

4.2. Herstellung spezifischer Antikörper

Gegen die Peptide PENK A₁₃₉₋₁₅₅, PENK A₁₉₁₋₂₀₅ und PENK A₂₂₀₋₂₃₆ wurden polyklonale (pk) Schafantikörper von der Firma Micropharm Ltd. produziert. Kaninchenantiseren gegen die Peptide PTA₃₋₂₂, PTA₂₁₋₃₆, PTA₅₃₋₆₆ und PTA₇₆₋₈₉ wurden von der Firma Biogenes GmbH hergestellt. Monoklonale (mk) Antikörper gegen das Peptid PENK A₁₂₁₋₁₃₄ wurden von der Firma InVivo BioTech Services GmbH hergestellt und mittels Protein G aufgereinigt.

4.2.1. Aufreinigung spezifischer pk Antikörper mittels Affinitätschromatographie

Zunächst wurden die Peptide PENK A₁₃₉₋₁₅₅, PENK A₁₉₁₋₂₀₅ und PENK A₂₂₀₋₂₃₆ sowie PTA₃₋₂₂, PTA₂₁₋₃₆, PTA₅₃₋₆₆ und PTA₇₆₋₈₉ an SulfoLink-Coupling-Gel gekoppelt. Es wurde hierbei in Anlehnung an die Arbeitsanleitung der Firma Pierce vorgegangen. Über die Iodacetylgruppen des SulfoLink-Coupling-Gels werden die Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) der Peptide kovalent gebunden. Die Aminosäure Cystein, die eine solche SH-Gruppe enthält, wurde zu diesem Zweck an das aminoternale Ende der Immunisierungspeptide synthetisiert.

Polycarbonatsäulen (Höhe 80 mm, Ø 16 mm) wurden mit je 10 ml der SulfoLink-Coupling-Gelsuspension, was einem Säulenvolumen von 5 ml entspricht, befüllt und mit Kopplungspuffer äquilibriert. 5 mg der jeweiligen Peptide (Bindungskapazität 1 mg Peptid pro 1 ml Säulenvolumen) wurden in 5 ml Kopplungspuffer gelöst, auf das Säulenmaterial gegeben und 15 min bei Raumtemperatur (RT) und leichtem Schwenken auf einem Rotator (speed low 5) inkubiert. Anschließend wurden die Säulen mit Kopplungspuffer gewaschen und zur Absättigung der freien Bindungsstellen mit je 5 ml einer 50 mM L-Cystein-Lösung für 15 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Um alle ionischen Bindungen zu entfernen, so dass nur die kovalenten Bindungen erhalten bleiben, wurde jede Säule mit dem 6fachen Säulenvolumen eines 1 M NaCl-Waschpuffers gespült. Nach dem Spülen der Säulen mit 15 ml NaN₃-Lagerungspuffer wurden die Peptidsäulen bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Von allen Abnahmen jedes Schaf- bzw. Kaninchenantiserums wurde ein Antiserumgemisch hergestellt. Je 50 ml Schafantiserum und 25 ml Kaninchenantiserum wurden mit Na-EDTA versetzt (Endkonzentration 5 mM), homogenisiert und für 30 min bei 4 °C und 2000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Antiseren durch einen 0,45 µM-Filter filtriert und mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail versetzt, um die Proteine vor dem Abbau durch Proteasen zu schützen.

Das jeweilige Schaf- bzw. Kaninchenantiserum wurde mit dem entsprechenden, an SulfoLink-Coupling-Gel gekoppelten, Peptid versetzt und über Nacht bei RT und unter leichtem Schwenken inkubiert. Das Serum-Gel-Gemisch wurde in die Polycarbonatsäulen überführt und der Durchlauf verworfen. Die jeweilige Säule wurde für die weitere Aufreinigung an eine Biotech-Pumpe (Flussrate 150 ml pro h) angeschlossen. Um alle nicht gebundenen Serumproteine zu entfernen, wurden die Säulen mit 300 ml Bindungspuffer gewaschen. Zur Überprüfung des Restproteingehalts wurde die Absorption des Bindungspuffers mit einer Biotech-Uvicord bei 280 nm verfolgt. Die Elution erfolgte mit 50 mM Citronensäure (pH 2,2) bei einer Flußrate von 50 ml pro h. Der Proteinpeak wurde auf Halbwertsbreite gesammelt. Die im sauren vorliegenden Antikörper wurden mit einer Nap10-Gelfiltrationssäule in PBS (pH 7,4) umgepuffert, durch einen 0,2 µm-Filter filtriert und die Proteinkonzentration photometrisch bei 280 nm bestimmt.

