

## **1.1 Mechanismen der inflammatorischen Reaktion und Meßgrößen ihrer Aktivität**

Inflammatorische Reaktionen gehören zu den fundamentalen protektiven Systemleistungen hochorganisierter Organismen und stellen eine kritische Komponente aller Genesungsprozesse dar. Der Entzündungsprozess ist eine komplexe zelluläre und molekulare Reaktion mit der Zielsetzung, die Ausbreitung einer Gewebeschädigung oder eines Infektionserregers einzudämmen und die körperliche Integrität wiederherzustellen. Die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen, die Adhäsion von Granulozyten am Endothel und die chemotaktische Extravasation und Akkumulation von aktivierten Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten sind die zentralen Vorgänge in der Pathogenese einer akuten inflammatorischen Reaktion. Systemische Partialfunktionen sind die Auslösung von Fieber, die verstärkte Proliferation und Ausschüttung von Zellen der Hämatopoese, die Synthese von Akute Phase Proteinen und die Stimulierung der Glukokortikoidsekretion als Teil einer neuroendokrinen Aktivitätssteigerung. Wesentliche Elemente der Entzündungsantwort, insbesondere das Ausmaß und die Dauer der inflammatorischen Wirtsreaktion, werden durch Zytokine reguliert. Die neuen Erkenntnisse über Zytokine als Signalproteine der zellulären Interaktion und ihre Rolle im Rahmen der Inflammation haben zu einem neuen Sepsisverständnis geführt. Als Sepsis wird heute eine unkontrollierte generalisierte Inflammation infektiöser Ätiologie verstanden, die über noch nicht endgültig geklärte Pathomechanismen zu infektionsortfernen Organdysfunktionen führt, deren Manifestationen als wichtigstes Kriterium für die Diagnosestellung verwendet werden. Da kategoriale Diagnosen als Indikationsgrundlage für inflammationsmodulierende Therapiestrategien bei der Behandlung bedrohlicher Infektionen als nicht ausreichend betrachtet werden müssen, ist die Suche nach neuen Meßparametern der Aktivität inflammatorischer Prozesse und ihre Validierung ein dringendes und wichtiges Forschungsziel (69).

## 1.2 Charakterisierung von Prokalzitonin (ProCT)

### Chemische Struktur

Prokalzitonin ist ein Protein aus 116 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 12,8 kD. Unter physiologischen Bedingungen ist es das Prohormon von Kalzitonin. ProCT setzt sich aus einer N-terminalen Region AminoproCT (Synonym: PAS-57, AS 1-57), einer mittleren Region, dem unreifen Kalzitonin (CT, AS 60-91) und dem Kalzitonin-carboxyterminalen Peptid I (CCP-I, Synonym: PAS 21 oder Katakalin, AS 96-116) zusammen (12, 13, 39, 41, 84, 97, 101). AminoproCT ist durch ein Dipeptid (Lys-Arg) mit Kalzitonin verbunden. Kalzitonin besitzt am C-terminalen Ende eine amidierte Aminosäure (Gly), die Kalzitonin durch ein Tripeptid (Lys-Lys-Arg) mit CCP-I verbindet (Abb. 1).

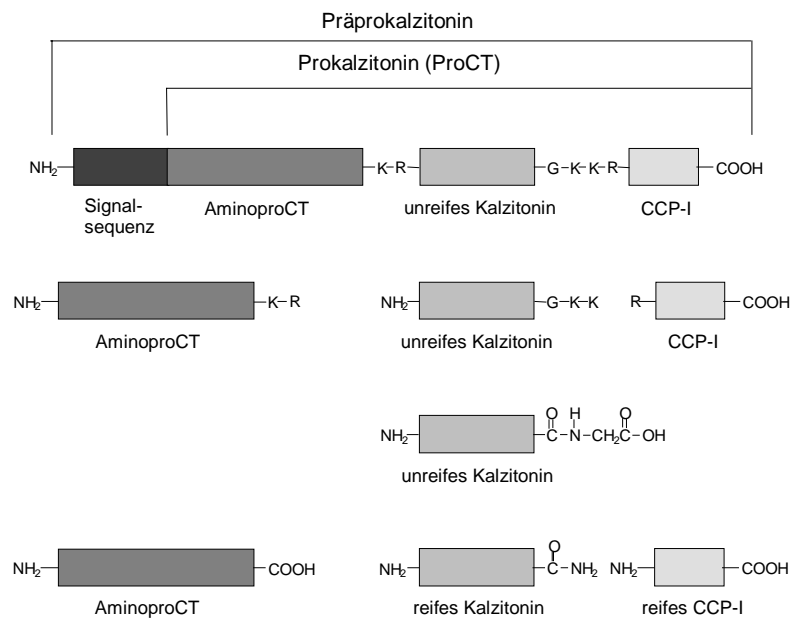


Abb. 1. Schematische Darstellung der Prozessierung des Prohormons Prokalzitonin (CT, Kalzitonin; CCP-I, Kalzitonin-carboxyterminales Peptid I; K, Lysin; G, Glycin; R, Arginin).

