittelt, ob die Patienten eine Veränderung in der Konzentration dieser Analyten im Urin aufweisen und zum anderen wurde gezeigt, dass diese Methode das Potential zur schnellen und einfachen Bearbeitung großer Probenmengen bietet. Zuletzt wurde gezeigt, dass mit dieser Methode Catecholamine, Metanephrine und Serotonin auch im Urin von Mäusen erfolgreich quantifiziert werden können und Unterschiede zwischen verschiedenen Knockout-Stämmen sowie Effekte fettreicher Ernährung auf den Catecholamin-Stoffwechsel der Tiere ermittelt werden können.

Im Folgenden wird nun zunächst auf die Entwicklung und Etablierung der beiden multiplexen Immunoassays eingegangen und anschließend werden die Ergebnisse der Validierung bewertet. Des Weiteren werden der Vergleich zwischen den neu entwickelten multiplexen Immunoassays mit den beiden gängigen Methoden zur Quantifizierung von Catecholaminen und Metanephrinen, dem ELISA und der HPLC, sowie die Ergebnisse aus den Messungen verschiedener Patientenerine diskutiert.

5.1 Machbarkeit nicht-kompetitiver, multiplexer Immunoassays für Catecholamine

Das Ziel in der Entwicklungsphase der Immunoassays für Catecholamine war es, multiplexe Immunoassays in einem Sandwich-Immunoassay-ähnlichen Format, d.h. mit einem immobilisierten Fängerantikörper und einer Detektion über Streptavidin-Phycoerythrin, zu etablieren. Zunächst sollte dabei überprüft werden, inwiefern Immunoassays in diesem Format für sehr kleine Moleküle wie die Catecholamine

überhaupt möglich sind, da sowohl der Antikörper als auch das Streptavidin an das kleine Molekül binden müssen. Um die prinzipielle Realisierbarkeit multiplexer Immunoassays für Catecholamine zu zeigen, wurden daher einige Vorversuche durchgeführt. Hierfür wurden zunächst mittels gegen Kaninchen-IgG gerichteter Antikörper, die auf Mikrosphären immobilisiert wurden, Antikörper aus den Kaninchen-Antiseren herausgefangen. Dabei handelte es sich nicht nur um IgG, die spezifisch gegen modifizierte Metanephrine gerichtet sind, sondern auch um IgG gegen das Trägerprotein BSA sowie gegen jegliches Antigen, mit welchem das Kaninchen bisher in Berührung gekommen war. Jedoch wurde davon ausgegangen, dass eine ausreichende Anzahl an Metanephrin-spezifischen Antikörpern von den dk-a-rb-IgG-AK gefangen wird, um ein Signal im Assay zu erhalten. Die so „immobilisierten“ anti-Metanephrin-spezifischen Antikörper wurden anschließend im Assay eingesetzt.

Zunächst wurde für die Biotinylierung der Catecholamine das Acylierungsreagenz aus dem 3-CAT ELISA der Firma LDN, NHS-Biotin, verwendet. Jedoch konnten hiermit für alle drei Analyten keine Signale erhalten werden. Beim Test weiterer Biotinylierungsreagenzien, die über mehrere Polyethylenglycoleinheiten zwischen der NHS- und der Biotin-Gruppe verfügten, konnten hingegen für alle drei Analyten mit steigender Analytkonzentration steigende Signale erzeugt werden. Die Erklärung hierfür ist im Verhältnis der Dimensionen zwischen Antikörpern, Streptavidin und modifizierten Catecholaminen zu finden. Das NHS-Biotin verfügt über keinen Spacer zwischen der NHS- und der Biotin-Gruppe und weist daher einen Abstand von nur 13,5 Å zwischen den beiden Gruppen auf. Bindet nun der Fängerantikörper, dessen Dimensionen etwa 142 Å x 85 Å x 38 Å betragen [136], an das modifizierte Catecholamin, so kann man davon ausgehen, dass nach Bindung des Catecholamins an der Bindungsstelle des Antikörpers das Biotin-Molekül ebenfalls vom Antikörper umgeben ist und somit das Streptavidin (Dimensionen 54 Å x 58 Å x 48 Å [137]) keinen Zugang mehr zum Biotin-Molekül hat. Verwendet man hingegen ein Biotinylierungsreagenz mit vier oder zwölf Polyethylenglycoleinheiten, so beträgt der Abstand zwischen NHS- und Biotin-Gruppe 29 Å bzw. 56 Å. Die Vorversuche zeigten, dass dieser Abstand ausreichend ist und sowohl der Fängerantikörper als auch das Streptavidin an die modifizierten Catecholamine binden können. Nach Bindung des Antikörpers an das modifizierte Molekül ragt die Biotin-Gruppe durch den beweglichen Spacer weit genug über die Grenzen des Antikörpers hinaus, so dass sie Zugang zur Bindungstasche des Streptavidins erhält. Diese Beobachtungen stimmen auch mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen über die Grenzen von Sandwich-Immunoassays für sehr kleine Moleküle überein [138]. Die besten Ergebnisse wurden für den Spacer mit zwölf

Polyethylenglycoleinheiten erhalten, daher wurde für die Entwicklung der Immunoassays NHS-PEG₁₂-Biotin als Acylierungsreagenz verwendet.

Anschließend wurde mit diesem Versuchsaufbau überprüft, ob der Immunoassay für Catecholamine auch als multiplexer Assay realisierbar ist. Anhand des Ergebnisses für Noradrenalin, bei dem eine perfekte Übereinstimmung zwischen den im singleplexen und im multiplexen Assay erhaltenen Signale erzielt werden konnte, konnte die Realisierbarkeit eines multiplexen Assays demonstriert werden. Allerdings war die Übereinstimmung zwischen singleplexem und multiplexem Assay bei Dopamin und Adrenalin nicht ganz so gut wie bei Noradrenalin, was auf eine Kreuzreaktivität der Antikörper mit einem der anderen beiden Analyten hinweist. Da es sich hierbei jedoch um nicht aufgereinigte Antikörper handelte, kann durch Aufreinigung des spezifischen Antikörpers das Ergebnis verbessert und die Kreuzreaktivität eventuell vollständig eliminiert werden.

Anhand dieser Vorversuche konnte demonstriert werden, dass multiplexe Assays in einem Sandwich-Immunoassay-ähnlichen Format für Catecholamine prinzipiell realisierbar sind. Die Ergebnisse von Kubota et al., die vor Kurzem die Entwicklung eines ELISAs für L-Phenylalanin in einem ähnlichen Format wie die hier entwickelten multiplexen Assays beschrieben, zeigten ebenfalls, dass das Sandwich-Immunoassay-ähnliche Format zur Quantifizierung sehr kleiner Moleküle geeignet ist [139].

5.2 Aufreinigung von Antikörpern aus den Kaninchen-Antiseren

Für die Immobilisierung der Metanephrin-spezifischen Antikörper auf den Mikrosphären ist es notwendig, dass die Antikörper in ausreichender Reinheit vorliegen, da sonstige Bestandteile des Antiserums wie z.B. Serumproteine, die ebenfalls NH₂-Gruppen besitzen, durch die Aktivesterchemie auch kovalent an die Mikrosphären gebunden werden. Ausreichend rein bedeutet hierbei, dass im günstigsten Fall nur der gegen das jeweilige Antigen gerichtete spezifische Antikörper in Lösung vorliegt, oder aber nur geringe Verunreinigungen mit Serumproteinen vorhanden sind, die bei der Immobilisierung und späteren Verwendung im Immunoassay keine Störungen hervorrufen.

Für die Immunisierung der Kaninchen wurde BSA als Trägerprotein verwendet, da die Metanephrine zu klein sind, um selbst eine Immunantwort im Tier auszulösen. Für die Bildung von Antikörpern gegen die Metanephrine ist dabei das Vorhandensein der Methylgruppe an der 3'-OH-Gruppe sowie die über die Amingruppe erfolgende kovalente Bindung an das Trägerprotein über einen Linker erforderlich. Auf diese Weise wird ein

ausreichend großes und modifiziertes Antigen geschaffen, welches vom Immunsystem als fremd erkannt wird. Zusätzlich wird durch die Modifikation an der 3'-OH-Gruppe sowie an der NH₂-Gruppe vermieden, dass sich die gebildeten Antikörper auch gegen die körpereigenen Catecholamine des Tieres richten, was zu schweren Komplikationen bei den Tieren führen würde. Allerdings werden durch die Verwendung von BSA als Trägerprotein auch Antikörper gegen BSA in großen Mengen produziert, sodass ein Großteil der Antikörper im Kaninchen-Antiserum gegen BSA und nicht gegen das jeweilige gewünschte Antigen gerichtet ist.

Für die Aufreinigung der spezifischen Antikörper wurde daher das Verfahren der Affinitätschromatographie mit Hilfe des jeweiligen Antigens gewählt. Jedoch war für alle Antiseren außer dem 3-Methoxytyramin-Antiserum die einstufige Affinitätsaufreinigung über das jeweilige Antigen nicht ausreichend, es waren starke Verunreinigungen mit Serumalbumin sowie anderen Proteinen auf dem SDS-Gel sichtbar und die Antikörper zeigten Kreuzreaktivitäten oder einen hohen Hintergrund im Assay. Daher waren für diese Antiseren zusätzliche Aufreinigungsschritte erforderlich, um Antikörper in ausreichender Reinheit und mit guter Spezifität zu erhalten. Mit maximal zwei Aufreinigungsschritten konnten dann für alle vier Analyten jeweils spezifische Antikörper in ausreichender Reinheit gewonnen werden.

Da im *batch*-Verfahren pro Ansatz nur 1,35 mL Antiserum aufgereinigt werden konnten, erfolgte die Aufreinigung der spezifischen Antikörper aus den Antiseren in mehreren Chargen. Obwohl die Aufreinigung bei jeder Charge nach exakt demselben Protokoll erfolgte, ergaben sich große Charge-abhängige Unterschiede in Bezug auf Ausbeute, Reinheit sowie Kreuzreaktivität der aufgereinigten Antikörper. Sehr deutlich zeigte sich dieser Effekt bei der Aufreinigung des Normetanephrin-Antiserums, bei welchem die Kreuzreaktivität zu Adrenalin bei einer der Chargen etwa 10 % betrug, bei einer anderen Charge hingegen nur 0,14 %.

Die Ausbeute bei der Affinitätsaufreinigung der Antikörper war im Allgemeinen sehr gering. Dies lag zum einen an der zweistufigen Aufreinigung, wobei jeder Aufreinigungsschritt auch mit einem Verlust an Antikörper einhergeht, und zum anderen an der unvollständigen Elution der gebundenen Antikörper von ihren Antigenen auf dem Sepharose-Material. Da die Antikörper selbst unter sehr harschen Bedingungen nicht vollständig eluiert werden konnten, scheint die Affinität der Antikörper für ihr Antigen sehr hoch zu sein. Es konnte jedoch für jeden Analyten eine ausreichende Menge an spezifischem Antikörper in ausreichender Reinheit gewonnen werden, so dass eine Immobilisierung auf Mikrosphären möglich war. Jedoch wird künftig der Einsatz monoklonaler Fängerantikörper angestrebt, um die Problematik der unterschiedlichen Chargen und der fehlenden Spezifität zu umgehen. Durch die unlimitierte Verfügbarkeit

der einmal charakterisierten und validierten spezifischen monoklonalen Antikörper ist damit auch eine gleichbleibende Qualität der Assays gewährleistet.

5.3 Entwicklung der multiplexen Immunoassays

Bei der Entwicklung von Immunoassays gilt es, verschiedene Parameter so zu optimieren, dass ein möglichst präziser und sensitiver Assay entsteht. Dabei werden sowohl geeignete Antikörper als auch Reagenzien ermittelt und auf den Assay abgestimmt. Ebenso werden Inkubationszeiten, Konzentrationen und Abläufe im Protokoll optimiert. In der hier vorliegenden Arbeit wurden affinitätsaufgereinigte polyklonale Antikörper aus Kaninchen-Antiseren eingesetzt. Nach Immobilisierung auf Mikrosphären wurden diese im singleplexen und multiplexen Assay getestet und anhand des Verlaufs der Standardkurve, der Signalintensität, des Hintergrundsignals sowie der Kreuzreaktivität beurteilt, welcher Antikörper für den Einsatz im Assay am geeignetsten ist. Dabei konnten für alle vier Analyten geeignete Antikörper identifiziert werden, die sowohl hohe Signale bei niedrigen Hintergrundsignalen sowie keine Kreuzreaktivität zu den anderen Analyten aufwiesen. Es zeigte sich jedoch auch, dass nicht jede Immunisierung zu einem brauchbaren Antikörper führt. Zum einen konnten aus den 10 Immunisierungen pro Analyt nur jeweils 3 bis 4 Antiseren mit einem ausreichend hohen Titer und einer guten und spezifischen Reaktivität gegenüber dem jeweiligen Antigen gewonnen werden. Dies liegt hauptsächlich an der sehr geringen Größe der Antigene sowie ihrer strukturellen Ähnlichkeit. Zum anderen konnte mit manchen Antikörpern kein stabiler Assayverlauf und keine ausreichend hohen Signalintensitäten im Assay erzielt werden. Dies könnte zum einen durch die harschen Elutionsbedingungen verursacht werden, die eventuell bei einigen Antikörpern zu einer mehr oder weniger starken Denaturierung führen und zum anderen durch eine geringe Affinität der Antikörper zu ihrem Antigen.

Bei der Auswahl geeigneter Reagenzien wurde zwischen dem Probenvorbereitungsprozess und dem eigentlichen multiplexen Assay unterschieden. Da der Probenvorbereitungsprozess aus den kompetitiven ELISAs der Firma LDN übernommen wurde und bereits etabliert und optimiert ist, wurden hier nur das Acylierungsreagenz ausgetauscht und die Inkubationszeiten angepasst. Für den multiplexen Assay hingegen konnte eine Optimierung des Puffer- sowie Detektionssystems erfolgen.

Im Zuge der Vorversuche wurde bereits ein geeignetes Acylierungsreagenz ermittelt, welches sich später im etablierten Assay ebenfalls als das geeignetste Acylierungsreagenz erwies. Die Verwendung eines Acylierungsreagenzes mit zwei Biotin-

Molekülen zur Steigerung der Signalintensitäten führte nicht zum erhofften Erfolg, im Adrenalin(Metanephrin)-Assay zeigte sich sogar ein gegenteiliger Effekt. Hier führte die Verwendung des Acylierungsreagenzes mit zwei Biotin-Molekülen zu einer starken Reduktion der Signalintensitäten. Die Reduktion des Signals ist sehr wahrscheinlich dadurch bedingt, dass es sich bei Adrenalin/Metanephrin um eine sekundäre Amingruppe handelt, welche acyliert wird. Es konnte bereits bei den anderen Acylierungsreagenzien beobachtet werden, dass Adrenalin/Metanephrin weniger stark und langsamer acyliert wird, als die Analyten mit einer primären Amingruppe. Durch die Größe des „Doppel-Biotin“-Reagenzes und der folglich langsameren Kinetik könnte dieser Effekt nun noch verstärkt werden und zu der Reduktion des Signals im Adrenalin(Metanephrin)-Assay führen. Daher wurde das Acylierungsreagenz NHS-PEG₁₂-Biotin als das geeignetste Reagenz weiterhin in der Entwicklung und Validierung der multiplexen Assays verwendet. Anschließend wurde ermittelt, ob eine Reduktion der Menge an eingesetztem Acylierungsreagenz möglich ist, da es sich bei diesem Reagenz um einen sehr kostenintensiven Faktor handelt. Jedoch führte die Reduktion der Menge an Acylierungsreagenz wiederum vor allem bei Adrenalin/Metanephrin zu einer starken Reduktion der ohnehin schon niedrigen Signalintensitäten. Zwar wird das Acylierungsreagenz in großen Mengen eingesetzt, jedoch werden die primären Amine bevorzugt acyliert und es erfolgt ebenfalls eine Hydrolyse des Reagenzes in der wässrigen Reaktionslösung. Beide Faktoren führen dazu, dass Adrenalin/Metanephrin bei Reduktion der Menge an Acylierungsreagenz noch weniger acyliert wird und somit nur geringe Signalintensitäten erhalten werden. Daher war eine Reduktion der Menge an Acylierungsreagenz nicht möglich.