4.2.2. Qualitätskontrolle der gereinigten pk Antikörper mittels SDS-PAGE

Um zu überprüfen, ob die affinitätsgereinigten pk Antikörper Degradationen aufweisen, wurden die Antikörperlösungen auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die leichten und schweren Antikörperketten entsprechend ihrer Molekülgröße getrennt. Hierfür wurden je 10 µg des jeweiligen Antikörpers mit 1 M Tris pH 7,8 auf 10 µl aufgestockt, anschließend mit 10 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C auf dem Thermomixer inkubiert. Die Proben wurden für 10 s bei 2000 x g zentrifugiert und je 10 µl pro Probe auf ein 15 %iges Acrylamidgel aufgetragen. Die Protein-Ladder von MBI Fermentas, die Proteine mit einer Molekülgröße zwischen 10 und 200 kDa enthielt, diente als Standard. Der Gellauf wurde bei 150 V und 50 mA für eine Stunde durchgeführt. Die Färbung des Gels erfolgte für 60 min mit Coomassie-Färbelösung. Die Entfärbung des Gels wurde durch Inkubation des Gels für 2 h in methanol- und eisessighaltiger Entfärbungslösung erreicht.

4.3. Markierung der Antikörper mit dem Acridiniumester MACN

Der Chemilumineszenzfarbstoff MACN, ein so genannter Acridiniumester, kann leicht mit Proteinen und Antikörpern konjugiert werden. Die Lichtemission dieser Konjugate wird ausgelöst durch die Zugabe einer sauren Wasserstoffperoxidlösung und anschließender Zugabe einer Natriumhydroxid-Lösung (Ronald and Stimson, 1998). Hierbei zerfällt der Acridiniumester in N-Methyl-Acridon, das Licht bei einer Wellenlänge von 430 nm emittiert (siehe Abb. 9).

Die gereinigten Antikörper wurden mit MACN in einem Verhältnis 1:2,5 markiert. Die jeweilige Antikörperlösung wurde mit der entsprechenden Menge MACN im molaren Verhältnis versetzt und für 20 min bei RT auf einem Schüttler lichtgeschützt bei 300 rpm inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 M Tris-Lösung verwendet. Der markierte Antikörper wurde zunächst von freiem MACN durch Gelfiltration mit Hilfe einer Nap10-Säule getrennt und anschließend auf eine HPLC-Gelfiltrationssäule aufgetragen (Flußrate 0,8 ml pro min, Druck ca. 300 psi). Es wurden zwei Detektionswellenlängen eingestellt: 368 nm zur Detektion des MACN und 280 nm zur Detektion des Antikörpers. Der jeweilige Markierungsansatz wurde auf die Gelfiltrationssäule gegeben und der markierte Immunglobulinpeak in 4 ml einer 5 %igen BSA-Lösung aufgefangen. Die Tracerkonzentrate wurden in einer geeigneten Verdünnung in Assaypuffer luminometrisch vermessen und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Berechnung der Anzahl der MACN-Markierungen pro IgG-Molekül erfolgte mittels Kalibration über bekannte Markierungsgrade.