### Genexpression und Biochemie

Aus der Familie der Kalzitoningene sind 4 Gene (CALC-I bis CALC-IV) bekannt, die auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 (CALC-I bis CALC-III) und auf Chromosom 12 (CALC-IV) lokalisiert sind. Das Gen CALC-I kodiert neben dem Hormon Kalzitonin fünf entzündungsassoziierte Peptide: das Kalzitoningenen-assoziierte Peptid I (CGRP = calcitonin gene-related peptide I), ProCT, AminoproCT, CCP-I und das aus dem unreifen CT und CCP-I bestehende Peptid CT:CCP-I (8, 12, 13, 28, 51, 63, 72, 85, 120, 163, 166, 173, 177, 178).

Für die Kalzitoninbiosynthese ist das aus 6 Exons bestehende CALC-I-Gen verantwortlich. Durch alternatives splicing der transskribierten RNA entstehen drei unterschiedliche mRNAs, die letztlich zur Synthese dreier verschiedener Peptide führen: das CGRP I und zwei Präprokalzitonin-Moleküle, die sich in der Sequenz des carboxyterminalen Peptids unterscheiden. Präprokalzitonin besteht aus dem ProCT-Molekül (AS 26-141) und einer stark hydrophoben Signalsequenz (AS 1-25), die der Aufnahme von Präprokalzitonin ins endoplasmatische Retikulum dient. Nach der Aufnahme wird die Signalsequenz durch eine Endopeptidase abgespalten. Prokalzitonin wird beim weiteren Prozessieren in AminoproCT, Kalzitonin und CCP-I gespalten (Abb. 1). Die übrigen Kalzitoningene (CALC-II bis CALC-IV) sind für die ProCT- und Kalzitoninbiosynthese ohne Bedeutung. Nach heutiger Vorstellung wird unter dem Einfluß von Zytokinen die Prozessierung von ProCT im Golgi-Apparat gehemmt, so daß das Prohormon in die Blutzirkulation abgegeben wird (1, 12, 13, 33, 38, 40, 139, 143).

#### *Entdeckungsgeschichte*

Die Entdeckung von Kalzitonin 1962, seine vermutete Rolle im Knochenstoffwechsel und seine Beschreibung als Tumormarker für das C-Zell-Karzinom der Schilddrüse begründeten in den 70iger Jahren ein starkes medizinisches Interesse an den molekularbiologischen Grundlagen des Hormons (15, 23, 29, 30, 42, 70, 73 ,87, 109, 164). 1975 konnte erstmalig die Existenz eines Prohormons chromatografisch nachgewiesen werden (117). Die Aufklärung der Aminosäuresequenz des humanen Präprokalzitonin 1984 ebnete den Weg für die Entwicklung eines neuen und spezifischen Assays, um Biosynthese und physiologische Rolle des Kalzitonins und seiner Vorstufen besser untersuchen zu können (18, 97). Bohuon et al. gelang es 1986 monoklonale Antikörper zu entwickeln, die spezifisch an unterschiedliche Regionen des Prohormons binden. Mit diesem methodischen Instrument konnten erstmalig Prokalzitonin und das reife Kalzitonin ohne Kreuzreaktion im Plasma gemessen werden (60, 61, 116). Die Kombination von chromatografischen und immunologischen Nachweisverfahren durch Becker et al. erlaubten schließlich auch den Nachweis von freiem AminoproCT, CT:CCP-I und freiem CCP-I im Plasma (156, 157).

#### *Prokalzitonin und AminoproCT unter Inflammationsbedingungen*

Das Serum von Probanden enthält niedrige, aber meßbare Konzentration des ProCT-Moleküls, von nProCT, CT:CCP-I, freiem CCP-I und CT sowie CGPR (156).

Die eher zufällige Beobachtung von hohen ProCT-Plasmakonzentrationen bei Kindern mit

Infektionen und Sepsis unterschiedlichster Ätiologie ohne simultanen Anstieg der CT-Plasmakonzentrationen initiierte nach der Erstbeschreibung 1993 (9) systematische ProCT-Messungen bei verschiedenen Entzündungsaktivitäten. Erhöhte ProCT-Serumkonzentrationen konnten in intravenösen Sepsismodellen (43, 134), bei Patienten mit *severe sepsis* (2, 46) bei Peritonitis (67, 68), bei nekrotisierender Pankreatitis (5, 137) nach akzidentellen und operativen Traumen (17, 106, 110), bei Hitzschlag (125) und nach Ischämie/Reperfusion (88) gefunden werden.

Während bei Patienten mit neuroendokrin aktiven Karzinomen (medulläres Schilddrüsenkarzinom, kleinzelliges Bronchialkarzinom, Karzinoid, Phäochromozytom) hohe ProCT-Plasmakonzentrationen in der Regel von hohen freien Kalzitoninkonzentrationen begleitet werden, (33, 61, 64, 65, 138, 147) finden sich bei schweren inflammatorischen Wirtsreaktionen unterschiedlichster Ätiologie massiv erhöhte Plasmakonzentrationen von ProCT, nProCT, und CT:CCP-I bei gleichzeitig normalen oder nur minimal erhöhten Kalzitoninkonzentrationen [Verhältnis ProCT zu reifem CT:  $168 \pm 68$  vs.  $2.900 \pm 800$ ] (156).