Als weitere Möglichkeit der Optimierung der Probenvorbereitung wurde die Auswirkung verschiedener Inkubationszeiten für die Acylierung und enzymatische Umwandlung auf den Catecholamin-Assay untersucht. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass eine Veränderung der Inkubationszeiten nur zu geringen Änderungen in den Signalintensitäten führte. Allgemein konnte durch eine Erhöhung der Acylierungsdauer von 15 min auf 30 min eine Steigerung der Signalintensitäten erreicht werden, eine weitere Erhöhung auf 1 h brachte jedoch keinen weiteren Anstieg. Eine Erhöhung der Inkubationszeit für die enzymatische Umwandlung von 30 min auf 1 h sowie von 1 h auf 2 h führte in beiden Fällen zu einer Steigerung der Signale. Der Versuch zeigte jedoch ebenfalls, dass die im ELISA verwendete Kombination aus 15 min Acylierung und 30 min enzymatischer Umwandlung mitunter das schlechteste Ergebnis lieferte. Daher wurde als Kompromiss eine Acylierungsdauer von 30 min gewählt, bei welcher auch mit dem von der Kinetik her etwas langsameren NHS-PEG₁₂-Biotin die Catecholamine ausreichend acyliert werden

können, sowie eine Inkubationszeit von 1 h für die enzymatische Umwandlung, die eine Steigerung der Signale bei einem akzeptablen zeitlichen Mehraufwand erlaubt.

Im Anschluss an die Optimierung der Bedingungen für die Probenvorbereitung wurden die Bedingungen für den multiplexen Immunoassay angepasst. Da im standardmäßig verwendeten Assaypuffer Blocking Reagent for ELISA/ 0,05 % Tween 20 zum Teil Kreuzreaktivitäten auftraten, wurde versucht, mittels eines kommerziell erhältlichen Puffers zur Reduktion von Kreuzreaktivitäten und unspezifischen Bindungen diese zu eliminieren. Allerdings konnte die Kreuzreaktivität, welche hauptsächlich einige Chargen des Normetanephrin-Antikörpers betraf, mit Hilfe dieses Puffers nicht reduziert werden. Zudem hatte dieser Puffer den nachteiligen Effekt, dass er im Normetanephrin-Assay zu einer starken Reduktion der Signalintensitäten führte. Ebenso erwies sich der in den Vorversuchen verwendete Puffer PBS/0,5 % BSA/0,05 % Tween 20 als ungeeignet. Das in diesem Puffer enthaltene BSA könnte Störungen hervorrufen, da für die Immunisierung BSA als Trägerprotein verwendet wurde und sich somit auch Antikörper gegen BSA, die bei der Aufreinigung nicht vollständig entfernt wurden, auf den Mikrosphären befinden. Zwar sollte im Probenextrakt des Catecholamin-Assays bzw. in den acylierten Proben für den Metanephrin/Serotonin-Assay, die im multiplexen Assay eingesetzt werden, kein acyliertes BSA vorhanden sein, welches dann später ein falsches Signal im Assay erzeugen könnte. Jedoch könnte das BSA im Puffer, welches dann an seine α -BSA-Antikörper auf den Mikrosphären bindet, den modifizierten Catecholaminen den Zugang zu ihren Antikörpern blockieren. Da mit dem Blocking Reagent for ELISA/ 0,05 % Tween 20 gute Signalintensitäten bei geringem Hintergrundsignal und nur geringen Kreuzreaktivitäten erhalten wurden, wurde dieser als Assaypuffer im multiplexen Immunoassay verwendet.

Für die Detektion der biotinylierten Analyten wurde mit Phycoerythrin markiertes Streptavidin verwendet. Hierbei konnte beobachtet werden, dass je nach Hersteller das Hintergrundsignal unterschiedlich hoch war. Daher wurde ermittelt, mit welchem Streptavidin nur sehr niedrige Hintergrundsignale erhalten werden, die Signalintensitäten der Standardkurven aber hoch bleiben. Es konnte aus 9 Kandidaten ein geeignetes Streptavidin-Phycoerythrin der Firma Prozyme (PJRS50) ermittelt werden, das für alle Analyten ein geringes Hintergrundsignal und ausreichend hohe Signalintensitäten im Assay lieferte. Woher die hohen Hintergrundsignale bei einigen der anderen Streptavidine kamen ist unklar. Es handelt sich bei allen Herstellern um Streptavidin-R-Phycoerythrin. Jedoch unterscheiden sich diese sehr wahrscheinlich zum einen in ihrem Verhältnis zwischen Streptavidin- und Phycoerythrin-Molekülen und zum anderen ist anzunehmen, dass sie in Puffern mit unterschiedlicher Zusammensetzung vorliegen. Diese Faktoren können in unterschiedlichem Ausmaß dazu führen, dass beispielsweise durch eine

unspezifische Adsorption des Streptavidins an die Mikrosphären oder Antikörper unterschiedlich hohe Hintergrundsignale entstehen.

Im Metanephrin/Serotonin-Assay blieb jedoch auch nach der Identifizierung eines geeigneten Streptavidin-Phycoerythrins das Hintergrundsignal ungewöhnlich hoch. Dies war bedingt durch die Tatsache, dass nach der Acylierung der Metanephriene und des Serotonins kein Waschschrift erfolgte und nach dieser Zeit noch aktives NHS-PEG₁₂-Biotin vorhanden war. Dieses acylierte nach der Zugabe der Mikrosphären auch die darauf immobilisierten Antikörper, sodass das Streptavidin-Phycoerythrin direkt an die Antikörper binden konnte. Dadurch wurde ein von der Analytkonzentration unabhängiges, hohes Signal im Assay erzeugt. Durch Zugabe von Ethanolamin, welches ebenfalls eine NH₂-Gruppe besitzt, konnte vor der Zugabe der Mikrosphären das überschüssige aktive NHS-PEG₁₂-Biotin deaktiviert und somit das Hintergrundsignal stark verringert werden.

In Tabelle 42 sind die in der Entwicklungsphase ermittelten finalen, optimalen Parameter für den Catecholamin-Assay und den Metanephrin/Serotonin-Assay zusammengefasst.

Tabelle 42: Finale Parameter für den multiplexen Catecholamin- und Metanephrin/Serotonin-Immunoassay.

Parameter	Catecholamin- Assay	Metanephrin/Serotonin- Assay
Antikörper	α -3-Methoxytyramin-AK Nr. 3 α -Metanephrin-AK Nr. 7 α -Normetanephrin-AK Nr. 8	α -3-Methoxytyramin-AK Nr. 3 α -Metanephrin-AK Nr. 7 α -Normetanephrin-AK Nr. 8 α -Serotonin-AK Nr. 10
Kopplungskonzentration	50 μ g/mL für alle AK	50 μ g/mL für alle AK
Acylierungsreagenz	NHS-PEG ₁₂ -Biotin	NHS-PEG ₁₂ -Biotin
Konzentration des Acylierungsreagenzes	50 mg/mL in DMSO	50 mg/mL in DMSO
Inkubationszeiten	Acylierung: 30 min enzymatische Umwandlung: 1 h	Acylierung: 15 min
Puffersystem	Blocking Reagent for ELISA/ 0,05 % Tween 20	Blocking Reagent for ELISA/ 0,05 % Tween 20
Streptavidin-Phycoerythrin	PJRS50; 5 μ g/mL	PJRS50; 5 μ g/mL
Abstoppen der Acylierung	-	300 mM Ethanolamin; 30 min

Nach Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Probenvorbereitung sowie den multiplexen Catecholamin- und Metanephrin/Serotonin-Immunoassay wurden diese validiert und anschließend für die Quantifizierung der Analyten im Urin eingesetzt.

5.4 Probenmaterial

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, gibt es zahlreiche Erkrankungen, die mit einer Veränderung der Konzentration von Catecholaminen, Metanephrinen oder Serotonin in verschiedenen Körperflüssigkeiten, hauptsächlich Plasma, Urin und Zerebrospinalflüssigkeit einhergehen. Bei der Auswahl eines geeigneten Probenmaterials für die Quantifizierung dieser Analyten müssen verschiedene Punkte beachtet werden.

Zum einen sollte das Probenmaterial leicht zugänglich sein, um einen Einsatz der Assays in der Routinediagnostik zu ermöglichen. Dies bedeutet, dass die Zerebrospinalflüssigkeit, zu deren Entnahme invasive Verfahren notwendig sind, ein schwieriges Probenmaterial für die routinemäßige Anwendung der Assays darstellt, wenngleich eine Quantifizierung der Analyten in Zerebrospinalflüssigkeit mit Hilfe der multiplexen Assays bei speziellen medizinischen Fragestellungen sowie bei Fragestellungen in der Forschung denkbar wäre. Zum anderen sollte das Probenmaterial in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen. Zwar werden für die multiplexen Assays nur geringe Mengen an Probenmaterial benötigt, jedoch sollte sichergestellt werden, dass mit einer Entnahme ausreichend Probenmaterial für alle notwendigen Analysen gewonnen werden kann, um den Patienten nicht mehrfach zu belasten. Des Weiteren sollte überprüft werden, in welchen Konzentrationen die Analyten im jeweiligen Probenmaterial vorkommen und ob der Assay in diesem Bereich zuverlässig quantifizieren kann. Darüber hinaus besteht vor allem bei den Catecholaminen und Metanephrinen Uneinigkeit darüber, ob die Quantifizierung von Catecholaminen oder von Metanephrinen, im Plasma oder im Urin für die Diagnose von Krankheiten sensitiver und spezifischer ist. Beim Phäochromozytom soll beispielsweise die Quantifizierung von freien Metanephrinen im Plasma sehr sensitiv und spezifisch sein, ebenso die Quantifizierung von Normetanephrin und Metanephrin im Urin, welche zwar sehr sensitiv aber nicht so spezifisch wie die Quantifizierung im Plasma ist [34] (siehe Tabelle 2). Dagegen ist die Sensitivität der Bestimmung von Catecholaminen im Plasma und im Urin wesentlich geringer. Die Autoren erklären die höhere Sensitivität der Quantifizierung von Metanephrinen im Vergleich zur Quantifizierung von Catecholaminen damit, dass die Catecholamine, die aus den chromaffinen Zellen im Tumor unkontrolliert freigesetzt werden, fortlaufend zu Metanephrinen metabolisiert werden, die dann meist als Konjugate über den Urin ausgeschieden werden. Dabei ist die Produktion der Metanephrine weniger starken Schwankungen ausgesetzt als die sehr unterschiedlich hohe Freisetzungsraten an Catecholaminen aus den Tumoren.

Grundsätzlich eignen sich demzufolge sowohl Plasma als auch Urin als Probenmaterial für die multiplexen Immunoassays. Zwar ist die Entnahme von Plasma ebenfalls ein invasives Verfahren, das jedoch routinemäßig durchgeführt wird und eine hohe Akzeptanz bei den Patienten besitzt. Die Gewinnung von Urin ist hingegen nichtinvasiv und sowohl Urin als auch Plasma können in ausreichenden Mengen gewonnen werden.

Die Konzentrationen der Analyten sind im Plasma wesentlich geringer als im Urin. Dies wird in den ELISAs der Firma LDN durch den Einsatz großer Volumina an Plasma gelöst. Gegenüber 10 µL Standard werden 300 µL Plasma für die Extraktion eingesetzt und somit die Konzentration der Analyten im Plasma künstlich um den Faktor 30 erhöht und dadurch in den dynamischen Bereich der Assays verschoben.

Die Konzentrationen der Analyten im Plasma und im Urin bei gesunden Personen sind in Tabelle 43 dargestellt.

Tabelle 43: Konzentration der Catecholamine, Metanephriene und Serotonin im Plasma und im Urin von gesunden Personen.

Analyten	Konzentration im Plasma*	Quelle	Konzentration im Urin	Quelle	Konzentration im Urin in ng/mL [▲]
Dopamin	< 58 pg/mL	[140]	< 3194 nmol/24 h	[141]	< 245-489
Adrenalin	< 92 pg/mL	[100]	< 144 nmol/24 h	[141]	< 13-26
Noradrenalin	< 490 pg/mL	[100]	< 560 nmol/24 h	[141]	< 47-95
Metanephrin	< 60 pg/mL	[100]	< 1200 nmol/24 h	[100]	< 118-237
Normetanephrin	< 110 pg/mL	[100]	< 3000 nmol/24 h	[100]	< 275-549
3-Methoxytyramin	< 15 pg/mL	[140]	< 2750 nmol/24 h	[142]	< 230-460
Serotonin	101-283 ng/mL	[143]	< 1187 nmol/24 h	[144]	< 105-209

* Für Serotonin ist die Konzentration im Serum angegeben.

▲Für die Angabe der Konzentration der Analyten in ng/mL wurden die Referenzwerte in nmol/24 h verwendet und eine Urinmenge von 1-2 L pro 24 h angenommen.

Anhand der Tabelle 43 kann man sehen, dass die im Plasma vorliegenden Konzentrationen an Catecholaminen und Metanephrinen sehr gering sind. Demzufolge liegen die Konzentrationen im Plasma gesunder Personen bei allen Analyten unterhalb des LOD der multiplexen Immunoassays. Durch den Einsatz eines größeren Volumens an Plasma im Vergleich zum Standard, wie es in den ELISAs der Firma LDN der Fall ist, wird die Konzentration der Analyten durch den Probenvorbereitungsprozess künstlich erhöht, sodass sie in den dynamischen Bereich des Assays verschoben wird. Für Serotonin hingegen liegen die Konzentrationen im Serum von gesunden Personen bereits im dynamischen Bereich des Assays.

Nimmt man ein Ausscheidungsvolumen von 1-2 L Urin pro 24 h an, so ergeben sich aus den Referenzwerten in nmol/24 h Richtwerte in ng/mL, anhand derer abgeschätzt werden kann, ob die Konzentrationen der Analyten im Urin gesunder Probanden im dynamischen Bereich der multiplexen Immunoassays liegen. Wie in Tabelle 43 gezeigt, liegen die Konzentrationen aller Analyten im Urin im dynamischen Bereich der Assays. Daher können die multiplexen Immunoassays für die Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin eingesetzt werden, eine künstliche Erhöhung der Analytkonzentration während des Probenvorbereitungsprozesses, wie sie bei Plasmaproben erforderlich ist, ist für Urinproben nicht notwendig. Die Konzentrationen im Urin gesunder Probanden liegen im unteren bis mittleren Bereich der Standardkurven,

sodass auch stark erhöhte Konzentrationen im Urin von Patienten noch im dynamischen Bereich der Assays liegen.

