

Aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Quantifizierung von Proneuropeptid- und Prohormonfragmenten im
Blut und der Cerebrospinalflüssigkeit von Patienten
mit Morbus Alzheimer“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité Universitätsmedizin Berlin

von

Andrea Ernst
aus Hennigsdorf

Gutachter:

1. Prof. Dr. J. Köhrle
2. Prof. Dr. med. B. Müller
3. Prof. Dr. med. A. Heinz

Datum der Disputation: 15. Oktober 2007

Für meinen Sohn Nico Leandro ...

“My Fellow Americans,

I have recently been told that I am one of the Americans who will be afflicted with Alzheimer's Disease. ...

At the moment I feel just fine. I intend to live the remainder of the years God gives me on this earth doing the things I have always done. ...

Unfortunately, as Alzheimer's Disease progresses, the family often bears a heavy burden. I only wish there was some way I could spare Nancy from this painful experience. When the time comes I am confident that with your help she will face it with faith and courage. ...

I now begin the journey that will lead me into the sunset of my life. I know that for America there will always be a bright dawn ahead.

Thank you, my friends. May God always bless you.

Sincerely,

Ronald Reagan”

(offener Brief an das amerikanische Volk, 5. November 1994)

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	I
II. Abstract	IV
III. Abkürzungsverzeichnis	V
IV. Abbildungsverzeichnis	IX
V. Tabellenverzeichnis	XIII
VI. Lebenslauf	XIV
VII. Publikationen	XVI
a) Wissenschaftliche Artikel	XVI
b) Kongressbeiträge	XVII
VIII. Danksagung	XVIII
IX. Eidesstattliche Erklärung	XIX
1. Einleitung	1
1.1. Morbus Alzheimer	2
1.1.1. Epidemiologie	2
1.1.2. Genetische Prädispositionen	4
1.1.3. Histopathologische Veränderungen	5
1.1.4. Klinische Diagnose der Alzheimer-Demenz	6
1.1.5. Potenzielle Alzheimer-Biomarker	8
1.1.6. Pharmakotherapie der Alzheimer-Demenz	9
1.1.7. Pathologie weiterer differenzialdiagnostisch bedeutsamer Demenzen	10
1.1.8. Demenz und Inflammation	11
1.2. Neuropeptide und Peptidhormone	12
1.2.1. Proenkephalin A	14

1.2.2. Protachykinin A	15
1.2.3. Procalcitonin	17
2. Zielstellung	19
3. Materialien	21
3.1. Chemikalien und Substanzen	21
3.2. Peptide, Antikörper und Probenmaterial	22
3.2.1. Peptide	22
3.2.2. Antikörper	23
3.2.3. Probenmaterial	23
3.3. Geräte	24
3.4. Zusammensetzung von verwendeten Puffern und Lösungen	26
3.5. Software	28
4. Methoden	29
4.1. Peptidsynthese	29
4.2. Herstellung spezifischer Antikörper	30
4.2.1. Aufreinigung spezifischer pk Antikörper mittels Affinitätschromatographie	30
4.2.2. Qualitätskontrolle der gereinigten pk Antikörper mittels SDS-PAGE	31
4.3. Markierung der Antikörper mit dem Acridiniumester MACN	32
4.4. Immobilisierung von Antikörpern an Polystyrenröhrchen	33
4.5. Proteinbestimmung	33
4.6. Präparation von Serum-, EDTA-Plasma-, Heparin-Plasma- und CSF-Proben	34
4.7. Immunoassayentwicklung	34
4.7.1. Immunoassayentwicklung zur Detektion von stabilen PENK A-Fragmenten	35
4.7.2. Immunoassayentwicklung zur Detektion von stabilen PTA-Fragmenten	36
4.8. Stabilität der Analyten und Vergleich verschiedener Probenmatrices	37
4.9. Reversed-Phase HPLC	38
4.10. Immunoassay zur Detektion von PCT (PCT sensitiv)	38
4.11. Statistische Verfahren	39