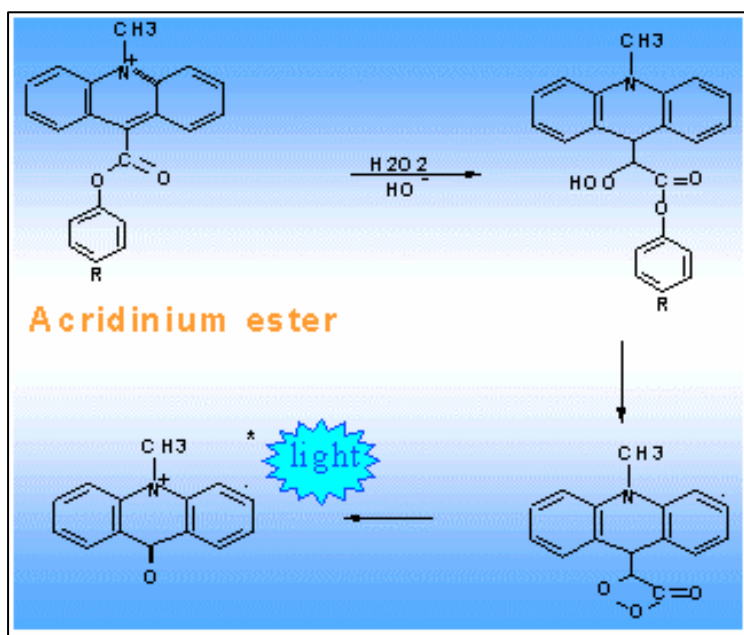


Abb. 9: Schematische Darstellung der Acridiniumester-Reaktion

[aus www.myweb.ncku.edu.tw/.../result/sp4/perform_4-1.htm] vom 04.12.2006

4.4. Immobilisierung von Antikörpern an Polystyrenröhrchen

Für die direkte Immobilisierung wurden die aufgereinigten Antikörper in Immobilisierungspuffer bis zur gewünschten Konzentration verdünnt und je 300 µl in Polystyrenröhrchen gegeben. Für die indirekte Immobilisierung der spezifischen monoklonalen Antikörper wurde zunächst goat-anti-mouse-Antikörper (3 µg pro 300 µl Kopplungspuffer) direkt auf Polystyrenröhrchen gegeben. Die Adsorption der Antikörper erfolgte für 24 Stunden bei RT. Anschließend wurde die Antikörperlösung abgesaugt und jedes Röhrchen für 2 h mit 4,5 ml Absättigungslösung, zur Abdeckung freier Bindungsstellen auf der Röhrchenwand, gefüllt. Die Röhrchen wurden vakuumgetrocknet und bis zum Gebrauch verschlossen bei 4 °C aufbewahrt. Der mk PENK A₁₂₁₋₁₃₄-Antikörper wurde in gewünschter Konzentration in die mit goat-anti-mouse-Antikörper beschichteten Röhrchen pipettiert und, wie oben beschrieben, inkubiert, abgesättigt und getrocknet.

4.5. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Antikörperlösungen erfolgte photometrisch bei 280 nm. Der Extinktionskoeffizient ϵ von IgG liegt bei 1,35. Die Methode beruht auf der Extinktion der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan bei 280 nm. Die Konzentration der Antikörperlösung ergibt sich aus folgender Formel von Warburg und Christian (Warburg, 1941):

$$c \text{ (mg/ml)} = E_{280} / \epsilon_{\text{IgG}}$$

c ... Proteinkonzentration

E ... Extintion

ϵ_{IgG} ... spezifischer Extinktionskoeffizient (1,35)

4.6. Präparation von Serum-, EDTA-Plasma-, Heparin-Plasma- und CSF- Proben

Blutproben von gesunden Blutspendern bzw. Patienten wurden in Serum-, EDTA-Plasma- bzw. Heparin-Plasma-Monovetten der Firma Sarstedt entnommen. Die Serum-Monovetten wurden zur vollständigen Koagulation für 30 min bei RT stehend gelagert und anschließend für 15 min bei 4 °C und 2000 x g zentrifugiert. Die EDTA- und Heparin-Plasma-Monovetten wurden sofort nach Abnahme für 15 min bei 4 °C und 3000 x g zentrifugiert. Nach Zentrifugation der Monovetten wurde das Serum bzw. Plasma vom Blutkuchen getrennt und in Aliquoten bei –20 °C bis zur Vermessung gelagert.

Die CSF-Proben der Patienten wurden in Polystyrenröhrchen auf Eis entnommen und sofort nach Abnahme für 10 min bei 4 °C und 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in Aliquoten bei –80 °C bis zur Untersuchung gelagert.

4.7. Immunoassayentwicklung

Für die Detektion stabiler PENK A- und PTA-Fragmenten sollen zwei heterogene nicht-kompetitive Immunoassays, so genannte Sandwich-Immunoassays, entwickelt werden (siehe Abb. 10). Das Antigen wird dabei von zwei Antikörpern gebunden, die beide im Überschuss vorhanden sind. Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist, dass der Analyt mindestens zwei voneinander räumlich getrennte Epitope für die Antikörper trägt. Ein Antikörper wird zunächst auf einem Träger immobilisiert (siehe Kapitel 4.4.). Anschließend gibt man die Probe mit dem Analyten hinzu, wobei dieser an den stationären Antikörper bindet. Nach einem Waschschrift gibt man den zweiten markierten Antikörper hinzu (siehe Kapitel 4.3.), der ein anderes Epitop des gebundenen Analyten erkennt. Die Signalintensität ist direkt proportional zur Menge des in der Probe enthaltenen Analyten. Der Vorteil dieses Assayformats besteht in seiner hohen Spezifität, da das Antigen an beide Antikörper binden muss, um ein messbares Signal zu generieren (Ronald and Stimson, 1998). Die Antikörperreaktion kann auch in einem Schritt ohne Waschschrift erfolgen.