Neben den allgemeinen Anforderungen wie Zugänglichkeit, Verfügbarkeit und Konzentrationsbereich müssen speziell für Catecholamine und Metanephrine weitere Punkte bei der Probenentnahme beachtet werden. Für die Entnahme von Plasma müssen die Patienten zuvor 20 min in liegender Position, am besten mit bereits gelegtem Zugang, verbringen. Dies ist notwendig, um Schwankungen vor allem bei den Catecholaminen durch Anstrengung oder Aufregung, z.B. durch den Einstich der Kanüle, zu vermeiden. Zudem können verschiedene Medikamente und Nahrungsbestandteile zu Interferenzen im Assay führen. Koffeinhaltige Getränke und Medikamente wie Acetaminophen, L-DOPA, trizyklische Antidepressiva, Betablocker und Sympathomimetika können beispielsweise zu Interferenzen bis hin zu falsch-positiven Ergebnissen führen [34]. Daher sollte eine Plasmaentnahme morgens in nüchternem Zustand erfolgen und die Medikation des Patienten beachtet werden.

Auch bei Urin sollte die Entnahme am besten morgens oder zu einer festgelegten Zeit erfolgen und eine Volumenkorrektur durchgeführt werden, um eine unvollständige Sammlung oder übermäßige Produktion von Urin auszugleichen. Dies kann beispielsweise durch die zusätzliche Bestimmung von Kreatinin im Urin erfolgen, da die Ausscheidung von Kreatinin im Urin mit einer relativ konstanten Rate erfolgt, die jedoch alters- und geschlechtsabhängig ist. Sie liegt bei 723 mg/L bei Frauen und 975 mg/L bei Männern (ohne Berücksichtigung des Alters) [145]. Für die Bestimmung von Kreatinin im Urin stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, darunter die Jaffé-Methode sowie enzymatische Assays. In dieser Arbeit wurde die Methode nach Jaffé gewählt, da Catecholamine, vor allem Dopamin, zu Störungen in den enzymatischen Assays führen und hier falsch niedrige Ergebnisse erzeugen, während dies bei der Jaffé-Methode nicht der Fall ist [146]. Jedoch liegt der Nachteil bei der Jaffé-Methode in der geringen Sensitivität sowie der Störanfälligkeit durch Interferenzen anderer Substanzen.

Da sich nun prinzipiell sowohl Plasma bzw. Serum als auch Urin als Probenmaterial für die multiplexen Immunoassays eignen, wurde versucht, die Probenvorbereitung sowie die multiplexen Immunoassays für beide Probenarten zu optimieren. Die Quantifizierung der Catecholamine, Metanephrine und von Serotonin im Urin mit Hilfe der multiplexen Immunoassays konnte erfolgreich durchgeführt werden. Bei der Quantifizierung im Plasma bzw. Serum traten jedoch erhebliche Schwierigkeiten auf. Es wurden hier, unabhängig von der im Plasma bzw. Serum enthaltenen Catecholamin-, Metanephrin- bzw. Serotoninmenge, sehr hohe Signalintensitäten erhalten, die eine Quantifizierung der Analyten unmöglich machten. Diese hohen Signalintensitäten wurden sehr wahrscheinlich durch unspezifische Bindung der Antikörper an andere Plasma- bzw. Serumbestandteile

verursacht. Zwar sollten während des Extraktionsprozesses im Catecholamin-Assay diese Bestandteile größtenteils aus der Probe entfernt werden, da jedoch eine Extraktion von Strukturen mit *cis*-diol-Gruppen erfolgt, werden nicht nur Catecholamine sondern auch Nucleoside bzw. Nucleotide und andere zuckerhaltige Moleküle, wie glycosylierte Proteine, extrahiert. Diese werden nach dem Extraktionsprozess ebenfalls eluiert und können so im multiplexen Immunoassay Störungen hervorrufen. Da bei den Metanephrinen und Serotonin zuvor keine Extraktion durchgeführt wird, ist hier der Effekt von sehr hohen unspezifischen Signalen noch stärker zu sehen. Es wurde daher versucht, durch verschiedene weitere Probenaufbereitungsschritte Proteine aus dem Plasma bzw. Serum weitestgehend zu entfernen. Es wurden beispielsweise eine Proteinfällung mit Sulfosalicylsäure oder Trichloressigsäure und Aceton durchgeführt, stärkere Waschpuffer getestet sowie eine weitere Extraktion mit Iosem Boronat-Affinitätsgel der eigentlichen Extraktion vorgeschaltet (Daten nicht gezeigt). Dies führte jedoch nicht zum gewünschten Erfolg, sodass auf die Entwicklung der multiplexen Immunoassays für die Quantifizierung der Analyten im Urin fokussiert wurde. Da im Urin keine störenden Proteine enthalten sind, traten hier während der Entwicklung keine Probleme durch störende Einflüsse anderer Substanzen auf. Es konnte jedoch abschließend nicht geklärt werden, was genau für die Störungen bei der Quantifizierung der Catecholamine, Metanephrine und von Serotonin im Plasma und Serum mit Hilfe der multiplexen Immunoassays verantwortlich ist. Da die ELISAs der Firma LDN sowohl für Urin- als auch für Plasma- und Serumproben anwendbar sind und denselben Probenvorbereitungsprozess verwenden liegt die Vermutung nahe, dass die Probleme durch das Sandwich-Immunoassay-ähnliche Format der multiplexen Assays bzw. durch die verwendeten Antikörper zustande kommen. Dies könnte beispielsweise durch unspezifische Bindung der Antikörper an Proteine oder durch das Vorhandensein von Antikörpern anderer Spezifitäten auf den Mikrosphären durch eine unzureichende Antikörperreinheit bedingt sein. Es wurde auch bereits in der Literatur beschrieben, dass eine Etablierung von Assays zur Quantifizierung von Catecholaminen und Metanephrinen im Plasma wesentlich schwieriger ist als für die Quantifizierung im Urin, da sehr viele Punkte, vor allem beim Sammeln der Proben, beachtet werden müssen und eine hohe Sensitivität und Spezifität sowie Robustheit der Assays hierfür erforderlich ist [147].

Für die Etablierung und Optimierung der Assays zur Quantifizierung der Catecholamine, Metanephrine und von Serotonin in humanem Urin wurden anschließend Qualitätskontrollen sowie Validierungsproben erstellt. Diese sind notwendig um sicher zu stellen, dass die Qualität des Assays über viele Messungen hinweg erhalten bleibt und die Ergebnisse verschiedener Messungen untereinander problemlos verglichen werden

können. Ebenso können anhand von Qualitätskontrollen Fehler oder Probleme bei der Durchführung eines Assays identifiziert werden. Für die Auswahl eines geeigneten Spenderurins zur Herstellung von Qualitätskontrollen und Validierungsproben wurden Urinproben von verschiedenen gesunden Probanden auf ihre Konzentration an Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin untersucht und Spender ausgewählt, bei denen die endogenen Konzentrationen der Analyten sehr niedrig waren. Dieser Urin wurde dann mit verschiedenen Mengen an synthetischen Substanzen *gespikt* um Urinproben herzustellen, deren Konzentrationen über den gesamten Bereich der Standardkurven verteilt waren. Da die Konzentrationen dieser Analyten bei gesunden Spendern nur im unteren bis mittleren Bereich der Standardkurve lagen und bis dahin noch kein Patientenurin mit verschieden hohen bis sehr hohen Konzentrationen an Analyten vorlag, wurden die Qualitäts- und Validierungsproben durch *Spiken* mit synthetisch hergestellten Substanzen erzeugt. Mit Hilfe dieser Proben wurde anschließend die Validierung durchgeführt sowie die Qualität der verschiedenen Messungen der Patientenproben überprüft.

5.5 Validierung der multiplexen Immunoassays

Um die Qualität, Zuverlässigkeit und Eignung der multiplexen Immunoassays für die Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin in humanem Urin zu zeigen, wurde eine Validierung der Assays in Anlehnung an die „*Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*“ der *US Food and Drug Administration* (FDA) [126] durchgeführt. Hierbei wurden ein geeignetes Kalibrierkurvenmodell, die untere Nachweisgrenze, die untere und obere Bestimmungsgrenze, die Wiederfindungsrate, die Intra- und Interassay-Präzision, die Verdünnungslinearität, die Selektivität sowie die Robustheit der Assays und Stabilität der Analyten ermittelt.

Kalibrierkurvenmodell

Als Kalibrierkurvenmodell wurde für alle Analyten ein 5-parametrischer logistischer Kurvenfit mit einer Gewichtung von $1/Y$ gewählt. Die Gewichtung soll dabei die zunehmende Größe der Residuen mit zunehmender Konzentration des Analyten ausgleichen. Anhand der Wiederfindungsraten und des Bestimmtheitsmaßes wurde die Eignung des Kalibrierkurvenmodells überprüft. Diese konnte für alle Analyten bis auf Adrenalin bestätigt werden. Für Adrenalin konnte im unteren Bereich der Standardkurve

kein Kalibrierkurvenmodell ermittelt werden, welches bis zum untersten Standard A/B 1 akzeptable Wiederfindungsraten lieferte. Die Ursache hierfür ist in der fehlenden Sensitivität des Antikörpers zu finden, welcher unterhalb von 1 ng/mL nicht mehr zuverlässig quantifizieren kann, was sich in Variationskoeffizienten von über 20 % und Wiederfindungsraten über 140 % widerspiegelt. Da die beiden unteren Standards A/B 1 und A/B somit unterhalb der unteren Nachweisgrenze liegen, werden sie nicht für die Quantifizierung von Adrenalin im Urin herangezogen. Für Adrenalin wurde daher ebenfalls das 5-parametrische logistische Kalibrierkurvenmodell mit einer Gewichtung von $1/Y$ beibehalten, welches ab Standard B eine gute Kurvenanpassung lieferte.

Grenzen der multiplexen Immunoassays

Die Grenzen der multiplexen Immunoassays definieren den Bereich des Assays, in welchem die Analyten zuverlässig nachgewiesen oder quantifiziert werden können. Hierfür wurden die untere Nachweisgrenze (*Limit of detection, LOD*), die untere Bestimmungsgrenze (*Lower limit of quantification, LLOQ*) und die obere Bestimmungsgrenze (*Upper limit of quantification, ULOQ*) bestimmt, aus denen sich dann der dynamische Bereich der Assays ergibt. Dieser sollte einen Konzentrationsbereich umfassen, in welchem die Analyten in dem zu analysierenden Probenmaterial vorkommen bzw. einen Bereich, in welchem die Analytkonzentration in der Probe durch Verdünnen gebracht werden kann. Wie bereits unter Punkt 5.4 erläutert, ist dies für Urinproben der Fall. Hier liegen die Analytkonzentrationen bei gesunden Personen im dynamischen Bereich der Assays und auch stark erhöhte Analytkonzentrationen, wie sie bei Patienten vorkommen können, fallen noch in den dynamischen Bereich der jeweiligen Assays. Demzufolge eignen sich alle Assays für die Quantifizierung der Analyten im Urin. Dennoch kann es auch vorkommen, dass sehr niedrige Analytkonzentrationen bei gesunden Personen sowie extrem hohe Konzentrationen bei Patienten nicht erfasst werden können. Sehr hohe Konzentrationen können jedoch durch Verdünnen der Probe in den dynamischen Bereich des Assays gebracht werden. Da eine möglichst hohe Sensitivität der Assays angestrebt wurde, die mit der Sensitivität der ELISAs der Firma LDN vergleichbar ist, sind in Tabelle 44 die jeweiligen Grenzen für die multiplexen Immunoassays und die LDN ELISAs gegenübergestellt.

Tabelle 44: Vergleich der Grenzen der multiplexen Immunoassays mit den Grenzen der LDN ELISAs.

Analyt	Parameter	multiplexer Immunoassay [ng/mL]	ELISA LDN [ng/mL]
Dopamin	LOD	2,2	4,5
	LLOQ	2,3	k. A.
	ULOQ	2000	2000
Adrenalin	LOD	1,6	0,3
	LLOQ	1,9	k. A.
	ULOQ	200	200
Noradrenalin	LOD	0,8	1,5
	LLOQ	2,3	k. A.
	ULOQ	4000	1000
Metanephrin	LOD	3,5	13
	LLOQ	11,3	k. A.
	ULOQ	2000	2000
Normetanephrin	LOD	2,3	23
	LLOQ	8,4	k. A.
	ULOQ	3000	3000
3-Methoxytyramin	LOD	0,9	kein ELISA verfügbar
	LLOQ	1,8	
	ULOQ	2500	
Serotonin	LOD	1,6	5
	LLOQ	7,0	k. A.
	ULOQ	10000	2500

Wie Tabelle 44 zu entnehmen ist, besitzen alle multiplexen Immunoassays bis auf den Adrenalin-Assay einen ähnlich großen dynamischen Bereich wie der entsprechende LDN ELISA bei einer leicht höheren Sensitivität (um den Faktor 2-10 sensitiver). Für Adrenalin ist die Sensitivität im ELISA höher als im multiplexen Assay, was, wie bereits erwähnt, an der fehlenden Sensitivität des im multiplexen Assay verwendeten Antikörpers liegt. Hier könnte eine Verbesserung der Sensitivität nur durch Verwendung eines anderen Fängerantikörpers erreicht werden, da durch die im Zuge der Assayoptimierung durchgeführten Anpassungen von Puffersystem, Reagenzkonzentrationen und Inkubationszeiten keine Steigerung der Sensitivität erreicht werden konnte.

Präzision und Wiederfindungsrate

Die Intra- und Interassay-Präzision sowie die Wiederfindungsrate sind wichtige Parameter, die Auskunft über Genauigkeit, Qualität und Zuverlässigkeit eines Assays geben und im Rahmen der Assayvalidierung ermittelt werden. Diese Parameter müssen dabei bestimmte Kriterien erfüllen. Die Intraassay-Präzision sollte einen CV $< 15\%$ aufweisen, die Interassay-Präzision sollte für jede Konzentration einen CV $< 20\%$ aufweisen, für Konzentrationen nahe des LLOQ wird auch ein CV $< 30\%$ akzeptiert. Die Wiederfindungsrate sollte im gesamten Messbereich zwischen 80-120 % liegen bzw. falls sie außerhalb dieses Bereichs liegt, sollte sie konstant sein. Diese Kriterien konnten jedoch nicht bei allen multiplexen Assays erfüllt werden.