5. Ergebnisse	40
5.1. Herstellung der Immunoassaykomponenten	40
5.2. Immunoassayentwicklung zur Detektion von stabilen PENK A-Fragmenten	41
5.3. Immunoassayentwicklung zur Detektion von stabilen PTA-Fragmenten	47
5.4. Detektion von PENK A ₁₁₉₋₁₅₉ , PTA ₁₋₃₇ -IR und PCT im Blut und CSF	52
5.4.1. Verteilung der PENK A ₁₁₉₋₁₅₉ , PTA ₁₋₃₇ - und PCT-Konzentrationen im Blut von gesunden Blutspendern	52
5.4.2. Verteilung der PENK A ₁₁₉₋₁₅₉ , PTA ₁₋₃₇ - und PCT-Konzentrationen im CSF von Kontrollprobanden ohne kognitive Beeinträchtigung	56
5.4.3. PENK A ₁₁₉₋₁₅₉ , PTA ₁₋₃₇ - und PCT-Konzentrationen im Blut von Patienten mit demenziellen Erkrankungen und dem Alter angepassten Kontrollen	59
5.4.4. PENK A ₁₁₉₋₁₅₉ , PTA ₁₋₃₇ - und PCT-Konzentrationen im CSF von Patienten mit demenziellen Erkrankungen und akuter Neuroinflammation	61
5.4.5. Vergleich der PENK A ₁₁₉₋₁₅₉ , PTA ₁₋₃₇ - und PCT-Konzentrationen in CSF und Blut	67
6. Diskussion	73
6.1. Entwicklung von Immunoassays zur Detektion von stabilen PENK A- und PTA-Fragmenten im Blut und CSF	73
6.2. Untersuchung der diagnostischen Anwendbarkeit der Propeptidmessung von PENK A ₁₁₉₋₁₅₉ , PTA ₁₋₃₇ und PCT bei Patienten mit AD	77
6.2.1. Untersuchung der PENK A ₁₁₉₋₁₅₉ , PTA ₁₋₃₇ - und PCT-Immunreaktivität im Blut..	78
6.2.2. Untersuchung der PENK A ₁₁₉₋₁₅₉ , PTA ₁₋₃₇ - und PCT-Immunreaktivität im CSF..	80
6.2.3. Konzentrationsgradienten der PENK A ₁₁₉₋₁₅₉ , PTA ₁₋₃₇ - und PCT-Peptide zwischen CSF und Blut	85
6.3. Ausblick	88
7. Zusammenfassung	90
8. Literatur	92

II. Abstract

Objective: Neuropeptides and peptide hormones have important functions within the brain. Their expression may be altered in neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease (AD). Therefore, these peptides represent potential biomarkers in the diagnosis of AD, the most abundant type of age-related neurodegenerative disorders. However, a reliable quantification of neuropeptides and peptide hormones in body fluids is difficult mainly due to their low stability. This problem could be solved by detecting stable precursor fragments as surrogate molecules of these peptides, as it was shown for neurotensin, calcitonin or insulin. The aim of this study was to develop immunoassays to detect stable fragments of the precursors proenkephalin A (PENK A) and protachykinin A (PTA) as surrogate markers for the release of enkephalin- and tachykinin A-peptides, respectively. Moreover, the applicability of PENK A, PTA and Procalcitonin (PCT) quantification in human blood and cerebrospinal fluid (CSF) in the diagnosis of AD was investigated. **Methods:** Sensitive sandwich immunoassays, based on the chemiluminescence and coated-tube technique, were developed for the detection of stable PENK A- and PTA-fragments in human blood and CSF. PENK A-, PTA- and PCT-immunoreactivity (IR) were measured in blood/ CSF samples of healthy controls, patients with primary dementia disorders, including AD, frontotemporal dementia, dementia with Lewy-Bodies and vascular dementia. **Results:** Two immunoassays to detect PENK A₁₁₉₋₁₅₉- and PTA₁₋₃₇-IR in blood and CSF were developed. These fragments were measured in detectable amounts in blood and CSF samples and were stable for at least 48 hours at room temperature. PENK A₁₁₉₋₁₅₉-, PTA₁₋₃₇- and PCT-concentrations were not significantly different in blood of patients with primary dementia when compared to controls. In contrast, PENK A₁₁₉₋₁₅₉- and PTA₁₋₃₇-IR were significantly decreased, whereas PCT was significantly increased in CSF of dementia patients when compared to controls. However, there was no difference between distinct groups of dementia. Moreover, concentration gradients of 140:1 and 72:1 between CSF and blood were detected for PENK A₁₁₉₋₁₅₉- and PTA₁₋₃₇-IR, respectively. **Conclusion:** The detection of PENK A₁₁₉₋₁₅₉- and PTA₁₋₃₇-IR can be used as surrogate quantification method for enkephalins and tachykinin A-peptides, respectively. Measurement of PENK A₁₁₉₋₁₅₉-, PTA₁₋₃₇- and PCT-IR in CSF is applicable in the diagnosis of primary dementia, but not specifically for AD. Moreover, the concentration gradients of both, PENK A₁₁₉₋₁₅₉- and PTA₁₋₃₇-IR, are much greater compared to the CSF/serum ratio of 34:1 for β -trace protein, the highest ratio known so far.

III. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A β	Amyloid beta-Protein
ACh	Acetylcholin
AD	Alzheimer-Demenz
ADM	Adrenomedullin
Ak	Antikörper
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloidprecursorprotein
AS	Aminosäure
AUC	area under curve (Fläche unter der Kurve)
AVP	Arginin-Vasopressin
BNP	brain natriuretic peptide
BSA	bovines Serumalbumin
CAT	Cholin-Acetyltransferase
ChE	Cholinesterase
CJD	Creutzfeld-Jakob Disease
CSF	cerebrospinale Flüssigkeit
CT	Computertomographie
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ET-1	Endothelin-1
Da	Dalton
DLB	Demenz mit Lewy-Bodies
FTD	frontotemporale Demenz
g	Gramm
h	Stunde
HDH	high dose hook

HIV	human immunodeficiency virus
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IR	Immunreaktivität
l	Liter
LKB	leichte kognitive Beeinträchtigung
Leu-Enk	Leucin-Enkephalin
LIA	Lumineszenz-Immunoassay
μ	mikro (10^{-6})
Met-Enk	Methionin-Enkephalin
Met-Enk-RF	Methionin-Enkephalin-Arginin-Phenylalanin
Met-Enk-RGL	Methionin-Enkephalin-Arginin-Glycin-Leucin
mg	Milligramm
MIP-1α	Makrophageninflammationsprotein 1 alpha
mk	monoklonal
ml	Milliliter
MMS	Mini-Mental-State
mol	molar
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
n	nano (10^{-9})
n.d.	nicht detektierbar
NKA	Neurokinin A
NMN	Neuromedin N
NPK	Neuropeptid K
NPγ	Neuropeptid gamma
NSAID	nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente
NSE	neuronenspezifische Enolase
NT	Neurotensin
p	piko (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)

PCT	Procalcitonin
PENK A	Proenkephalin A
PHF	paired helical filaments
pk	polyklonal
PNS	peripheres Nervensystem
PTA	Protachykinin A
p-Tau	phosphoryliertes Tau-Protein
PPT-A	Preprotachykinin A
pH	Potencia hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
RLU	relative luminescence unit (relative Lumineszenzeinheiten)
ROC	receiver operating characteristics
r-PENK A	rekombinantes PENK A
RP-HPLC	Reversed-Phase HPLC
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SKS	subjektive kognitive Störungen
SP	Substanz P
TFA	Trifluoressigsäure
TGF β	transforming growth factor beta
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan
t-Tau	Total-Tau-Protein
UB	unspezifische Bindungen
VD	vaskuläre Demenz
VK	Variationskoeffizient
ws AD	wahrscheinliche Alzheimer-Demenz
ZNS	zentrales Nervensystem

Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
I	Isoleucin
H	Histidin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