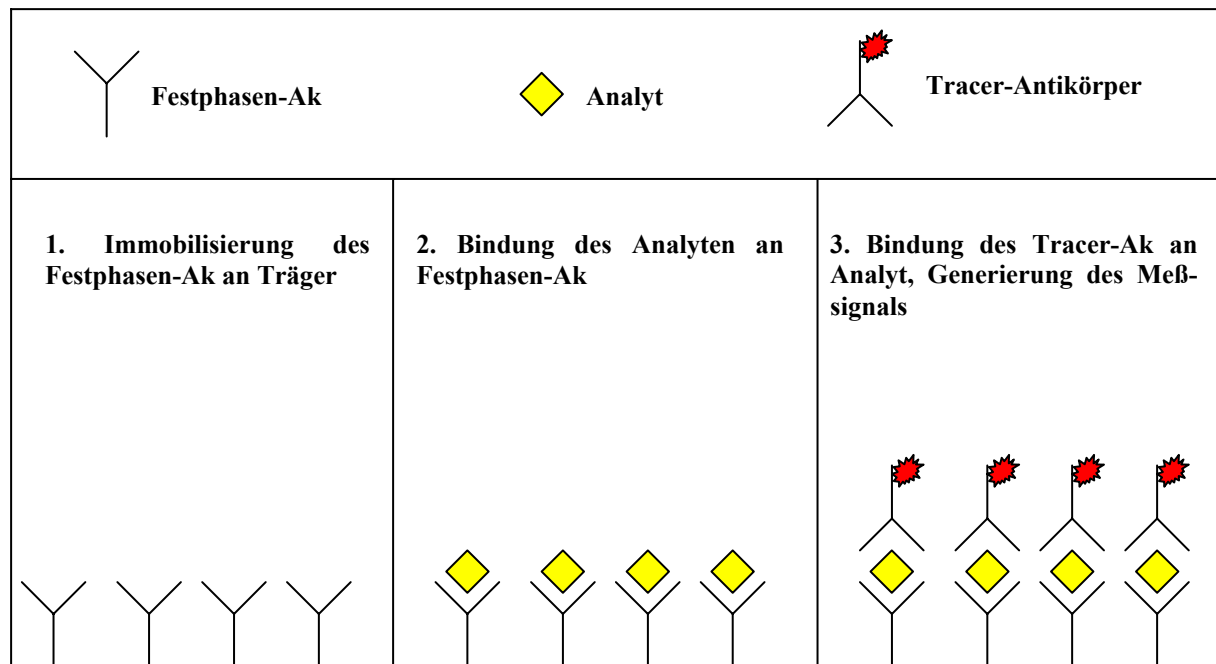


Abb. 10: Schematische Darstellung eines heterogenen nicht-kompetitiven Immunoassays (Sandwich-Assay)

Für die Entwicklung der Immunoassays erfolgte die Inkubation der Teströhrchen stets unter Schütteln bei 300 rpm. Nach der Probeninkubation wurden die Röhrchen 3mal, nach der Tracerinkubation 5mal mit je 1 ml Waschlösung befüllt und dekantiert. Die emittierten Lumineszenzsignale wurden nach automatischer Zugabe von je 300 μ l der LUMItest Basiskit-Reagenzien 1 und 2 im Luminometer gemessen. Alle Messwerte sind Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung.