Für die Intraassay-Präzision wurden zwar für die gemessenen Fluoreszenzeinheiten immer Variationskoeffizienten $< 15\%$ erhalten, für die zurückgerechneten Konzentrationen jedoch Werte bis 29 %. Diese Differenz kommt dadurch zu Stande, dass durch die Kurvenanpassung und das gewählte Kalibrierkurvenmodell eigentlich eng beieinander liegende Fluoreszenzwerte weit auseinander liegende zurückgerechnete Konzentrationen ergeben können, wenn die Kurvenanpassung nicht optimal ist, das gewählte Kalibrierkurvenmodell nicht geeignet ist oder die Fluoreszenzwerte nicht mehr im linearen Bereich der Kurve liegen. Bei den hier entwickelten multiplexen Assays liegt der Grund meist an Schwankungen und Ausreißern, die zu einer schlechteren Kurvenanpassung führten. Allerdings wurden die Kriterien bei den Assays für Normetanephrin, 3-Methoxytyramin und Serotonin auch für die zurückgerechneten Konzentrationen erfüllt, da sich diese Assays als weniger schwankungsanfällig erwiesen. Die Kriterien für die Interassay-Präzision werden ebenfalls für die meisten der multiplexen Immunoassays erfüllt, lediglich Adrenalin und Metanephrin zeigen hier etwas stärkere Schwankungen. Die Kriterien für die Wiederfindungsraten wurden von allen Assays bis auf Noradrenalin und Metanephrin erfüllt, vor allem bei Noradrenalin war die Wiederfindungsrate konstant etwas zu niedrig, was jedoch ebenfalls akzeptabel ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit den multiplexen Immunoassays eine zuverlässige und genaue Quantifizierung der Analyten in humanem Urin möglich ist. Vor allem die Assays für Dopamin, Noradrenalin, Normetanephrin, 3-Methoxytyramin und Serotonin zeigten sich als sehr stabile und zuverlässige Assays, die wenig stör- und schwankungsanfällig sind. Die Assays für Adrenalin und Metanephrin erwiesen sich hingegen als eher schwankungsanfällige Assays, was sehr wahrscheinlich durch eine zu geringe Affinität des Antikörpers für sein Antigen bedingt ist.

Verdünnungslinearität

In Abschnitt 5.4 wurde bereits erläutert, dass der dynamische Bereich der multiplexen Assays ausreichend groß ist, um die Analytkonzentration im Urin von gesunden Probanden sowie Patienten zu quantifizieren. Dennoch kann es vorkommen, dass bei Patienten mit einer sehr starken Erhöhung der Konzentration an Catecholaminen, Metanephrinen oder Serotonin die Analytkonzentrationen oberhalb der oberen Bestimmungsgrenze liegen. In diesem Fall kann durch Verdünnen der Probe die Analytkonzentration in den dynamischen Bereich der Standardkurve gebracht werden. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass die Linearität des Assays in diesem Bereich gegeben ist, ansonsten entstehen durch die Rückrechnung der Verdünnung falsch niedrige oder falsch hohe Werte. Die im Catecholamin-Assay getesteten Verdünnungsfaktoren unterscheiden sich von den im Metanephrin/Serotonin-Assay getesteten Verdünnungsfaktoren. Für die Catecholamine wurden zunächst zwar ebenfalls die im Metanephrin/Serotonin-Assay getesteten Verdünnungen auf ihre Linearität hin untersucht, anschließend jedoch noch höhere Verdünnungen, da sich im ersten Versuch eine sehr große Linearität der Assays abzeichnete. Für Dopamin und Noradrenalin konnte gezeigt werden, dass die Linearität bis zu einem Verdünnungsfaktor von 400 gegeben ist, für Adrenalin jedoch nur bis zu einem Faktor von 200 und da es sich um einen multiplexen Assay handelt, ist demnach der maximale Verdünnungsfaktor 200. Bei den Metanephrinen und Serotonin konnte die Linearität bis zu einem Faktor von 80 gezeigt werden. Diese Verdünnungsfaktoren sollten in jedem Fall ausreichend sein, um auch Patientenproben mit sehr hohen Konzentrationen an Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin in den dynamischen Bereich der multiplexen Assays zu bringen.

Selektivität

Für die Entwicklung der multiplexen Immunoassays ist es essentiell, dass für das jeweilige Antigen ein sehr spezifischer Antikörper zur Verfügung steht, welcher als Fängerantikörper auf den Mikrosphären immobilisiert werden kann. Da sich die Catecholamine und Metanephrine strukturell sehr ähnlich sind und sich nur durch das Vorhandensein einer Hydroxyl- bzw. einer oder zwei Methylgruppen unterscheiden, müssen die Antikörper hier kleinste Unterschiede erkennen können. Darüber hinaus gibt es zahlreiche andere Substanzen, die den Catecholaminen und Metanephrinen strukturell sehr stark ähneln. Daher ist es wichtig, die Selektivität der Antikörper zu ermitteln und diese hinsichtlich einer möglichen Kreuzreaktivität mit ähnlichen Molekülen zu

analysieren. Für Dopamin/3-Methoxytyramin, Adrenalin/Metanephrin und Serotonin konnten sehr spezifische Antikörper identifiziert werden, die nur eine vernachlässigbar geringe Kreuzreaktivität zu den jeweils anderen, im multiplexen Assay enthaltenen Analyten zeigten. Weiterhin konnte keine Kreuzreaktivität zu den strukturell ähnlichen Substanzen ermittelt werden. Demzufolge können mit diesen drei Antikörpern selbst kleinste Unterschiede in der Molekülstruktur erfasst und die einzelnen Catecholamine, Metanephriene und Serotonin voneinander unterschieden werden. Für Noradrenalin/Normetanephrin konnte dies allerdings nur für die gereinigten Antikörper mancher Chargen erreicht werden. Hier wurden Chargen erhalten, die ebenfalls nur eine zu vernachlässigende Kreuzreaktivität zu Adrenalin zeigten, allerdings gab es auch Chargen mit einer starken Kreuzreaktivität der gereinigten Antikörper gegenüber Adrenalin. Daher ist diese Kreuzreaktivität sehr wahrscheinlich nicht durch eine mangelnde Selektivität des Antikörpers für sein Antigen bedingt, sondern durch einen ineffektiven Aufreinigungsprozess, bei welchem der Antikörper möglicherweise nicht in ausreichender Reinheit gewonnen werden konnte oder aber durch die harschen Elutionsbedingungen teilweise denaturiert oder beschädigt wurde und somit nicht mehr in der Lage war, sein Antigen spezifisch zu erkennen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es möglich ist, selektive polyklonale Antikörper gegen sehr kleine Strukturen wie die Metanephriene zu generieren und als immobilisierte Fängerantikörper in nicht-kompetitiven, multiplexen Immunoassays einzusetzen. Durch den Einsatz monoklonaler Fängerantikörper könnte hier die Problematik der Chargen-abhängigen Kreuzreaktivitäten umgangen werden.

Robustheit und Analytstabilität

Zwischen der Entnahme und der Analyse von Patientenproben liegen zumeist längere Transportwege mit unterschiedlichen Lagerungstemperaturen. Häufig werden auch aus einer Probe mehrfach Analysen durchgeführt, die mehrere Einfrier- und Auftau-Zyklen der Probe nach sich ziehen. Nicht optimale Lagerungsbedingungen sowie zu häufiges Einfrieren und Wiederauftauen können zur Beschädigung der Analyten führen, sodass sie von ihrem jeweiligen spezifischen Antikörper nicht mehr erkannt werden. Daher ist es wichtig, die Stabilität der Analyten gegenüber diesen Bedingungen zu ermitteln, da nur bei ausreichender Stabilität ein zuverlässiges Messergebnis gewährleistet werden kann. Hierbei ist es sinnvoll, die gängigen Lagerungstemperaturen (Raumtemperatur, 4 °C und -20 °C) zu untersuchen. Ebenso sollten bis zu drei Einfrier- und Auftauzyklen untersucht werden, da es im Laboralltag durch die Bestimmung von mehreren Analyten und eventuell

durchzuführenden Nachbestimmungen erforderlich sein kann, ein Probenaliquot bis zu dreimal aufzutauen. Dabei zeigte sich, dass die Catecholamine, Metanephine und Serotonin sehr stabil sind. Alle drei Catecholamine können für 4 h bei RT oder 4 °C gelagert werden. Auch nach drei Einfrier- und Auftauzyklen können die Analyten zuverlässig und genau in der Probe quantifiziert werden. Dies konnte auch für die Metanephine und Serotonin gezeigt werden, allerdings wäre für Metanephrin eine Lagerung von nur 2 h bei RT besser, da hier schon eine leichte Veränderung bei der Bestimmung der Analytkonzentration nach 4 h festgestellt werden konnte. Daher zeigen die Analyten eine ausreichende Stabilität, um mit Hilfe der multiplexen Assays auch dann zuverlässig und genau quantifiziert werden zu können, wenn längere Lagerungszeiten, unterschiedliche Lagerungstemperaturen und mehrfaches Einfrieren und Auftauen zwischen der Probenentnahme und der Analyse liegen.

5.6 Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin aus *Dry Urine Test*-Filterkarten

Für die Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin muss dieser angesäuert oder mit Stabilisatoren versehen werden, damit es nicht zur Oxidation der Catecholamine kommt. Zusätzlich muss durch Zugabe von Konservierungsmitteln das Wachstum von Mikroorganismen verhindert werden. Anschließend muss der Urin sofort kühl gelagert oder tiefgefroren werden und unter diesen Lagerungsbedingungen auch an das Diagnostiklabor verschickt werden. Dies ist mit einem größeren Aufwand wie dem Versand auf Trockeneis und daher auch mit höheren Kosten verbunden. Zusätzlich besteht die Gefahr, dass durch zu spätes Ansäuern und zu langes Lagern bei Raumtemperatur ein Großteil der Catecholamine und Metanephine bereits oxidiert oder zerfallen ist. Das Sammeln von Urinproben zur Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und von Serotonin mit Hilfe von *Dry Urine Test*-Filterkarten der Firma LDN stellt daher eine einfache Alternative dar, bei der sowohl die Lagerung als auch der Versand bei Raumtemperatur erfolgen und die auch von ungeschultem Personal gut durchgeführt werden kann. Der Versand kann anschließend auch in einem Briefumschlag bei RT erfolgen. Es wurde nun untersucht, ob die Analyten tatsächlich auf den Filterkarten und bei RT stabil sind und inwiefern die Quantifizierung der Analyten in einer frischen Urinprobe, einer mit konventionellen Urinsammelröhrchen gesammelten Probe und einer mit den *Dry Urine Test*-Filterkarten gesammelten Probe übereinstimmen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Wiederfindungsrate der in Urin *gespikten* Analyten bei den *Dry Urine Test*-Filterkarten sehr gut ist und die gleichen Analytmengen quantifiziert werden

wie in einer frischen Urinprobe bzw. einer mit konventionellen Sammelröhrchen gesammelten Probe. Daher eignen sich die mit *Dry Urine Test*-Filterkarten gesammelten Urinproben für die Quantifizierung der sehr empfindlichen und instabilen Catecholamine, Metanephriene und von Serotonin mit Hilfe der multiplexen Immunoassays und stellen eine einfache und wenig fehleranfällige Alternative für das Sammeln von Urinproben dar.

5.7 Vergleich der multiplexen Immunoassays mit den gängigen Methoden zur Quantifizierung von Catecholaminen und Metanephrinen im Urin

Nach Abschluss der Entwicklungs- und Validierungsphase wurde ein technischer Vergleich der multiplexen Assays mit den kompetitiven ELISAs der Firma LDN anhand *gespikter* Urinproben und anhand der ELISA Kit-Kontrollen durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass die im multiplexen Assay ermittelten Konzentrationen mit den im ELISA ermittelten Konzentrationen sehr gut übereinstimmen und auch der jeweiligen Sollkonzentration entsprechen. Im Anschluss daran wurde anhand verschiedener Anwendungsbeispiele gezeigt, dass die Catecholamine, Metanephriene und Serotonin mit Hilfe der multiplexen Immunoassays erfolgreich in humanem sowie murinem Urin quantifiziert werden können. Allerdings wurde hierbei eine starke Unterquantifizierung des endogenen Noradrenalins bzw. Normetanephrins beobachtet. Daher wurde nochmals anhand verschiedener Patientenproben die Übereinstimmung der neu entwickelten multiplexen Immunoassays mit den in der Routinediagnostik gängigen Verfahren zur Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin überprüft. Dies sind sowohl die Quantifizierung mittels ELISA als auch die Quantifizierung mittels HPLC. Für den Vergleich wurden die kompetitiven ELISAs der Firma LDN verwendet, für den Vergleich mit der HPLC standen Referenzwerte aus 30 Patientenproben zur Verfügung, in welchen Catecholamine und Metanephriene am Universitätsklinikum in Tübingen mittels HPLC quantifiziert wurden.

Hier konnte gezeigt werden, dass der multiplexe Immunoassay für Catecholamine sehr gut und der multiplexe Metanephrin/Serotonin-Assay gut bis sehr gut mit den kompetitiven ELISAs sowie den HPLC-Messungen korreliert. Vor allem die Übereinstimmung des Dopamin-Assays mit den ELISA- und HPLC-Messungen sowie des Serotonin-Assays mit dem Serotonin ELISA ist hervorragend. Jedoch konnte die zuvor beobachtete starke Unterquantifizierung von endogenem Noradrenalin bzw. Normetanephrin im multiplexen Assay bestätigt werden. Um zu klären, wodurch trotz perfekter Korrelation die starke Unterquantifizierung von Noradrenalin bedingt ist, wurden verschiedene Versuche

durchgeführt. Es wurde überprüft, ob das im multiplexen Immunoassay eingesetzte Acylierungsreagenz, das von dem im ELISA verwendeten Acylierungsreagenz verschieden ist, für den beobachteten Effekt verantwortlich ist. Zudem wurde untersucht, ob das Vorhandensein zweier verschiedener Stereoisomere des Noradrenalins in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt. Zuletzt wurde versucht, durch saure Hydrolyse eine eventuelle Maskierung der Epitope des endogenen Noradrenalins zu entfernen und so dem Antikörper den Zugang zu seinem Antigen zu ermöglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Unterquantifizierung nicht durch die Verwendung eines anderen Acylierungsreagenzes im multiplexen Assay bedingt ist, da auch bei Durchführung des ELISAs mit diesem Acylierungsreagenz vergleichbare Analytmengen quantifiziert wurden wie bei Durchführung mit dem Kit-Acylierungsreagenz. Auch die Vermutung, dass die Diskrepanz durch das Vorhandensein zweier verschiedener Stereoisomere des Noradrenalins zu Stande kommt, konnte nicht bestätigt werden. Wurde jedoch nach der Elution der Catecholamine von der Extraktionsplatte eine saure Hydrolyse durch längeres Erhitzen der Extrakte durchgeführt, konnte die mit Hilfe der multiplexen Immunoassays quantifizierte endogene Noradrenalinmenge im Patientenurin stark gesteigert werden. Wurde zuvor mit ELISA- oder HPLC-Messungen etwa 10-mal mehr endogenes Noradrenalin in den Patientenproben quantifiziert als im multiplexen Assay, waren es jetzt nur noch etwa 1,5-mal mehr. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass im Urin von Patienten oder gesunden Spendern das endogene Noradrenalin tatsächlich in irgendeiner Form maskiert vorliegt, während frisch zur Probe hinzugegebenes synthetisches Noradrenalin für den Antikörper frei zugänglich ist. Die Hydrolyse nach der sauren Elution bietet somit eine einfache Möglichkeit, diese Maskierung zu entfernen und somit das Ergebnis des multiplexen Assays für Noradrenalin wesentlich zu verbessern. Es könnte auch sein, dass durch die Hydrolyse Konjugate der Analyten mit beispielsweise Glucuronsäure aufgelöst werden und der im multiplexen Assay verwendete Antikörper die als Konjugate vorliegenden Analyten nicht erkennt, während diese im ELISA und bei HPLC-Messungen erfasst werden. Normalerweise erfolgt zumindest bei den Metanephrinen eine saure Hydrolyse vor der Analyse mittels ELISA oder HPLC, um nicht nur die freien sondern auch die konjugierten Metaboliten der Catecholamine im Urin zu erfassen. Da die Catecholamine und Metanephrine in den *gespikten* Urinproben nicht in konjugierter Form vorliegen können, wäre dies eine Erklärung dafür, dass zur Urinprobe zugesetztes synthetisch hergestelltes Noradrenalin richtig quantifiziert wird, das in der Urinprobe enthaltene endogene Noradrenalin jedoch nicht. Weitere Daten zeigten zudem, dass das Maß an Unterquantifizierung vom verwendeten Antikörper abhängt (Daten nicht gezeigt). Je nachdem, welcher Antikörper im multiplexen Assay eingesetzt wurde, wurde in den Urinproben mehr oder weniger endogenes Noradrenalin quantifiziert. Bei einem der

Antikörper unterschieden sich die im multiplexen Assay und im ELISA quantifizierten Mengen an endogenem Noradrenalin sogar nur um den Faktor 2 und dies bereits ohne Hydrolyse. Allerdings war die Unterquantifizierung nur vom Antikörper, also letztendlich vom immunisierten Tier abhängig, nicht von der Aufreinigungscharge. Dies spricht ebenfalls dafür, dass die Epitope, an welche der Antikörper bindet, in den Urinproben nicht zugänglich sind und da jeder der Antikörper ein etwas unterschiedliches Epitop binden wird, wäre damit die Beobachtung zu erklären, dass das Maß an Unterquantifizierung vom jeweiligen Antikörper abhängig ist. Auch hier stellt der Einsatz von monoklonalen Fängerantikörpern eine mögliche Lösung des Problems dar, da alle Antikörper dasselbe Epitop binden und die Verfügbarkeit eines einmal als spezifisch identifizierten Antikörpers, welcher endogenes Noradrenalin korrekt quantifiziert, nicht limitiert ist.