IV. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung des Amyloidprecursorproteins und der potenziellen Spaltstellen der Sekretasen
- Abb. 2: Schematische Darstellung der Demenzdiagnostik
- Abb. 3: Schematische Darstellung der Neuropeptid- und Peptidhormonsynthese
- Abb. 4: Schematische Darstellung der PENK A-Sequenz
- Abb. 5: Schematische Darstellung der mRNA-Spleißvarianten des PTA
- Abb. 6: Schematische Darstellung der PCT-Sequenz
- Abb. 7: Schematische Darstellung der AS-Sequenz des PENK A (243 AS) mit den synthetisierten Immunisierungspeptiden PENK A₁₂₁₋₁₃₄, PENK A₁₃₉₋₁₅₅, PENK A₁₉₁₋₂₀₅ und PENK A₂₂₀₋₂₃₆
- Abb. 8: Schematische Darstellung der AS-Sequenz des PTA (110 AS) mit den synthetisierten Immunisierungspeptiden PTA₃₋₂₂, PTA₂₁₋₃₆, PTA₅₃₋₆₆ und PTA₇₆₋₈₉
- Abb. 9: Schematische Darstellung der Acridiniumester-Reaktion
- Abb. 10: Schematische Darstellung eines heterogenen nicht-kompetitiven Immunoassays (Sandwich-Assay)
- Abb. 11: SDS-PAGE der affinitätsgereinigten pk PENK A-Antikörper aus Schafantisera
- Abb. 12: Charakteristisches HPLC-Profil des MACN-markierten mk PENK A-spezifischen Antikörpers anti-PENK A₁₂₁₋₁₃₄ (50-3-7)
- Abb. 13: Schematische Darstellung der PENK A-Sequenz (AS 1 – 243) und der Bindungsstellen der spezifischen Antikörper gegen die immunogenen Peptide PENK A₁₂₁₋₁₃₄, PENK A₁₃₉₋₁₅₅, PENK A₁₉₁₋₂₀₅ und PENK A₂₂₀₋₂₃₆
- Abb. 14: Darstellung der mittleren relativen Lumineszenzmesswerte (+ S.D.) der in den drei Antikörperkombinationen vermessenen EDTA-Plasmaproben von Blutspendern (n = 5) und AD-Patienten (n = 5) sowie CSF-Proben von Patienten ohne kognitive Störungen (n = 3)
- Abb. 15: Darstellung einer typischen Kalibrationskurve von synthetisch hergestelltem PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Peptid im Ein-Schritt-Assayformat (Mittelwerte aus Doppelbestimmung, VK < 10 %) unter Verwendung der Antikörper anti-PENK A₁₂₁₋₁₃₄ (50-3-7) als CT- und anti-PENK A₁₃₉₋₁₅₅ (CF108) als Tracerantikörper
- Abb. 16: Darstellung der Stabilität von PENK A₁₁₉₋₁₅₉ in verschiedenen Probenmatrices nach max. 48 h Inkubation bei RT

- Abb. 17: Darstellung der Konzentrationen (in % + S.D.) in verschiedenen Probenmatrices bezogen auf die Serummesswerte
- Abb. 18: Darstellung der RP-HPLC-Analyse der endogenen PENK A₁₁₉₋₁₅₉-IR aus Serum und CSF sowie des synthetischen PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Peptids
- Abb. 19: Schematische Darstellung der PTA-Sequenz (AS 1 – 110, β -Spleißvariante) und der Bindungsstellen der spezifischen Antikörper gegen die immunogenen Peptide PTA₃₋₂₂, PTA₂₁₋₃₆, PTA₅₃₋₆₆ und PTA₇₆₋₈₉
- Abb. 20: Darstellung der mittleren relativen Lumineszenzmesswerte (+ S.D.) der in den drei Antikörperkombinationen vermessenen EDTA-Plasmaproben von Blutspendern (n = 5) und AD-Patienten (n = 5) sowie CSF-Proben von Patienten ohne kognitive Störungen (n = 3)
- Abb. 21: Darstellung einer typischen Kalibrationskurve mit synthetischem PTA₁₋₃₇-Peptid im Ein-Schritt-Assayformat (Mittelwerte aus Doppelbestimmung, VK < 10%) unter Verwendung der Antikörper anti-PTA₂₁₋₃₆ (5197) als Festphasen- und anti-PTA₃₋₂₂ (5195) als Tracerantikörper
- Abb. 22: Darstellung der Stabilität der PTA₁₋₃₇-IR in verschiedenen Probenmatrices nach max. 48 h Inkubation bei RT
- Abb. 23: Darstellung der RP-HPLC-Analyse der endogenen PTA₁₋₃₇-IR aus EDTA-Plasma und CSF sowie des synthetischen PTA₁₋₃₇-Peptids
- Abb. 24: Verteilung der PENK A₁₁₉₋₁₅₉- (n = 132) (A) und der PTA₁₋₃₇-Konzentrationen (n = 130) (B) im EDTA-Plasma von gesunden Blutspendern
- Abb. 25: Verteilung der PCT-Konzentrationen im EDTA-Plasma von gesunden Blutspendern (n = 97)
- Abb. 26: Verteilung der PENK A₁₁₉₋₁₅₉- (A) und PTA₁₋₃₇-Konzentrationen (B) im EDTA-Plasma von männlichen (n = 70 bzw. n = 68) und weiblichen (n = 62) Blutspendern
- Abb. 27: Verteilung der PCT-Konzentrationen im EDTA-Plasma von männlichen (n = 60) und weiblichen (n = 37) Blutspendern
- Abb. 28: Altersabhängigkeit der PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Konzentration im Blut von gesunden Blutspendern (n = 132)
- Abb. 29: Korrelation der PENK A₁₁₉₋₁₅₉- und der PTA₁₋₃₇-Konzentrationen im EDTA-Plasma von gesunden Blutspendern (n = 130; Spearman r = 0,34; P < 0,0001)
- Abb. 30: Verteilung der PENK A₁₁₉₋₁₅₉- (A) und PTA₁₋₃₇-Konzentrationen (B) im CSF von Kontrollprobanden ohne klinisch feststellbare kognitive Defizite (n = 49)