4.7.1. Immunoassayentwicklung zur Detektion von stabilen PENK A-Fragmenten

Für die Entwicklung eines Sandwich-Immunoassays zur Detektion von stabilen PENK A-Fragmenten standen insgesamt 10 Antikörper zur Verfügung, woraus sich 90 verschiedene Antikörperkombinationen ergaben. Die 9 pk Schafantikörper wurden direkt auf Polystyrenröhrchen, der mk Antikörper anti-PENK A₁₂₁₋₁₃₄ (50-3-7) indirekt auf mit goat-anti-mouse-beschichteten Röhrchen immobilisiert (je 2 μ g Antikörper pro Röhrchen). Rekombinantes PENK A (r-PENK A), das in Form von *E.coli*-Extrakt vorlag, wurde mit Pferdeserum verdünnt und zunächst im Zwei-Schritt-Assay auf Bindung getestet. Hierfür wurden pro Röhrchen 100 μ l Probe mit 100 μ l Assaypuffer für 20 h bei 4 °C inkubiert, anschließend gewaschen und mit 200 μ l Tracerantikörperlösung (mit 10 ng markiertem Antikörper) befüllt und für weitere 2 h inkubiert. Der Test im Ein-Schritt-Assayformat erfolgte durch Inkubation von je 100 μ l Probe sowie 100 μ l Traceranti-

körperlösung, eingestellt auf 10 ng des jeweiligen markierten Antikörpers pro Bestimmung, für 20 h bei 4°C.

Anhand der Testergebnisse mit r-PENK A wurde die Antikörperkombination anti-PENK A₁₂₁₋₁₃₄ (50-3-7) als Festphasenantikörper und anti-PENK A₁₃₉₋₁₅₅ (CF108) als Flüssigphasenantikörper ausgewählt. Für die Kalibrierung des PENK A-Immunoassays wurde das Peptid PENK A₁₁₉₋₁₅₉, das die Sequenzen der Immunisierungspeptide PENK A₁₂₁₋₁₃₄ und PENK A₁₃₉₋₁₅₅ enthält, von der Firma Jerini AG synthetisch hergestellt. Dieses Peptid wurde in Stammlösungspuffer in Konzentrationen zwischen 0 und 2.500 pmol/l hergestellt und anschließend im Gefriertrockner lyophilisiert.

Der Ein-Schritt-Immunoassay wurde hinsichtlich der Inkubationszeit, der Antikörperbeschichtung, der markierten Antikörpermenge und des Tracer- sowie des Probevolumens optimiert. Der PENK A-Immunoassay für die Detektion von endogener PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Immunreaktivität wurde im Weiteren wie folgt angesetzt: 100 µl Standardpeptidlösung bzw. Probe sowie 100 µl Tracerantikörperlösung (eingestellt auf 10 ng des markierten Antikörpers) wurden in Röhrchen mit indirekt immobilisiertem anti-PENK A₁₂₁₋₁₃₄ (je 0,5 µg Antikörper) gegeben, für 20 h bei RT inkubiert und anschließend im Luminometer vermessen. Für die Bestimmung der PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Konzentration im Serum bzw. Plasma wurde Pferdeserum und für die Vermessung der CSF-Proben Assaypuffer für die Rekonstitution der Peptidstandards verwendet. Die CSF-Proben wurden in Assaypuffer 1:20 vorverdünnt, die Serum- und Plasmaproben unverdünnt im Assay eingesetzt.

4.7.2. Immunoassayentwicklung zur Detektion von stabilen PTA-Fragmenten

Für die Auswahl einer geeigneten Antikörperkombination wurden native Patientenproben verwendet, da kein rekombinantes PTA zur Verfügung stand. Es wurden je 5 EDTA-Plasmaproben von gesunden Blutspendern und Alzheimerpatienten sowie 3 CSF-Proben von Patienten ohne neurologische Störungen verwendet.

Für jedes der 4 PTA-spezifischen Peptide standen zwei Kaninchenantikörper zur Verfügung (siehe Tabelle 7), die zunächst als Gemische eingesetzt wurden. Die Antikörper anti-PTA₂₁₋₃₆, anti-PTA₅₃₋₆₆ und anti-PTA₇₆₋₈₉ wurden direkt auf Röhrchen immobilisiert (2 µg pro Röhrchen). Ein Gemisch aus den markierten Antikörpern gegen das PTA₃₋₂₁-Peptid (je 10 ng pro Antikörper) wurde als Tracer eingesetzt. Pro Röhrchen wurden 100 µl Probe und 100 µl Assaypuffer für 20 h bei 4 °C inkubiert, 3mal mit je 1 ml Waschlösung gewaschen und anschlie-

ßend mit je 200 µl Tracer für 2 h bei 4 °C inkubiert. Anhand der Testergebnisse mit nativen Patientenproben wurden die Antikörper anti-PTA₃₋₂₂ und anti-PTA₂₁₋₃₆ ausgewählt. Für die Kalibrierung des PTA-Immunoassays wurde das Peptid PTA₁₋₃₇, das die Sequenzen der Immunisierungspeptide PTA₃₋₂₂ und PTA₂₁₋₃₆ enthält, von der Firma Jerini AG synthetisch hergestellt. Dieses Peptid wurde in Stammlösungspuffer in Konzentrationen zwischen 0 und 3.000 pmol/l hergestellt und anschließend im Gefriertrockner lyophilisiert.