Es konnte also gezeigt werden, dass mit den multiplexen Immunoassays Catecholamine, Metanephriene und Serotonin erfolgreich in humanem Patientenurin quantifiziert werden können und die quantifizierten Mengen sehr gut mit den in kommerziell erhältlichen ELISAs und mit HPLC-Messungen ermittelten Mengen korrelieren. Die absolut quantifizierten Mengen stimmen vor allem bei Dopamin und Serotonin perfekt mit den mittels der gängigen Methoden der Routinediagnostik quantifizierten Mengen überein und für Noradrenalin konnte nach saurer Hydrolyse ebenfalls eine gute Übereinstimmung erzielt werden.

5.8 Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrienen und Serotonin im Urin von Patienten

Um die Anwendbarkeit der neu entwickelten multiplexen Immunoassays für Catecholamine, Metanephriene und Serotonin zu demonstrieren, wurde Urin von Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsbildern mit Hilfe der Assays analysiert. Es wurde überprüft, ob die Konzentration der Analyten im Urin zuverlässig ermittelt werden kann und eine Unterscheidung von gesunden und kranken Personen möglich ist.

Patienten mit einem Phäochromozytom

Da das Phäochromozytom zu den bekanntesten Beispielen Catecholamin-assoziiertes Erkrankungen gehört und mit einer starken Erhöhung der Catecholamine und Metanephriene im Urin der Patienten einhergeht, wurden Spontanurinproben von drei

Patientinnen mit einem Phäochromozytom mit Hilfe der multiplexen Immunoassays analysiert. Dabei wurde bei diesen Patientinnen jeweils vor und nach der laparoskopischen Adrenalektomie Spontanurin gesammelt. Für zwei der drei Patientinnen (1 und 3) konnte erwartungsgemäß eine starke Reduktion der Adrenalin-, Noradrenalin-, Metanephrin- und Normetanephrinkonzentration nach der Adrenalektomie ermittelt werden. Dabei lagen die Konzentrationen der Analyten vor der Operation weit oberhalb des Konzentrationsbereichs der Analyten bei gesunden Spendern, nach der Operation dagegen normalisierten sich die Konzentrationen. Ein widersprüchliches Ergebnis wurde allerdings für Patientin 2 erhalten, bei welcher die Konzentrationen an Adrenalin, Noradrenalin und Metanephrin vor der Operation in einem normalen Konzentrationsbereich lagen und sich nach der Operation leicht erhöhten, während für Normetanephrin eine Reduktion beobachtet werden konnte. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass bei dieser Patientin eventuell kein klassisches Phäochromozytom mit einer Überproduktion an Catecholaminen und Metanephrinen vorlag sondern eine atypische Variante der Erkrankung. Die Bestimmung von Dopamin im Urin der Patientinnen hingegen zeigte, dass alle drei Patientinnen an keinem Dopamin-produzierenden Phäochromozytom leiden, da hier die Konzentrationen vor und nach Operation gleich sind und im selben Konzentrationsbereich liegen wie bei gesunden Spendern. Dasselbe gilt für 3-Methoxytyramin für die Patientinnen 1 und 3, allerdings wurde hier bei Patientin Nr. 2 eine Erhöhung der 3-Methoxytyraminkonzentration nach der Operation gesehen, die allerdings nicht bei allen Messungen bestätigt werden konnte und somit eher kritisch zu betrachten ist. Für Serotonin konnten bei allen drei Patientinnen keine Unterschiede zwischen der Konzentration vor und nach der Adrenalektomie ermittelt werden, die Konzentrationen lagen im selben Konzentrationsbereich wie bei den gesunden Spendern. Dies entspricht dem erwarteten Ergebnis, da Phäochromozytome kein Serotonin produzieren und daher keine Veränderungen in der Serotoninkonzentration vorliegen sollten.

Es konnten demzufolge mit Hilfe der multiplexen Immunoassays die stark erhöhten Konzentrationen an Catecholaminen und Metanephrinen vor Entfernung des Tumors bei den Patienten gemessen und die Reduktion der Konzentrationen nach operativer Entfernung des Tumors verfolgt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass zwei der drei Patientinnen das typische Krankheitsbild mit einer Überproduktion an Catecholaminen aufwiesen und keine der Patientinnen an einem Dopamin-produzierenden Phäochromozytom litt. Die multiplexen Immunoassays eignen sich daher sehr gut um sowohl stark erhöhte als auch normale Konzentrationen der Analyten im Urin von Patienten und gesunden Spendern zu quantifizieren.

Patienten mit Gedächtnisstörungen

Da die Catecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin zu den wichtigsten Neurotransmittern zählen, gehen verschiedene Erkrankungen des Nervensystems mit einer Veränderung der Konzentration an Catecholaminen und Metanephrinen im Gehirn sowie in verschiedenen Körperflüssigkeiten einher. Insbesondere bei Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer kommt es zur Degeneration von Neuronen, die im Spätstadium zu einer schweren Demenz bei den Patienten führt. Daher wurde untersucht, ob im Urin von Patienten mit Gedächtnisstörungen Veränderungen in der Konzentration von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin ermittelt werden können. Dabei handelte es sich um Patienten mit einer leichten kognitiven Störung, auch als Altersvergesslichkeit bekannt, sowie um Patienten mit einer beginnenden oder bereits bestehenden Alzheimer- oder Parkinson-Demenz. Es konnte gezeigt werden, dass zwar bei fast allen Patienten die Konzentration mindestens eines Analyten um mehr als die dreifache Standardabweichung vom Mittelwert der Konzentration bei gesunden Spendern abweicht, jedoch konnte keine allgemeine Tendenz ermittelt werden, die auf eine krankheitsbedingte Erhöhung oder Reduktion bestimmter Analyten im Zusammenhang mit einer leichten kognitiven Störung oder Morbus Alzheimer hinweist. Die signifikante Erhöhung der Konzentration an Dopamin und 3-Methoxytyramin bei Patient 7 ist bedingt durch die Therapie dieses an Parkinson-Demenz leidenden Patienten mit Levodopa. Dieses wird im Körper zu Dopamin verstoffwechselt und kann daher zu einer Erhöhung der Dopamin- und 3-Methoxytyraminkonzentration im Urin führen. Somit wird bei diesem Patienten nicht die endogene Konzentration der beiden Analyten erfasst, sondern die durch die Therapie mit Levodopa erzeugte Konzentration. Bei den Patienten mit einer beginnenden, leichten Alzheimer-Demenz (Patient 6, 8, 10, 13, 15, 18, 19) wurde kein einheitliches Ergebnis erhalten. Die Patienten zeigten teilweise eine Erhöhung der AdrenalinKonzentration und eine Reduktion der Serotoninkonzentration, bei einigen Patienten lagen jedoch die Konzentrationen aller Analyten im selben Konzentrationsbereich wie bei gesunden Spendern. Patient 12, welcher an einer mittelschweren Alzheimer-Demenz litt, zeigte eine starke Erhöhung der NoradrenalinKonzentration. Dies steht im Einklang mit der Theorie, dass es im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium trotz des Verlusts an noradrenergen Neuronen durch übermäßige kompensatorische Mechanismen zu einem Anstieg der Konzentration an Noradrenalin in der Zerebrospinalflüssigkeit kommt [55]. Dies könnte dann auch Auswirkungen auf die Konzentration des Analyten im Urin haben. Bei den Patienten mit einer leichten kognitiven Störung (Patient 1, 3, 16) und bei den Patienten ohne nachgewiesene Störung (Patient 4, 5, 17) konnten ebenfalls keine wesentlichen

Veränderungen im Vergleich zu gesunden Spendern ermittelt werden. Für die Patienten 2 und 11 standen keine Diagnosen zur Verfügung. Bei Patient 9, bei welchem eine signifikante Erhöhung einiger Analyten, vor allem Dopamin, Noradrenalin, 3-Methoxytyramin, Metanephrin und Serotonin ermittelt werden konnte, handelte es sich jedoch um eine geblindete gesunde Kontrolle. Allerdings zeigte keiner der acht bzw. elf bekannten gesunden Spender eine Erhöhung der Analytkonzentrationen, die Konzentrationen aller Analyten lagen bei diesen Spendern in einem ähnlichen Bereich. Demzufolge kann die starke Erhöhung der Analyten bei Patient 9 nicht erklärt werden. Es könnte entweder ein Fehler bei der Quantifizierung der Analyten im multiplexen Immunoassay oder ein Fehler bei der Quantifizierung von Kreatinin vorliegen. Auch ein Fehler beim Sammeln der Urinprobe könnte zu falsch hohen Ergebnissen führen. Ebenso könnten Interferenzen durch Nahrungsmittel oder Medikamente, welche der gesunde Kontrollspender vor der Abgabe der Urinprobe zu sich nahm, für die Erhöhung der Analytkonzentrationen verantwortlich sein. Letztlich kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass der gesunde Spender eventuell doch an einer Catecholamin-assoziierten Erkrankung leidet, die jedoch noch keine Symptome zeigt und daher bislang unbemerkt blieb.

Patienten mit einer Nierenerkrankung

Catecholamine und deren Abbauprodukte, die Metanephriene, werden in freier oder konjugierter Form über den Urin ausgeschieden. Daher passieren sie auch die Niere und werden hier filtriert. Eine veränderte Nierenfunktion wirkt sich daher auf die Konzentration der Catecholamine und Metanephriene sowohl im Urin als auch im Plasma aus. So steigt bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion aufgrund der verminderten Ausscheidung der Analyten im Urin die Konzentration an Catecholaminen und Metanephrinen im Plasma an [133]. Dagegen sinkt die Konzentration der Catecholamine im Urin mit fortschreitender Verschlechterung der Nierenfunktion stetig [132, 134]. Daher wurden Spontanurinproben von Patienten mit unterschiedlichen Nierenerkrankungen auf ihre Konzentration an Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin mit Hilfe der multiplexen Immunoassays untersucht. Dabei konnten nur bei den Patienten mit fokal segmentaler Glomerulosklerose und diabetischer Nephropathie signifikante Unterschiede in den Konzentrationen mehrerer Analyten im Vergleich zu gesunden Personen ermittelt werden. Bei den Patienten mit fokal segmentaler Glomerulosklerose konnte eine Reduktion der Catecholamine im Urin ermittelt werden sowie eine signifikante Erhöhung der Konzentration an freien Metanephrinen. Die Reduktion der Catecholamine im Urin

stimmt mit den in der Literatur [132-134] beschriebenen Beobachtungen überein, jedoch ist die stark erhöhte Konzentration an Metanephrinen widersprüchlich zur der ebenfalls erwarteten Reduktion der Konzentration aufgrund einer verminderten Nierenfunktion. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Patienten mit diabetischer Nephropathie erhalten. Anhand einer hierarchischen Clusteranalyse konnte ermittelt werden, dass bei manchen Patienten eine starke Erhöhung der Metanephrine im Urin vorliegt. Diese Patienten gehörten jedoch verschiedenen Gruppen an und nicht bei allen Patienten einer Gruppe konnte eine Erhöhung der Konzentration an Metanephrinen festgestellt werden. Daher lässt sich kein Bezug zwischen einer bestimmten Nierenerkrankung und der Erhöhung der Konzentration an Metanephrinen im Urin herstellen. Wodurch allerdings diese Erhöhung bedingt ist bleibt unklar. Ebenso konnte nur für die Patienten mit fokal segmentaler Glomerulosklerose eine Reduktion der Catecholamine im Urin im Vergleich zu gesunden Probanden ermittelt werden, für alle anderen Patientengruppen jedoch nicht. Dies bedeutet, dass anhand der Quantifizierung von Catecholaminen und Metanephrinen allein keine zuverlässige Identifizierung von Patienten mit einer Nierenerkrankung erfolgen kann, wenngleich sie auch bei reduzierter Catecholaminkonzentration Hinweise auf das Vorliegen einer solchen Erkrankung geben kann. Allerdings konnte mit dieser großen Patientengruppe gezeigt werden, dass es mit Hilfe der multiplexen Immunoassays möglich ist, schnell und kostengünstig eine große Anzahl an Proben gleichzeitig zuverlässig zu quantifizieren und Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Probanden zu ermitteln.