- Abb. 31: Verteilung der PCT-Konzentrationen im CSF von Kontrollen ohne feststellbare kognitive Störungen (n = 50)
- Abb. 32: Korrelation der PCT-Konzentrationen mit dem Alter von Kontrollprobanden ohne vorliegende neurologische Störungen (n = 50) im CSF (Spearman $r = 0,39$; $P < 0,01$)
- Abb. 33: Korrelation der PENK A₁₁₉₋₁₅₉- und der PTA₁₋₃₇-Konzentrationen im CSF von Kontrollprobanden ohne kognitive Beeinträchtigung (n = 49; Spearman $r = 0,61$; $P < 0,0001$)
- Abb. 34: Verteilung der PENK A₁₁₉₋₁₅₉- (A) und PTA₁₋₃₇-Konzentrationen (B) in EDTA-Plasma von gesunden, dem Alter angepassten Kontrollen und Patienten mit diversen primären Demenzerkrankungen
- Abb. 35: Verteilung der PCT-Konzentrationen im EDTA-Plasma von gesunden, dem Alter angepassten Kontrollprobanden und Patienten mit verschiedenen klinisch diagnostizierten Demenzerkrankungen
- Abb. 36: Darstellung der PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Messwerte im CSF von Kontrollen ohne kognitive Beeinträchtigungen, Patienten mit verschiedenen Demenzerkrankungen sowie Patienten mit akuter Neuroinflammation (Kruskal-Wallis-Test $P < 0,01$)
- Abb. 37: ROC-Plot Analyse der PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Messwerte im CSF von Kontrollen ohne kognitive Beeinträchtigungen und Patienten mit primärem Demenzsyndrom
- Abb. 38: Darstellung der PTA₁₋₃₇-Werte im CSF von Kontrollen, Patienten mit verschiedenen Demenzerkrankungen sowie akuter Neuroinflammation (Kruskal-Wallis-Test $P < 0,001$)
- Abb. 39: ROC-Plot Analyse der PTA₁₋₃₇-Messwerte im CSF von Kontrollen ohne kognitive Beeinträchtigungen und Patienten mit primärer Demenz
- Abb. 40: Darstellung der PCT-Konzentrationen im CSF von Kontrollen ohne kognitive Beeinträchtigungen, Patienten mit primären Demenzerkrankungen sowie Patienten mit akuter Neuroinflammation (Kruskal-Wallis-Test $P < 0,001$)
- Abb. 41: ROC-Plot Analyse der PCT-Konzentrationen im CSF von Kontrollen ohne kognitive Beeinträchtigungen und Patienten mit primärem Demenzsyndrom
- Abb. 42: Korrelation der PENK A₁₁₉₋₁₅₉- und PTA₁₋₃₇-Konzentrationen im CSF von Patienten mit verschiedenen Demenzformen sowie Patienten mit akuter Neuroinflammation (n = 86; Spearman $r = 0,77$; $P < 0,0001$)