Eine bewertende Durchsicht von Veröffentlichungen zu massiv erhöhten immunoreaktiven Kalzitoninkonzentrationen bei akuter Pankreatitis (31, 62), Toxic-Shock-Syndrom (34, 79, 159, 172), Meningokokkenmeningitis (103), nach Polytrauma (45, 91) und bei kritisch Kranken einer Intensivstation (98) legen vor dem Hintergrund dieser neuen Daten die Vermutung nahe, daß hier in Wirklichkeit erhöhte Prohormonkonzentrationen gemessen wurden. Zum Zeitpunkt der Durchführung der genannten Studien konnte mit den angewandten Assays eine Kreuzreaktion von Kalzitonin mit ProCT oder AminoproCT nicht ausgeschlossen werden. Der Nachweis hoher ProCT-Plasmakonzentrationen bei fehlendem Nachweis von Kalzitonin bei thyreoidektomierten Patienten mit *severe sepsis* beweist schlüssig, daß neben den C-Zellen der Schilddrüse unter bestimmten Bedingungen auch andere Zellen zur ProCT-Synthese befähigt sind (9, 124). Der zelluläre Ursprung des ProCT im Rahmen der inflammatorischen Reaktion konnte allerdings bisher nicht aufgeklärt werden. Während die Expression von mRNA für ProCT in zirkulierenden mononukleären Zellen beschrieben werden konnte (131, 132), reicht die in diesen Entzündungszellen synthetisierte ProCT-Menge nicht aus, die beschriebenen Plasmakonzentrationen zu erklären (114).

#### *Biologische Funktionen der Prohormone*

Biologische Wirkungen sind auf den Kalzium- und Phosphatstoffwechsel und den Verlauf der inflammatorischen Wirtsantwort untersucht worden. Ob ProCT oder AminoproCT eine

biologische Wirkung zukommt, konnte bis heute nicht zweifelsfrei geklärt werden.

Hohe ProCT-Plasmakonzentrationen sind in der Regel assoziiert mit erniedrigten Calcium-Plasmakonzentrationen, die aber im Rahmen von Entzündungsantworten vielfältig beeinflusst werden können (99, 100, 102, 161).

In In-vitro-Studien wurde gefunden, daß ProCT einen modulierenden Effekt auf die LPS-induzierte Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF $\alpha$  besitzt (149). Eine tierexperimentelle Studie konnte in dem gewählten Versuchsaufbau einer E. coli-Peritonitis bei Hamstern zeigen, daß durch Injektion von ProCT gegenüber einer Kontrollgruppe die Letalität erhöht und durch die prophylaktische Neutralisierung von ProCT mit Antikörpern die Letalität signifikant gesenkt werden konnte (129). Die Autoren schlußfolgern, daß es sich bei ProCT nicht nur um einen Marker der generalisierten Inflammation handelt, sondern daß ProCT eine bedeutende proinflammatorische pathophysiologische Rolle zukommt.

Von den hier referierten Studien zum Nachweis einer biologischen Wirkung liegen allerdings bisher nur ein Abstrakt und eine Originalarbeit vor und keine der Studien ist bis heute reproduziert worden.

### **1.3 Fragestellungen der Studie**

Folgende Fragestellungen sollten in der vorliegenden Studie bearbeitet werden:

1. In präanalytischen und analytischen Voruntersuchungen sollte die Güte der Prokalzitoninbestimmung mit dem von der Fa. Brahms Diagnostica, Berlin, entwickelten Chemilumineszenz-Assay überprüft werden. Dies entspricht einer Phase-1-Studie der strukturierten Evaluierung von ProCT als Marker der inflammatorischen Wirtsantwort.
2. In einer nachfolgenden Phase-2-Studie sollten ProCT-Serumkonzentrationsverläufe bei definierten Patientengruppen einer operativen Intensivstation untersucht werden. Die Güte des Markers zur Abbildung der septischen Wirtsantwort bei operativen Patienten sollte durch eine Bestimmung von diagnostischen Gütekriterien explorativ evaluiert werden. Da nicht bekannt war, ob und in welchem Ausmaß Einschränkungen von metabolischen oder renalen Eliminationswegen Einfluß auf die Plasmakonzentration von ProCT nehmen können, sollte bei geeigneten Intensivpatienten die renale Clearance von ProCT bestimmt werden.

3. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob die Bestimmung von Prokalzitonin einen diagnostischen Informationsgewinn gegenüber etablierten klinisch-chemischen Entzündungsparametern für die Erkennung und Verlaufsbeurteilung von inflammatorischen Wirtsantworten und ihre Prognose bietet.
4. Es sollte abschließend orientierend untersucht werden, für welche operativ-intensivmedizinische Entscheidungssituation eine weitere Evaluierung des Markers vielversprechend erscheint.