5.9 Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Alpha-Adrenozeptor-Knockout-Mäusen

Catecholamine sind über α - und β -Adrenozeptoren an der Regulation vieler Stoffwechselprozesse im Körper wie beispielsweise der Lipolyse und Glykogenolyse beteiligt. Dieses System kann durch verschiedene Faktoren wie Ernährungsgewohnheiten, Übergewicht und Fettleibigkeit sowie Stress beeinflusst werden. Stress sorgt für eine erhöhte Aktivität des Sympathikus sowie eine vermehrte Sekretion an Catecholaminen [148]. Ebenso könnte Fettleibigkeit zu einer erhöhten Aktivität des Sympathikus führen [79]. In einer Studie der Universität Turku sollte daher untersucht werden, welche Rolle Stress bei der Entwicklung von Fettleibigkeit und Stoffwechselerkrankungen spielt. Als Modellorganismus wurden Mäuse verwendet, welche einen Knockout des Alpha-2A- bzw. des Alpha-2A- und Alpha-2C-Adrenozeptors besitzen. Diese beiden Knockouts führen zu einer chronisch erhöhten Aktivität des

Sympathikus sowie einer erhöhten Catecholamin-Sekretionsrate bei den Tieren und simulieren somit einen chronischen Stresszustand. Die Tiere wurden zunächst mit einer normalen Kost und anschließend über einen Zeitraum von zwei Wochen mit einer fettreichen Kost ernährt, welche mit einem Fettgehalt von 45 % die sehr fettreiche Ernährung der westlichen Zivilisation reflektieren sollte. Ziel der Studie ist es zu ermitteln, ob eine erhöhte Aktivität des Sympathikus die Tiere anfälliger für die Entwicklung von Fettleibigkeit macht oder aber ob die übermäßige Produktion an Catecholaminen der Fettleibigkeit vorbeugt. Dazu wurden die Konzentrationen der Catecholamine und Metanephrine im Urin der Tiere bestimmt und mit einer Kontrollgruppe verglichen. Für den Alpha-2AC-Adrenozeptor-Knockout-Stamm konnte für alle Catecholamine und Metanephrine sowie für Serotonin eine signifikante Erhöhung der Konzentration der Analyten im Urin bei fettreicher Ernährung ermittelt werden. Ergebnisse der Universität Turku (Daten noch nicht veröffentlicht) zeigen, dass die Alpha-2AC-Adrenozeptor-Knockout-Tiere auch bei fettreicher Ernährung keine Fettleibigkeit entwickeln. Somit deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass bei chronischem Stress und einer übermäßigen Produktion an Catecholaminen, vor allem an Adrenalin und Noradrenalin, die Entwicklung von Fettleibigkeit verhindert wird. Für die Alpha-2A-Adrenozeptor-Knockout-Tiere hingegen konnte keine signifikante Erhöhung der Catecholaminkonzentrationen ermittelt werden, hier waren nur die Metanephrin- und Serotoninkonzentrationen bei fettreicher Ernährung erhöht, jedoch nicht in so hohem Maße wie bei dem Doppel-Knockout-Stamm. Bei diesen Tieren beobachtete die Universität Turku eine starke Gewichtszunahme mit Entwicklung von Fettleibigkeit bei Ernährung mit fettreicher Kost, wobei diese nicht so stark an Gewicht zulegten wie die Wildtyp-Kontrolltiere. Da die Alpha-2A-Adrenozeptor-Knockout-Tiere weniger Catecholamine bei fettreicher Ernährung sekretieren als die Doppel-Knockout-Tiere könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die geringeren Konzentrationen an Catecholaminen nicht ausreichend sind um die Tiere vor der Entwicklung von Fettleibigkeit zu schützen. Die Wildtyp-Tiere zeigen zwar auch für Dopamin und Noradrenalin erhöhte Konzentrationen bei fettreicher Ernährung, jedoch nicht für Adrenalin. Diese Tiere legen bei fettreicher Ernährung auch stark an Gewicht zu. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass eine sehr hohe Aktivität des Sympathikus mit einer übermäßigen Sekretion an Catecholaminen, vor allem von Adrenalin, wie es bei Stress der Fall ist, vor einer starken Gewichtszunahme und der Entwicklung von Fettleibigkeit schützt. Um hier jedoch die genauen Zusammenhänge zwischen sympathischer Aktivität, Catecholamin-Sekretionsrate und der Entwicklung von Fettleibigkeit aufklären zu können, sind weitere Versuche notwendig. Ebenfalls sollte geklärt werden, weshalb die Metanephrine im Urin bei fettreicher Ernährung bei allen Tieren stark erhöht sind. Dieses Ergebnis steht nicht im Einklang mit der nur leicht oder

nicht erhöhten Konzentration der Catecholamine bei den Alpha-2A-Knockout-Tieren sowie den Wildtyp-Tieren, da nicht klar ist, woher bei normalen oder leicht erhöhten Konzentrationen an Catecholaminen die großen Mengen ihrer Abbauprodukte herkommen.



.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Catecholamine und Serotonin sind für eine Vielzahl von Prozessen im Körper, wie zum Beispiel der Neurotransmission, der Regulation des Herz-Kreislauf-Systems oder der Regulation verschiedener Stoffwechselprozesse von essentieller Bedeutung. Daher spielen Catecholamine und Metanephine als deren inaktive Metaboliten sowie Serotonin eine wichtige Rolle bei vielen Erkrankungen, da eine Veränderung ihrer Konzentration in Körperflüssigkeiten wie Plasma und Urin Auskunft über das Vorliegen verschiedener Erkrankungen geben kann.

In dieser Arbeit wurden multiplexe Immunoassays entwickelt, die eine einfache, schnelle und präzise Quantifizierung der Catecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin sowie ihrer Metaboliten 3-Methoxytyramin, Normetanephrin, Metanephrin und von Serotonin erlauben. Multiplexe Assays bieten hierbei den Vorteil, dass aus einem geringen Probenvolumen mehrere Parameter gleichzeitig bestimmt und hunderte von Proben parallel analysiert werden können. Somit stellen diese Assays im Vergleich zu herkömmlichen immunologischen Verfahren wie dem ELISA und zu HPLC- bzw. Massenspektrometrie-basierten Verfahren eine Zeit, Material und damit Kosten sparende Methode dar.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, selektive polyklonale Antikörper gegen sehr kleine und strukturell sehr ähnliche Moleküle wie die Catecholamine, Metanephine und Serotonin als Fängerantikörper in nicht-kompetitiven, Sandwich-Immunoassay-ähnlichen multiplexen Assays einzusetzen. Anhand der bei der Assayvalidierung ermittelten Parameter konnte gezeigt werden, dass die multiplexen Immunoassays eine sehr gute Sensitivität sowie einen ausreichend großen dynamischen Bereich besitzen, um eine präzise Quantifizierung der Analyten im Urin sowohl bei gesunden Personen als auch bei Patienten mit erhöhten Analytkonzentrationen zu erlauben. Darüber hinaus konnte die sehr gute Korrelation der neu entwickelten multiplexen Immunoassays mit den in der Routinediagnostik gängigen Verfahren zur Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin demonstriert werden. Herausragend war vor allem die perfekte Übereinstimmung des Dopamin-Assays mit einem kommerziell erhältlichen ELISA sowie den Ergebnissen aus HPLC-Messungen. Ebenso konnte eine sehr gute Übereinstimmung des Serotonin-Assays mit einem kommerziellen ELISA demonstriert werden. Auch für die anderen Analyten zeigte sich

eine gute Übereinstimmung mit den bisherigen Standardverfahren. Die zunächst beobachtete starke Unterquantifizierung von endogenem Noradrenalin im multiplexen Assay konnte durch eine saure Hydrolyse nach der Probenvorbereitung fast vollständig behoben werden.

Die Anwendbarkeit der multiplexen Immunoassays konnte anhand von Urinproben von Patienten mit verschiedenen Diagnosen demonstriert werden. So konnten die stark erhöhten Catecholamin- und Metanephrinkonzentrationen im Urin von Patienten mit einem Phäochromozytom zuverlässig quantifiziert und deren Reduktion nach operativer Entfernung des Tumors verfolgt werden. Bei Patienten mit verschiedenen Gedächtnisstörungen wurde kein einheitliches Ergebnis erhalten, es konnte jedoch bei einigen Patienten eine Erhöhung der Analytkonzentrationen beobachtet werden. Ebenso zeigten nur manche Patienten mit einer Nierenerkrankung eine starke Erhöhung der Metanephriene. Hier konnte jedoch kein eindeutiger Zusammenhang mit der zugrunde liegenden Nierenerkrankung hergestellt werden.

In einer Zusammenarbeit mit der Universität Turku konnte gezeigt werden, dass sich die hier entwickelten multiplexen Immunoassays auch für die Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und Serotonin im Urin von Mäusen eignen. Die Ergebnisse der Studie zeigten hierbei eine vom Genotyp abhängige, unterschiedlich starke Erhöhung der Catecholamine, Metanephriene und von Serotonin bei sehr fettreicher Ernährung der Tiere.

Anhand dieser Proben konnte auch demonstriert werden, dass die hier entwickelten multiplexen Immunoassays eine schnelle, einfache und parallele Bearbeitung einer großen Anzahl an Urinproben ermöglichen, da sieben Analyten mit nur zwei Assays quantifiziert werden können, wohingegen in den bisher standardmäßig eingesetzten kompetitiven ELISAs für jeden einzelnen Analyten ein separater Assay notwendig war.

Die in dieser Arbeit entwickelten multiplexen Immunoassays besitzen daher eindeutig das Potential für den Einsatz in der Routinediagnostik. Sie bieten eine einfache, schnelle und präzise Methode zur Quantifizierung von Catecholaminen, Metanephrinen und von Serotonin im Urin. Dennoch wird langfristig der Einsatz von monoklonalen Fängerantikörpern angestrebt, um die beobachteten starken Schwankungen zwischen einzelnen Chargen der polyklonalen Antikörper zu eliminieren und durch optimierte und vereinheitlichte Aufreinigungsprotokolle die Ausbeute der Antikörper zu verbessern. Des Weiteren bieten monoklonale Antikörper den Vorteil einer nicht limitierten Verfügbarkeit,

was besonders im Hinblick auf den Bedarf größerer Mengen an Fängerantikörpern für die Immobilisierung auf den Mikrosphären von Vorteil wäre. Darüber hinaus sollten die multiplexen Immunoassays zukünftig auch für die Quantifizierung der Analyten im Plasma anwendbar sein, da vor allem die Plasma-Metanephriene wichtige Indikatoren für viele Erkrankungen sind.



7. Referenzen

1. Pegg, A.E., *Mammalian polyamine metabolism and function*. IUBMB Life, 2009. **61**(9): p. 880-94.
2. Childs, A.C., D.J. Mehta, and E.W. Gerner, *Polyamine-dependent gene expression*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(7): p. 1394-406.
3. Medina, M.A., et al., *Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2003. **38**(1): p. 23-59.
4. Ziegler, M.G., et al., *Location, development, control, and function of extraadrenal phenylethanolamine N-methyltransferase*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **971**: p. 76-82.
5. Daubner, S.C., T. Le, and S. Wang, *Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis*. Arch Biochem Biophys, 2011. **508**(1): p. 1-12.
6. Nagatsu, T., M. Levitt, and S. Udenfriend, *Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 2910-7.
7. Nagatsu, T., *Tyrosine hydroxylase: human isoforms, structure and regulation in physiology and pathology*. Essays Biochem, 1995. **30**: p. 15-35.
8. Aktories, K., et al., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 9. 2005, München: Elsevier GmbH.
9. Schott, B.H., et al., *Membrane-Bound Catechol-O-Methyl Transferase in Cortical Neurons and Glial Cells is Intracellularly Oriented*. Front Psychiatry, 2010. **1**: p. 142.
10. Meiser, J., D. Weindl, and K. Hiller, *Complexity of dopamine metabolism*. Cell Commun Signal, 2013. **11**(1): p. 34.
11. Berridge, C.W., B.E. Schmeichel, and R.A. Espana, *Noradrenergic modulation of wakefulness/arousal*. Sleep Med Rev, 2012. **16**(2): p. 187-97.
12. Skeberdis, V.A., *Structure and function of beta3-adrenergic receptors*. Medicina (Kaunas), 2004. **40**(5): p. 407-13.
13. Steinhilber, D., M. Schubert-Zsilavec, and H.J. Roth, *Medizinische Chemie*. Vol. 1. A. 2005, Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.
14. Sotnikova, T.D., et al., *The dopamine metabolite 3-methoxytyramine is a neuromodulator*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13452.
15. Kim, D.Y. and M. Camilleri, *Serotonin: a mediator of the brain-gut connection*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(10): p. 2698-709.
16. Rapport, M.M., A.A. Green, and I.H. Page, *Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization*. J Biol Chem, 1948. **176**(3): p. 1243-51.
17. Wade, P.R., et al., *Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract*. J Neurosci, 1996. **16**(7): p. 2352-64.
18. Millan, M.J., et al., *Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions*. Trends Pharmacol Sci, 2008. **29**(9): p. 454-64.
19. Walther, D.J., et al., *Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release*. Cell, 2003. **115**(7): p. 851-62.

20. Gershon, M.D., *Review article: serotonin receptors and transporters -- roles in normal and abnormal gastrointestinal motility*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004. **20 Suppl 7**: p. 3-14.
21. Fiorica-Howells, E., et al., *Distribution of 5-HT₄ receptors in wild-type mice and analysis of intestinal motility in 5-HT₄ knockout mice*. *Gastroenterology*, 2003. **124**(A342).
22. Costedio, M.M., N. Hyman, and G.M. Mawe, *Serotonin and its role in colonic function and in gastrointestinal disorders*. *Dis Colon Rectum*, 2007. **50**(3): p. 376-88.
23. Lucki, I., *The spectrum of behaviors influenced by serotonin*. *Biol Psychiatry*, 1998. **44**(3): p. 151-62.
24. Young, S.N. and M. Leyton, *The role of serotonin in human mood and social interaction. Insight from altered tryptophan levels*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002. **71**(4): p. 857-65.
25. Williams, E., et al., *Associations between whole-blood serotonin and subjective mood in healthy male volunteers*. *Biol Psychol*, 2006. **71**(2): p. 171-4.
26. Podbregar, N., *Glückshormon und Partnertausch*, in *Bild der Wissenschaft*. 2013.
27. Martin, G.R., *Vascular receptors for 5-hydroxytryptamine: distribution, function and classification*. *Pharmacol Ther*, 1994. **62**(3): p. 283-324.
28. Ishine, T., et al., *Serotonin 5-HT₇ receptors mediate relaxation of porcine pial veins*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **278**(3): p. H907-12.
29. Terron, J.A. and A. Falcon-Neri, *Pharmacological evidence for the 5-HT₇ receptor mediating smooth muscle relaxation in canine cerebral arteries*. *Br J Pharmacol*, 1999. **127**(3): p. 609-16.
30. Maher, E.R. and C. Eng, *The pressure rises: update on the genetics of pheochromocytoma*. *Hum Mol Genet*, 2002. **11**(20): p. 2347-54.
31. Eisenhofer, G., et al., *Catecholamine metabolomic and secretory phenotypes in pheochromocytoma*. *Endocr Relat Cancer*, 2011. **18**(1): p. 97-111.
32. Isobe, K., et al., *Enhanced expression of mRNA coding for the adrenaline-synthesizing enzyme phenylethanolamine-N-methyl transferase in adrenaline-secreting pheochromocytomas*. *J Urol*, 2000. **163**(1): p. 357-62.
33. Eisenhofer, G., et al., *Differential expression of the regulated catecholamine secretory pathway in different hereditary forms of pheochromocytoma*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. **295**(5): p. E1223-33.
34. Lenders, J.W., et al., *Pheochromocytoma*. *Lancet*, 2005. **366**(9486): p. 665-75.
35. Eisenhofer, G., et al., *Biochemical and clinical manifestations of dopamine-producing paragangliomas: utility of plasma methoxytyramine*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(4): p. 2068-75.
36. Strenger, V., et al., *Diagnostic and prognostic impact of urinary catecholamines in neuroblastoma patients*. *Pediatr Blood Cancer*, 2007. **48**(5): p. 504-9.
37. Schilling, F.H., et al., *Neuroblastoma screening at one year of age*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(14): p. 1047-53.
38. Woods, W.G., et al., *Screening of infants and mortality due to neuroblastoma*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(14): p. 1041-6.