- Abb. 43: Darstellung der PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Konzentrationsgradienten zwischen parallel entnommenen EDTA-Plasma- und CSF-Proben von Kontrollprobanden ohne kognitive Defizite (n = 23) (A) und Patienten mit einem primären Demenzsyndrom (n = 70) (B)
- Abb. 44: Darstellung der PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Konzentrationsgradienten zwischen CSF- und EDTA-Plasma-paaren von Kontrollen und Patienten mit verschiedenen Demenzerkrankungen (Kruskal-Wallis-Test P < 0,01)
- Abb. 45: ROC-Plot Analyse der PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Konzentrationsgradienten zwischen parallel entnommenen CSF- und EDTA-Plasmaproben von Kontrollen und Patienten mit ws AD
- Abb. 46: Darstellung der PTA₁₋₃₇-Konzentrationsgradienten zwischen parallel entnommenen CSF- und EDTA-Plasmaproben von Kontrollprobanden (n = 21) (A) und Patienten mit primärer Demenz (n = 70) (B)
- Abb. 47: Darstellung der PTA₁₋₃₇-Konzentrationsgradienten zwischen parallel entnommenen CSF- und EDTA-Plasmaproben von Kontrollen und Patienten mit diversen primären Demenzerkrankungen (Kruskal-Wallis-Test P < 0,001)
- Abb. 48: Darstellung der PCT-Konzentrationsgradienten zwischen CSF- und Serum/ EDTA-Plasma-paaren von Kontrollprobanden ohne kognitive Störungen (n = 47) (A), Patienten mit primärem Demenzsyndrom (n = 70) (B) und Patienten mit akuter Neuroinflammation (n = 16) (C)
- Abb. 49: Darstellung der PCT-Konzentrationsgradienten zwischen parallel entnommenen CSF- und Serum-/ EDTA-Plasmaproben von Kontrollen, Patienten mit diversen primären Demenzerkrankungen sowie akuter Neuroinflammation (Kruskal-Wallis-Test P < 0,001)

V. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Prävalenzraten der AD für einige ausgewählte Länder
- Tabelle 2: Weltweite Prognose der Demenz-Prävalenz
- Tabelle 3: Beispiele für Peptidhormone bzw. Neuropeptide, die über stabile Vorstufenfragmente quantifiziert werden können
- Tabelle 4: Immunisierungspeptide der PENK A- und PTA-Sequenz
- Tabelle 5: Standardpeptide
- Tabelle 6: Antikörper gegen Peptide der PENK A-Sequenz
- Tabelle 7: Antikörper gegen Peptide der PTA-Sequenz
- Tabelle 8: Ergebnisse des Zwei-Schritt-Assayansatzes mit r-PENK A (grau > 20 %, weiß < 20 % Bindung)
- Tabelle 9: Charakterisierung der gesunden Blutspender für die Detektion der PENK A₁₁₉₋₁₅₉-, PTA₁₋₃₇- und PCT-Konzentration im EDTA-Plasma
- Tabelle 10: Charakterisierung der Kontrollprobanden (ohne kognitive Störungen) für die Detektion der PENK A₁₁₉₋₁₅₉-, PTA₁₋₃₇- und PCT-Konzentration im CSF
- Tabelle 11: Übersicht der im PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Immunoassay vermessenen EDTA-Plasmaproben
- Tabelle 12: Übersicht der im PTA₁₋₃₇-Immunoassay vermessenen EDTA-Plasmaproben
- Tabelle 13: Übersicht der im PCT-Immunoassay vermessenen EDTA-Plasmaproben
- Tabelle 14: Übersicht der im PENK A₁₁₉₋₁₅₉-, PTA₁₋₃₇- und PCT-Immunoassay vermessenen Patienten (CSF)

VI. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

VII. Publikationen

a) Wissenschaftliche Artikel

Ernst A., Stolzing A., Sandig G., Grune T. (2004). Antioxidants effectively prevent oxidation-induced protein damage in OLN 93 cells. *Archives Biochem Biophys* 421: 54-60.

Ernst A., Stolzing A., Sandig G., Grune T. (2004). Protein oxidation and the degradation of oxidized proteins in the rat oligodendrocyte cell line OLN 93 – antioxidative effect of the intracellular spin trapping agent PBN. *Mol Brain Res* 122: 126-132.