Es standen je zwei spezifische Kaninchenantikörper gegen die Peptide PTA₃₋₂₂ und PTA₂₁₋₃₆ (5194 und 5195 sowie 5196 und 5197) zur Verfügung, woraus sich 8 mögliche Antikörperkombinationen ergaben. Diese wurden im Ein-Schritt-Assayformat getestet. Hierfür wurden die Röhrchen direkt mit je 2 µg Antikörper beschichtet, die Traceransätze auf 10 ng des jeweiligen markierten Antikörpers pro Röhrchen eingestellt und je 100 µl PTA₁₋₃₇-Peptidlösung mit 100 µl Tracerlösung für 20 h bei 4 °C inkubiert.

Der Ein-Schritt-Immunoassay unter Verwendung der Antikörper anti-PTA₂₁₋₃₆ als Festphase sowie des Antikörpers anti-PTA₃₋₂₁ als Flüssigphase wurde hinsichtlich der Inkubationszeit, der Inkubationstemperatur, der Menge des markierten Antikörpers sowie des Tracer- und Probevolumens optimiert. Der PTA-Immunoassay zur Detektion endogener PTA₁₋₃₇-Immunreaktivität wurde im Weiteren wie folgt angesetzt: 100 µl Standardpeptidlösung bzw. Probe sowie 200 µl Tracerantikörperlösung (eingestellt auf 5 ng des markierten Antikörpers) wurden in Röhrchen mit direkt immobilisiertem anti-PTA₂₁₋₃₆ (je 2 µg Antikörper) gegeben, für 20 h bei 4 °C inkubiert und anschließend im Luminometer vermessen. Das PTA₁₋₃₇-Peptid wurde in Assaypuffer rekonstituiert. Die CSF-Proben wurden in Assaypuffer 1:5 vorverdünnt, die Serum- und Plasmaproben unverdünnt im Assay eingesetzt.

4.8. Stabilität der Analyten und Vergleich verschiedener Probenmatrices

Zur Bestimmung der Stabilität von endogenem PENK A₁₁₉₋₁₅₉ bzw. PTA₁₋₃₇ in humanen Serum-, EDTA-Plasma- und Heparin-Plasmaproben wurden 5 frisch präparierte Proben von gesunden Blutspendern pro Matrix für bis zu 48 h bei Raumtemperatur gelagert. Aliquote wurden sofort nach der Probenpräparation als Referenz sowie nach 2, 4, 6, 24 und 48 h Inkubation entnommen und bei -20 °C gelagert. Die Vermessung aller Proben erfolgte in den unter 4.7.1. und 4.7.2. beschriebenen optimierten Immunoassays. Der Referenzwert zum Zeitpunkt Null wurde für jede Probe als 100 % definiert. Die mittleren prozentualen Messwerte (+/- SD) wurden für

jeden Zeitpunkt und jede Matrix berechnet. Analog wurden drei CSF-Proben von Patienten ohne neurologische Störung auf Stabilität getestet.

Um die Messwerte in den verschiedenen Matrices zu vergleichen, wurden von je 5 gesunden Blutspendern parallel Serum-, EDTA-Plasma- sowie Heparin-Plasmaproben präpariert und die prozentuale Abweichung der Messwerte untereinander verglichen.