39. Evans, A.E., J. Gerson, and L. Schnauffer, *Spontaneous regression of neuroblastoma*. Natl Cancer Inst Monogr, 1976. **44**: p. 49-54.
40. Davie, C.A., *A review of Parkinson's disease*. Br Med Bull, 2008. **86**: p. 109-27.
41. Gluck, M., et al., *Inhibition of brain mitochondrial respiration by dopamine: involvement of H(2)O(2) and hydroxyl radicals but not glutathione-protein-mixed disulfides*. J Neurochem, 2002. **82**(1): p. 66-74.
42. Obeso, J.A., et al., *Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle*. Nat Med, 2010. **16**(6): p. 653-61.
43. Cuervo, A.M., et al., *Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy*. Science, 2004. **305**(5688): p. 1292-5.
44. Schulz-Schaeffer, W.J., *The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia*. Acta Neuropathol, 2010. **120**(2): p. 131-43.
45. Nichkova, M., et al., *Validation of an ELISA for urinary dopamine: applications in monitoring treatment of dopamine-related disorders*. J Neurochem, 2013. **125**(5): p. 724-35.
46. Brookmeyer, R., S. Gray, and C. Kawas, *Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset*. Am J Public Health, 1998. **88**(9): p. 1337-42.
47. Perl, D.P., *Neuropathology of Alzheimer's disease*. Mt Sinai J Med, 2010. **77**(1): p. 32-42.
48. Leuner, K., W.E. Muller, and A.S. Reichert, *From mitochondrial dysfunction to amyloid beta formation: novel insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Mol Neurobiol, 2012. **46**(1): p. 186-93.
49. Szot, P., *Common factors among Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and epilepsy: possible role of the noradrenergic nervous system*. Epilepsia, 2012. **53 Suppl 1**: p. 61-6.
50. Marcyniuk, B., D.M. Mann, and P.O. Yates, *Loss of nerve cells from locus coeruleus in Alzheimer's disease is topographically arranged*. Neurosci Lett, 1986. **64**(3): p. 247-52.
51. Bondareff, W., C.Q. Mountjoy, and M. Roth, *Loss of neurons of origin of the adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus ceruleus) in senile dementia*. Neurology, 1982. **32**(2): p. 164-8.
52. Chan-Palay, V. and E. Asan, *Alterations in catecholamine neurons of the locus coeruleus in senile dementia of the Alzheimer type and in Parkinson's disease with and without dementia and depression*. J Comp Neurol, 1989. **287**(3): p. 373-92.
53. Szot, P., et al., *Compensatory changes in the noradrenergic nervous system in the locus ceruleus and hippocampus of postmortem subjects with Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies*. J Neurosci, 2006. **26**(2): p. 467-78.
54. Gibbs, M.E. and R.J. Summers, *Role of adrenoceptor subtypes in memory consolidation*. Prog Neurobiol, 2002. **67**(5): p. 345-91.
55. Elrod, R., et al., *Effects of Alzheimer's disease severity on cerebrospinal fluid norepinephrine concentration*. Am J Psychiatry, 1997. **154**(1): p. 25-30.
56. Liu, L., et al., *Simultaneous determination of catecholamines and their metabolites related to Alzheimer's disease in human urine*. J Sep Sci, 2011. **34**(10): p. 1198-204.

57. van Os, J. and S. Kapur, *Schizophrenia*. Lancet, 2009. **374**(9690): p. 635-45.
58. Picchioni, M.M. and R.M. Murray, *Schizophrenia*. BMJ, 2007. **335**(7610): p. 91-5.
59. Gaur, N., et al., *The biochemical womb of schizophrenia: A review*. Indian J Clin Biochem, 2008. **23**(4): p. 307-27.
60. Snyder, S.H., et al., *Drugs, neurotransmitters, and schizophrenia*. Science, 1974. **184**(4143): p. 1243-53.
61. Snyder, S.H., *The dopamine hypothesis of schizophrenia: focus on the dopamine receptor*. Am J Psychiatry, 1976. **133**(2): p. 197-202.
62. Amin, F., et al., *Assessment of the central dopaminergic index of plasma HVA in schizophrenia*. Schizophr Bull, 1995. **21**(1): p. 53-66.
63. Bleich, A., et al., *The role of serotonin in schizophrenia*. Schizophr Bull, 1988. **14**(2): p. 297-315.
64. Iqbal, N. and H.M. van Praag, *The role of serotonin in schizophrenia*. Eur Neuropsychopharmacol, 1995. **5 Suppl**: p. 11-23.
65. Coyle, J.T., *The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia*. Harv Rev Psychiatry, 1996. **3**(5): p. 241-53.
66. Schwarz, E., et al., *Validation of a blood-based laboratory test to aid in the confirmation of a diagnosis of schizophrenia*. Biomark Insights, 2010. **5**: p. 39-47.
67. Brown, A.S., et al., *Effects of clozapine on plasma catecholamines and relation to treatment response in schizophrenia: a within-subject comparison with haloperidol*. Neuropsychopharmacology, 1997. **17**(5): p. 317-25.
68. Elman, I., et al., *Effects of pharmacological doses of 2-deoxyglucose on plasma catecholamines and glucose levels in patients with schizophrenia*. Psychopharmacology (Berl), 2004. **176**(3-4): p. 369-75.
69. Mileikovskii, Y.A., *Excretion of catecholamines and tryptophan derivatives in schizophrenia*. Neurosci Behav Physiol, 1979. **9**(4): p. 325-8.
70. Kelley, M.E., J.K. Yao, and D.P. van Kammen, *Plasma catecholamine metabolites as markers for psychosis and antipsychotic response in schizophrenia*. Neuropsychopharmacology, 1999. **20**(6): p. 603-11.
71. Senard, J.M. and P. Rouet, *Dopamine beta-hydroxylase deficiency*. Orphanet J Rare Dis, 2006. **1**: p. 7.
72. Barnes, N., et al., *The copper-transporting ATPases, menkes and wilson disease proteins, have distinct roles in adult and developing cerebellum*. J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 9640-5.
73. Goldstein, D.S., C.S. Holmes, and S.G. Kaler, *Relative efficiencies of plasma catechol levels and ratios for neonatal diagnosis of menkes disease*. Neurochem Res, 2009. **34**(8): p. 1464-8.
74. Hyland, K., et al., *Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, diagnosis, and treatment of a new inborn error of neurotransmitter amine synthesis*. Neurology, 1992. **42**(10): p. 1980-8.
75. Brunner, H.G., et al., *Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A*. Science, 1993. **262**(5133): p. 578-80.

76. Lenders, J.W., et al., *Specific genetic deficiencies of the A and B isoenzymes of monoamine oxidase are characterized by distinct neurochemical and clinical phenotypes*. J Clin Invest, 1996. **97**(4): p. 1010-9.
77. Tentolouris, N., S. Liatis, and N. Katsilambros, *Sympathetic system activity in obesity and metabolic syndrome*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1083**: p. 129-52.
78. Peterson, H.R., et al., *Body fat and the activity of the autonomic nervous system*. N Engl J Med, 1988. **318**(17): p. 1077-83.
79. Troisi, R.J., et al., *Relation of obesity and diet to sympathetic nervous system activity*. Hypertension, 1991. **17**(5): p. 669-77.
80. De Pergola, G., et al., *Independent influence of insulin, catecholamines, and thyroid hormones on metabolic syndrome*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(11): p. 2405-11.
81. Maroun, J., et al., *Guidelines for the diagnosis and management of carcinoid tumours. Part 1: the gastrointestinal tract. A statement from a Canadian National Carcinoid Expert Group*. Curr Oncol, 2006. **13**(2): p. 67-76.
82. Ilias, I. and K. Pacak, *A clinical overview of pheochromocytomas/paragangliomas and carcinoid tumors*. Nucl Med Biol, 2008. **35 Suppl 1**: p. S27-34.
83. Feldman, J.M. and T.M. O'Dorisio, *Role of neuropeptides and serotonin in the diagnosis of carcinoid tumors*. Am J Med, 1986. **81**(6B): p. 41-8.
84. Nehar, D., et al., *Interest of Chromogranin A for diagnosis and follow-up of endocrine tumours*. Clin Endocrinol (Oxf), 2004. **60**(5): p. 644-52.
85. de Herder, W.W., *Biochemistry of neuroendocrine tumours*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2007. **21**(1): p. 33-41.
86. Panksepp, J., *Textbook of biological psychiatry*. 2004, Hoboken, New Jersey: Wiley-Liss Inc.
87. Hindmarch, I., *Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods*. Eur Psychiatry, 2002. **17 Suppl 3**: p. 294-9.
88. Lee, S., et al., *Depression research: where are we now?* Mol Brain, 2010. **3**: p. 8.
89. Leonard, B.E., *Evidence for a biochemical lesion in depression*. J Clin Psychiatry, 2000. **61 Suppl 6**: p. 12-7.
90. Nestler, E.J., et al., *Neurobiology of depression*. Neuron, 2002. **34**(1): p. 13-25.
91. Headache Classification Subcommittee of the International Headache, S., *The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition*. Cephalalgia, 2004. **24 Suppl 1**: p. 9-160.
92. Sicuteri, F., A. Testi, and B. Anselmi, *Biochemical Investigations in Headache: Increase in the Hydroxyindoleacetic Acid Excretion During Migraine Attacks*. Int. Arch. Allergy, 1961. **19**: p. 55-58.
93. Graham, J.R. and H.G. Wolff, *Mechanism of Migraine Headache and Action of Ergotamine tartrate*. Arch NeurPsych., 1938. **39**(4): p. 737-763.
94. May, A. and P.J. Goadsby, *The trigeminovascular system in humans: pathophysiologic implications for primary headache syndromes of the neural influences on the cerebral circulation*. J Cereb Blood Flow Metab, 1999. **19**(2): p. 115-27.

95. Limmroth, V., [*How do sumatriptan and co. work? The action mechanisms of triptans*]. Pharm Unserer Zeit, 2002. **31**(5): p. 458-61.
96. Ferrari, M.D., et al., *Serotonin metabolism in migraine*. Neurology, 1989. **39**(9): p. 1239-42.
97. Ferrari, M.D. and P.R. Saxena, *On serotonin and migraine: a clinical and pharmacological review*. Cephalalgia, 1993. **13**(3): p. 151-65.
98. Lo, C.Y., et al., *Adrenal pheochromocytoma remains a frequently overlooked diagnosis*. Am J Surg, 2000. **179**(3): p. 212-5.
99. Proye, C., et al., *Dopamine-secreting pheochromocytoma: an unrecognized entity? Classification of pheochromocytomas according to their type of secretion*. Surgery, 1986. **100**(6): p. 1154-62.
100. Lenders, J.W., et al., *Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best?* JAMA, 2002. **287**(11): p. 1427-34.
101. Gerlo, E.A. and C. Sevens, *Urinary and plasma catecholamines and urinary catecholamine metabolites in pheochromocytoma: diagnostic value in 19 cases*. Clin Chem, 1994. **40**(2): p. 250-6.
102. Smythe, G.A., et al., *Biochemical diagnosis of pheochromocytoma by simultaneous measurement of urinary excretion of epinephrine and norepinephrine*. Clin Chem, 1992. **38**(4): p. 486-92.
103. Anton, A.H. and D.F. Sayre, *A study of the factors affecting the aluminum oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines*. J Pharmacol Exp Ther, 1962. **138**: p. 360-75.
104. Wu, A.H. and T.G. Gornet, *Preparation of urine samples for liquid-chromatographic determination of catecholamines: bonded-phase phenylboronic acid, cation-exchange resin, and alumina adsorbents compared*. Clin Chem, 1985. **31**(2): p. 298-302.
105. Talwar, D., et al., *Extraction and separation of urinary catecholamines as their diphenyl boronate complexes using C18 solid-phase extraction sorbent and high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002. **769**(2): p. 341-9.
106. Ji, C., et al., *Simultaneous determination of plasma epinephrine and norepinephrine using an integrated strategy of a fully automated protein precipitation technique, reductive ethylation labeling and UPLC-MS/MS*. Anal Chim Acta, 2010. **670**(1-2): p. 84-91.
107. Smedes, F., J.C. Kraak, and H. Poppe, *Simple and fast solvent extraction system for selective and quantitative isolation of adrenaline, noradrenaline and dopamine from plasma and urine*. J Chromatogr, 1982. **231**(1): p. 25-39.
108. Moyer, T.P., et al., *Analysis for urinary catecholamines by liquid chromatography with amperometric detection: methodology and clinical interpretation of results*. Clin Chem, 1979. **25**(2): p. 256-63.
109. Nohta, H., A. Mitsui, and Y. Ohkura, *Spectrofluorimetric determination of catecholamines with 1,2-diphenylethylenediamine*. Analytica Chimica Acta, 1984. **165**: p. 171-176.
110. Engelman, K., B. Portnoy, and W. Lovenberg, *A sensitive and specific double-isotope derivative method for the determination of catecholamines in biological specimens*. Am J Med Sci, 1968. **255**: p. 259-68.
111. Passon, P.G. and J.D. Peuler, *A simplified radiometric assay for plasma norepinephrine and epinephrine*. Anal Biochem, 1973. **51**(2): p. 618-31.

112. Wolthers, B.G., et al., *Evaluation of urinary metanephrine and normetanephrine enzyme immunoassay (ELISA) kits by comparison with isotope dilution mass spectrometry*. Clin Chem, 1997. **43**(1): p. 114-20.
113. Mons, N. and M. Geffard, *Specific antisera against the catecholamines: L-3,4-dihydroxyphenylalanine, dopamine, noradrenaline, and octopamine tested by an enzyme-linked immunosorbent assay*. J Neurochem, 1987. **48**(6): p. 1826-33.
114. Murphy, J.F., D.H. Davies, and C.J. Smith, *The development of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the catecholamines adrenalin and noradrenalin*. J Immunol Methods, 1992. **154**(1): p. 89-98.
115. Iinuma, K., et al., *Radioimmunoassay of metanephrine and normetanephrine for diagnosis of pheochromocytoma*. Clin Chem, 1986. **32**(10): p. 1879-83.
116. Whiting, M.J. and M.P. Doogue, *Advances in biochemical screening for pheochromocytoma using biogenic amines*. Clin Biochem Rev, 2009. **30**(1): p. 3-17.
117. Gosetti, F., et al., *Simultaneous determination of sixteen underivatized biogenic amines in human urine by HPLC-MS/MS*. Anal Bioanal Chem, 2013. **405**(2-3): p. 907-16.
118. Xu, X., et al., *Determination of three major catecholamines in human urine by capillary zone electrophoresis with chemiluminescence detection*. Anal Biochem, 2012. **427**(1): p. 10-7.
119. Wellhausen, R. and H. Seitz, *Facing current quantification challenges in protein microarrays*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 831347.
120. Luminex, *The Luminex Corporation Homepage*. <http://www.luminexcorp.com>, 2013(14.08.2013).
121. eBioscience, *The eBioscience, Inc. Homepage*. <http://www.ebioscience.com/>, 2013(14.08.2013).
122. Dupont, N.C., et al., *Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants*. J Reprod Immunol, 2005. **66**(2): p. 175-91.
123. Bellisario, R., R.J. Colinas, and K.A. Pass, *Simultaneous measurement of thyroxine and thyrotropin from newborn dried blood-spot specimens using a multiplexed fluorescent microsphere immunoassay*. Clin Chem, 2000. **46**(9): p. 1422-4.
124. Anderson, G.P., et al., *TNT detection using multiplexed liquid array displacement immunoassays*. Anal Chem, 2006. **78**(7): p. 2279-85.
125. EMEA, *Guideline on bioanalytical method validation*. European Medicines Agency; Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011.
126. FDA, *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation (66 FR 28526)*. Federal Register 2001. **66**(100): p. 28526 - 28527.
127. Saeed, A.I., et al., *TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis*. Biotechniques, 2003. **34**(2): p. 374-8.
128. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
129. Jaffé, M., *Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins*. Z Physiol. Chem., 1886. **10**(5): p. 391-400.