Ernst A., Hellmich S., Bergmann A. (2006). Proneurotensin 1-117, a stable neurotensin precursor fragment identified in human circulation. *Peptides* 27: 1787-1793.

Ernst A., Köhrle J., Bergmann A. (2006). Proenkephalin A 119-159, a stable proenkephalin A precursor fragment identified in human circulation. *Peptides* 27: 1835-1840.

Christ-Crain M., Stoeckli R., **Ernst A.**, Morgenthaler N.G., Bilz S., Korbonits M., Struck J., Bergmann A., Mueller B., Keller U. (2006). Effects of gastric bypass and banding on proneurotensin levels in morbidly obese patients. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 3544-3547.

Yoshihara F., **Ernst A.**, Morgenthaler N.G., Horio T., Nakamura S., Nakahama H., Nakata H., Bergmann A., Kangawa K., Kawano Y. (2007). Midregional proadrenomedullin reflects mortality in hemodialysis patients with cardiovascular disease. *Nephrol Dialys Transplant* 22: 2263-2268.

Ernst A., Morgenthaler N.G., Bürger K., Dodel R., Noelker C., Sommer N., Schwarz M., Köhrle J., Bergmann A., Hampel H. (2007). Procalcitonin is elevated in cerebrospinal fluid of patients with dementia and acute neuroinflammation. *Journal of Neuroimmunology* 189: 169-174.

b) Kongressbeiträge

Ernst A. (2005). N-terminales Proneurotensin im Plasma: Neuer Marker für Stoffwechselstörungen? Statusseminar Nutrigenomik. Biotechnologie-Zentrum Hennigsdorf.

Bergmann A., **Ernst A.**, Bürger K., Dodel R., Schwarz M., Hampel H. (2006). Decrease of mid-regional Proenkephalin A and N-terminal Protachykinin A immune reactivity in cerebrospinal fluid of patients with dementia and acute neuroinflammation. 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders (ICAD): P2-148.

Bergmann A., **Ernst A.**, Bürger K., Dodel R., Schwarz M., Morgenthaler N.G., Hampel H. (2006). Procalcitonin in cerebrospinal fluid is elevated in patients with dementia and acute neuroinflammation. 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders (ICAD): P2-149.

VIII. Danksagung

Diese Dissertation ist im Rahmen meiner Tätigkeit als Diplom-Biologin bei dem Biotechnologie-Unternehmen SpingoTec GmbH zustande gekommen. Ich möchte mich bei all jenen bedanken, die mich bei dieser Arbeit auf unterschiedliche Weise unterstützt haben.

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Josef Köhrle, für die intensive Betreuung und Begutachtung meiner Dissertation danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Andreas Bergmann für die exzellente wissenschaftliche Betreuung des Themas. Des Weiteren gab er mir die Möglichkeit, einen Teil der Ergebnisse auf der ICAD 2006 (10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders 2006) in Form von Posterbeiträgen einem großen Fachpublikum vorzustellen und zu diskutieren.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Nils G. Morgenthaler, Dr. Jana Papassotiriou und Dr. Joachim Struck, die stets als Ansprechpartner für wissenschaftliche und statistische Fragestellungen zur Verfügung standen und mich mit Rat und Tat bei der Erstellung wissenschaftlicher Fachartikel unterstützten.

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Harald Hampel und Dr. Katharina Bürger sowie Prof. Dr. Richard Dodel, die mir Proben von klinisch charakterisierten Patienten zur Verfügung stellten und mich bei klinischen Fragestellungen mit Ihren Fachkenntnissen berieten.

Christina Fischer-Schulz möchte ich für das Einführen in die verschiedenen Arbeitstechniken im Labor und Angelina Herzberg sowie Johanna Hetzel für Ihren Einsatz in der Beschaffung von Blutproben gesunder Probanden herzlich danken.

Mein größter Dank geht an meine Eltern, Dr. Gerhard Ernst und Petra Ernst sowie an meinen Lebensgefährten, Steffen Sparwaßer, für die langjährige Unterstützung und Geduld. Ihr habt immer an mich geglaubt!

IX. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Andrea Ernst, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Quantifizierung von Proneuropeptid- und Prohormonsequenzen im Blut und der Cerebrospinalflüssigkeit von Patienten mit Morbus Alzheimer, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

15. Oktober 2007

Datum

Unterschrift