4.9. Reversed-Phase HPLC

Um die endogenen Proneuropeptide zu charakterisieren, fand die Methode der Reversed-Phase-Hochdruck-Flüssigchromatographie (RP-HPLC) Anwendung. Bei der RP-HPLC findet eine hydrophobe Wechselwirkung des in der Probe befindlichen Analyten mit der unpolaren stationären Phase im polaren, wässrigen Lösungsmittel statt. Die Elution erfolgte mit Hilfe des unpolaren organischen Lösungsmittels Acetonitril, das mit dem adsorbierten Molekül um die Bindungsstelle konkurrierte. Serum-, EDTA-Plasma- und CSF-Proben wurden mittels analytischer RP-HPLC untersucht. Parallel wurden die Standardpeptide PENK A₁₁₉₋₁₅₉ und PTA₁₋₃₇ mitgeführt. Das jeweilige Probenmaterial wurde zunächst 1:5 mit dem HPLC-Laufmittel A verdünnt und durch einen 0,45 µm-Filter filtriert. Dieses Filtrat wurde auf eine µBondapak C₁₈-Säule appliziert und mit einem linearen Acetonitril-Gradienten von 5 bis 95 % innerhalb von 35 min bei einer Flussrate von 1 ml pro min eluiert. Fraktionen mit einem Volumen von je 1 ml wurden gesammelt und in einer SpeedVac vakuumgetrocknet. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen in je 220 µl Assaypuffer resuspendiert und neutralisiert und die Immunreaktivität (IR) im optimierten PENK A₁₁₉₋₁₅₉- bzw. PTA₁₋₃₇-Immunoassay vermessen.

4.10. Immunoassay zur Detektion von PCT (PCTsensitiv)

Für die Bestimmung von Procalcitonin stand ein kommerziell erhältlicher Immunoassay (PCTsensitiv) der Firma BRAHMS zur Verfügung. Für diesen Immunoassay wird ein mk Antikörper spezifisch für den Katalcalcin-Teil als Festphasenantikörper und ein pk Schafantikörper spezifisch für den Calcitonin-Teil des PCT-Moleküls als Flüssigphasenantikörper verwendet (Morgenthaler et al., 2002a; Morgenthaler et al., 2002b). Humanes rekombinantes PCT (AS 1 bis 115) verdünnt in Pferdeserum dient als Kalibrator. Da die Totalprotein-Konzentration im CSF nur ungefähr 0,5 % der des Blutes beträgt (Reiber, 1998), wurde im Rahmen dieser Arbeit das

PCT-Standardmaterial für die Vermessung von CSF-Proben in Assaypuffer statt Pferdeserum verdünnt, um diese geringe Proteinkonzentration nachzuahmen.

Je 50 µl der Standardlösungen, der Kontrollen sowie der Proben wurden in antikörperbeschichtete Röhrchen gegeben und für 30 min bei RT ohne Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 200 µl Tracerlösung und die Inkubation der Röhrchen für 2 h bei RT unter Schütteln (300 rpm). Nach Ablauf der Inkubationsphase wurden die Röhrchen 5mal mit je 1 ml Waschlösung befüllt, dekantiert und luminometrisch vermessen.

4.11. Statistische Verfahren

Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism (Version 4.05) durchgeführt.

Der Vergleich der Daten erfolgte mit dem Mann-Whitney U- oder dem Kruskal-Wallis-Test. Dem Kruskal-Wallis-Test, der eine Aussage darüber trifft, ob sich mehrere Gruppen überhaupt signifikant voneinander unterscheiden, wurde der Dunn's-Post-Test angeschlossen, um eine Aussage über das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu erhalten. Die Normalverteilung der Messwerte wurde mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests überprüft. Für die Bestimmung von statistischen Ausreißern wurde der Test nach Grubb's verwendet.

Die Receiver operating characteristics (ROC)-Analyse wurde durchgeführt, um eine optimale Entscheidungsschwelle für die Unterscheidung zwischen Kontrollen und Patienten zu treffen. Sie gibt einen Überblick über die Sensitivität und Spezifität eines diagnostischen Tests. Sensitivitäts- und Spezifitätspaare wurden durch Variation der Entscheidungsschwelle über den gesamten Konzentrationsbereich des jeweiligen Parameters berechnet. Die Sensitivität ist ein Maß dafür, wie viele richtig positive Befunde ein Test liefert, verglichen mit der Anzahl aller Erkrankten. Die Spezifität gibt an, wie viele Patienten vom Test als richtig gesund erkannt wurden, gemessen an der Anzahl aller Gesunden. Die Fläche unter der ROC-Kurve (Area under the curve, AUC) ist dabei das Maß. Die Fläche kann Werte zwischen 0,5 und 1,0 annehmen.

Die Berechnung von Korrelationen erfolgte mit der Spearman Rank-Korrelation. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant betrachtet.