130. LDN, *Anleitung zum Sammeln von Urin für den Dry Urine Test*. <http://www.ldn.de/>.
131. Grubbs, F.E., *Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples*. Technometrics, 1969. **11**(1): p. 1-21.
132. Laederach, K. and P. Weidmann, *Plasma and urinary catecholamines as related to renal function in man*. *Kidney Int*, 1987. **31**(1): p. 107-11.
133. Eisenhofer, G., et al., *Plasma metanephrines in renal failure*. *Kidney Int*, 2005. **67**(2): p. 668-77.
134. Roberts, N.B., et al., *Urinary catecholamine excretion in relation to renal function*. *Ann Clin Biochem*, 1999. **36 (Pt 5)**: p. 587-91.
135. Grouzmann, E. and F. Lamine, *Determination of catecholamines in plasma and urine*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2013. **27**(5): p. 713-23.
136. Sarma, V.R., et al., *The three-dimensional structure at 6 Å resolution of a human gamma G1 immunoglobulin molecule*. *J Biol Chem*, 1971. **246**(11): p. 3753-9.
137. Hendrickson, W.A., et al., *Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(7): p. 2190-4.
138. Quinton, J., et al., *Toward the limits of sandwich immunoassay of very low molecular weight molecules*. *Anal Chem*, 2010. **82**(6): p. 2536-40.
139. Kubota, K., T. Mizukoshi, and H. Miyano, *A new approach for quantitative analysis of L-phenylalanine using a novel semi-sandwich immunometric assay*. *Anal Bioanal Chem*, 2013. **405**(25): p. 8093-103.
140. Eisenhofer, G., et al., *Measurements of plasma methoxytyramine, normetanephrine, and metanephrine as discriminators of different hereditary forms of pheochromocytoma*. *Clin Chem*, 2011. **57**(3): p. 411-20.
141. Procopiou, M., et al., *Evaluation of an enzyme immunoassay for plasma-free metanephrines in the diagnosis of catecholamine-secreting tumors*. *Eur J Endocrinol*, 2009. **161**(1): p. 131-40.
142. Gonta, V., et al., *Large Pheochromocytoma in the Third Trimester of Gestation. Case Report*. *Acta Endo (Buc)*, 2013. **9**(2): p. 307-314.
143. A.D.A.M. *Medical Encyclopedia [Internet]*. Atlanta (GA): A.D.A.M., Inc.; ©2005. Serum serotonin levels; <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003562.htm>.
144. Sebekova, K., M. Raucinova, and R. Dzurik, *Serotonin metabolism in patients with decreased renal function*. *Nephron*, 1989. **53**(3): p. 229-32.
145. Arndt, T., *Urine-creatinine concentration as a marker of urine dilution: reflections using a cohort of 45,000 samples*. *Forensic Sci Int*, 2009. **186**(1-3): p. 48-51.
146. Saenger, A.K., et al., *Catecholamine interference in enzymatic creatinine assays*. *Clin Chem*, 2009. **55**(9): p. 1732-6.
147. Eisenhofer, G., *Editorial: biochemical diagnosis of pheochromocytoma--is it time to switch to plasma-free metanephrines?* *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(2): p. 550-2.
148. Kvetnansky, R., E.L. Sabban, and M. Palkovits, *Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches*. *Physiol Rev*, 2009. **89**(2): p. 535-606.

8. Anhang

Tabelle 45: Ergebnisse der Proteinbestimmung nach Bradford für die Eluate der Antikörperaufreinigung.

Antikörper	Volumen eingesetztes Antiserum [mL]	Eluat 1 [µg]	Eluat 2 [µg]	Eluat 3 [µg]	Eluat 4 [µg]	Gesamt- Ausbeute [µg]
α-3-Methoxytyramin Nr. 3	1,35	42,7	38,2	24,9	20,3	126,1
α-Metanephrin Nr. 7	5,5	228,7	142,2	116,9	78,6	566,4
α-Normetanephrin Nr. 8	1,35	17,3	18,3	23,2	26,2	85,1
α-Serotonin Nr. 10	2,7	201,0	173,9	140,7	106,4	622,0

Tabelle 46: Kreuzreaktivität in % im Catecholamin-Assay. Die Kreuzreaktivität des α-Normetanephrin-Antikörpers Nr. 8 ist stark abhängig von der jeweiligen Antikörperaufreinigungs-Charge. Hier sind die Daten für die Kreuzreaktivität einer anderen Charge des α-Normetanephrin-Antikörpers Nr. 8 aufgeführt als für die Charge, die in Tabelle 33 dargestellt ist.

Substanz	c [ng/mL]	α-3-MT AK Nr. 3	α-MN AK Nr. 7	α-NMN AK Nr. 8
Dopamin	2000	100	0,11	0,10
Adrenalin	200	1,21	100	0,14
Noradrenalin	1000	1,10	0,69	100

Tabelle 47: Messergebnisse für die einzelnen Methoden des Vergleichs zwischen multiplexem Catecholamin-Immunoassay, ELISA und HPLC in den Referenz-Urinproben aus dem Zentrallabor des Universitätsklinikums in Tübingen.

Probe Nr.	Dopamin [ng/mL]			Adrenalin [ng/mL]			Noradrenalin [ng/mL]		
	Multiplex	ELISA	HPLC	Multiplex	ELISA	HPLC	Multiplex	ELISA	HPLC
1	212,4	247,7	197,0	1,6	3,4	< 5	6,6	63,9	63,0
2	286,6	-	279,0	3,3	-	< 5	10,6	-	161,0
3	473,6	494,6	361,0	< 1,6	0,5	< 5	< 0,8	-	-
4	461,4	-	338,0	< 1,6	-	< 5	< 0,8	-	-
5	603,6	713,6	486,0	13,7	13,8	7,2	4,6	50,2	40,0
6	88,9	-	80,0	2,1	-	< 5	3,2	-	30,0
7	190,9	233,2	164,0	2,2	3,8	< 5	3,4	38,0	31,0
8	212,0	246,4	187,0	16,2	11,5	8,8	4,9	59,0	41,0
9	989,9	1087,2	845,0	189,2	115,8	98,0	11,5	118,3	117,0
10	226,8	-	197,0	< 1,6	-	< 5	2,2	-	22,0
11	220,9	-	199,0	< 1,6	-	< 5	2,5	-	22,0
12	146,2	-	124,0	3,9	-	< 5	3,4	-	35,0
13	79,4	145,6	81,0	2,9	3,2	< 5	1,8	32,0	22,0
14	77,3	-	80,0	1,6	-	< 5	1,6	-	22,0
15	116,8	-	115,0	3,0	-	< 5	1,1	-	13,0
16	148,1	-	97,0	3,6	-	< 5	6,7	-	69,0
17	382,1	521,4	346,0	3,2	7,3	< 5	5,0	72,1	71,0
18	214,5	-	211,0	2,2	-	< 5	3,6	-	48,0
19	187,8	-	169,0	4,4	-	< 5	2,8	-	35,0
20	204,8	-	143,0	3,0	-	< 5	3,8	-	38,0
21	102,9	133,3	100,0	< 1,6	1,6	< 5	1,0	22,5	13,0
22	197,1	-	177,0	< 1,6	-	< 5	1,8	-	21,0
23	132,7	-	108,0	< 1,6	-	< 5	1,1	-	12,0
24	97,2	-	93,0	< 1,6	-	< 5	1,1	-	13,0
25	83,3	-	61,0	< 1,6	-	< 5	< 0,8	-	6,0
26	333,6	-	304,0	5,0	-	< 5	5,6	-	61,0
27	86,2	117,2	84,0	2,9	3,2	< 5	1,6	19,8	14,0
28	221,7	-	201,0	< 1,6	-	< 5	3,6	-	35,0
29	173,0	-	158,0	< 1,6	-	< 5	2,4	-	23,0
30	91,9	-	103,0	< 1,6	-	< 5	1,6	-	16,0
31	676,1	1001,3	-	6,9	12,1	-	3,9	71,2	-

Tabelle 48: Messergebnisse für die einzelnen Methoden des Vergleichs zwischen multiplexem Metanephrin/Serotonin-Immunoassay, ELISA und HPLC in den Referenz-Urinproben aus dem Zentrallabor des Universitätsklinikums in Tübingen.

Probe Nr.	Metanephrin [ng/mL]			Normetanephrin [ng/mL]			Serotonin [ng/mL]		
	Multiplex	ELISA	HPLC	Multiplex	ELISA	HPLC	Multiplex	ELISA	HPLC
1	7,7	32,0	30,0	17,6	70,7	282,0	61,1	95,0	-
2	9,1	-	63,0	30,3	-	519,0	120,8	-	-
3	15,4	11,6	-	15,7	6,3	-	25,0	39,0	-
4	12,9	-	-	14,5	-	-	18,0	-	-
5	28,3	55,0	100,0	15,6	44,8	294,0	175,9	297,1	-
6	5,9	-	39,0	6,0	-	132,0	25,9	-	-
7	5,2	18,1	32,0	6,8	40,6	144,0	35,5	80,5	-
8	11,2	22,5	72,0	10,7	63,9	234,0	46,2	50,8	-
9	878,4	976,4	9747,0	66,3	992,8	4752,0	118,5	159,6	-
10	7,4	-	35,0	7,8	-	105,0	34,7	-	-
11	6,5	-	30,0	7,0	-	101,0	34,7	-	-
12	11,9	-	51,0	12,0	-	160,0	68,6	-	-
13	6,9	20,7	48,0	6,6	41,1	117,0	30,5	43,3	-
14	6,7	-	45,0	6,2	-	129,0	30,5	-	-
15	11,5	-	47,0	4,6	-	61,0	51,8	-	-
16	7,5	-	-	16,8	-	-	88,0	-	-
17	13,0	40,5	23,0	15,1	92,9	77,0	122,0	288,8	-
18	7,0	-	34,0	13,4	-	242,0	47,9	-	-
19	8,4	-	42,0	7,4	-	138,0	56,6	-	-
20	12,4	-	107,0	10,6	-	231,0	55,5	-	-
21	3,8	10,5	19,0	3,8	15,6	70,0	51,9	73,2	-
22	5,7	-	23,0	6,5	-	96,0	102,4	-	-
23	11,0	-	49,0	4,6	-	60,0	48,6	-	-
24	4,8	-	27,0	4,9	-	83,0	47,0	-	-
25	9,7	-	24,0	10,1	-	54,0	41,1	-	-
26	11,2	-	45,0	14,4	-	209,0	151,8	-	-
27	5,3	19,3	23,0	4,2	17,8	69,0	42,1	54,5	-
28	3,1	-	12,0	6,2	-	97,0	123,5	-	-
29	3,5	-	33,0	5,6	-	104,0	108,1	-	-
30	5,7	-	35,0	4,6	-	81,0	33,9	-	-
31	19,4	61,3	-	10,7	87,6	-	230,7	320,1	-



9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nadja Baur

Schulische und universitäre Ausbildung

- 03.2010 – 12.2013 Promotion im Fach Biochemie am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen, Abteilung Biochemie in Reutlingen
Thema der Dissertation: Multiplexe Immunoassays zur Quantifizierung von biogenen Aminen
Betreuer: Prof. Stefan Stevanović, Dr. Thomas Joos, Dr. Nicole Schneiderhan-Marra
- 09.2012 Forschungsaufenthalt bei Myriad RBM, Saranac Lake, NY, USA
Aufgaben: Entwicklung multiplexer Immunoassays für die Quantifizierung von biogenen Aminen aus *Dry Urine Test*-Filterkarten
Betreuer: Laurie Stephen, PhD
- 10.2004 – 02.2010 Studium der Biochemie an der Eberhard Karls Universität in Tübingen
Schwerpunkte: Pharmazeutische Chemie und Toxikologie
Diplomarbeit: angefertigt am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen, Abteilung Biochemie in Reutlingen
Thema der Diplomarbeit: Stabilisierung von Concanavalin A zur Stimulation von Vollblut kombiniert mit multiplexer Proteinanalytik
Betreuer: Dr. Thomas Joos, Dr. Nicole Schneiderhan-Marra
Abschluss: Diplom

- 04.2008 – 09.2008 Praktisches Studienhalbjahr am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried und an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
- Arbeitsgruppe von Zuzana Storchova, PhD: Erforschung der Mechanismen der Zellzyklusregulation in Hefe
 - Arbeitsgruppe von Prof. Elena Conti: Sf9 Insektenzell-Expression von Proteinen des gamma-Tubulin Komplexes aus *Drosophila melanogaster*
 - Arbeitsgruppe von Dr. Friedrich Lottspeich: Analyse eines Standardproteingemisches mit der ICPL-Quadruplex-Methode
 - Arbeitsgruppe von Prof. Franz Bracher: Synthese von potentiell cytotoxischen Bauerin-C-Derivaten
- 09.1995 – 06.2004 Allgemeinbildendes Gymnasium der Liebfrauenschule in Sigmaringen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

10. Wissenschaftliche Arbeiten

Publikationen

Gottheil R, Baur N, Becker H, Link G, Maier D, Schneiderhan-Marra N, Stelzle M
Moving the solid phase: a platform technology for cartridge based sandwich
immunoassays.
Biomed Microdevices, 2013

Schmohl M, Schneiderhan-Marra N, Baur N, Hefner K, Blum M, Stein GM, Joos TO,
Schmolz M
Characterization of immunologically active drugs in a novel organotypic co-culture model
of the human gut and whole blood.
Int Immunopharmacol, 2012

Posterpräsentationen

Baur N, Schneiderhan-Marra N, Bootink E, Manz G, Joos TO, Manz B
Multiplex Immunoassay for Catecholamines in urine.
Dechema-Tagung "Functional Genomics and Proteomics – Applications, Molecular
Diagnostics & Personalized Medicine", Frankfurt am Main, 2013

Baur N, Schneiderhan-Marra N, Bootink E, Manz G, Joos TO, Manz B
Multiplex Immunoassay for Catecholamines.
"The Tenth International Catecholamine Symposium", Pacific Grove, CA, USA, 2012

Aroner SA, Rosner B, Tamimi RM, Tworoger SS, Baur N, Joos TO, Hankinson SE
Plasma Matrix Metalloproteinase-2 and Risk of Invasive Breast Cancer in the Nurses'
Health Study.
"Dana Farber/ Harvard Cancer Center", Boston, MA, USA, 2012

Weiterbildung

SPHINX Clinical epidemiology and Biomarker discovery Workshop
Institut Pasteur de Tunis, Tunesien, 2012

