

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Herstellung der Immunoassaykomponenten

9 PENK A- und 8 PTA-spezifische Schaf- bzw. Kaninchenantisera wurden affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die Ausbeute lag zwischen 0,21 und 3,84 mg Antikörper pro ml Antiserum. Die Qualität der affinitätsgereinigten pk Antikörper wurde mit Hilfe der SDS-PAGE überprüft und ist beispielhaft für die spezifischen PENK A-Antikörper in Abb. 11 gezeigt.

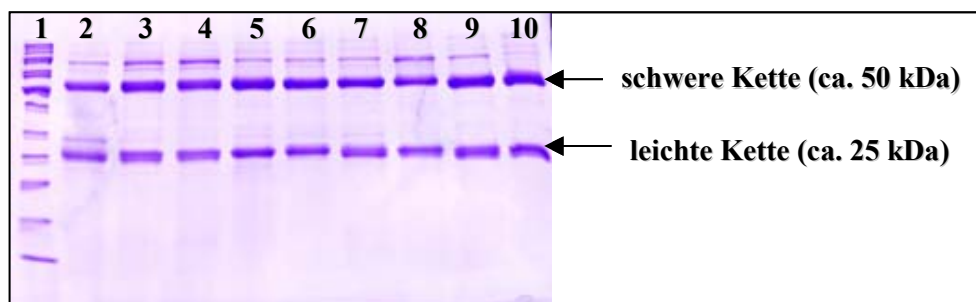


Abb. 11: SDS-PAGE der affinitätsgereinigten pk PENK A-Antikörper aus Schafantisera (Slot 1 Protein-Standard, Slots 2 bis 10 Antikörper CF108 bis CF116)

Die zur Verfügung stehenden PENK A- und PTA-Antikörper wurden im Verhältnis 1:2,5 mit MACN markiert. Der relative Markierungsgrad (Label pro IgG-Molekül) lag zwischen 0,7 und 2,1. In Abb. 12 ist das HPLC-Elutionsprofil des mk Antikörpers anti-PENK A<sub>121-134</sub> (50-3-7) beispielhaft gezeigt. Die Detektion des Antikörpers erfolgte bei 280 nm, die des MACN bei 368 nm.

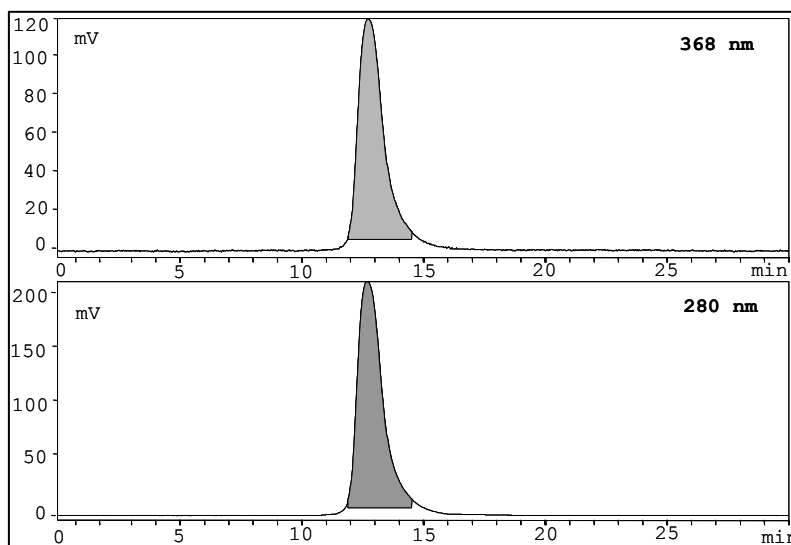


Abb. 12: Charakteristisches HPLC-Profil des MACN-markierten mk PENK A-spezifischen Antikörpers anti-PENK A<sub>121-134</sub> (50-3-7). MACN wurde bei 368 nm und der Antikörper bei 280 nm detektiert.

## 5.2. Immunoassayentwicklung zur Detektion von stabilen PENK A-Fragmenten

Zu Beginn der Arbeiten war bereits bekannt, dass das Fragment PENK A<sub>119-159</sub> im CSF zu finden ist (Stark et al., 2001). Dieses Peptid könnte mit den spezifischen, im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Antikörpern anti-PENK A<sub>121-134</sub> sowie anti-PENK A<sub>139-155</sub> detektiert werden. Zunächst wurden jedoch alle 10 zur Verfügung stehenden Antikörper gegen die 4 immunogenen Peptide der PENK A-Sequenz mit r-PENK A (1:25-Verdünnung in Pferdeserum, Zwei-Schritt-Ansatz) auf Bindung getestet, um systematisch nach weiteren endogenen PENK A-Fragmenten im Blut sowie CSF suchen zu können. Es ergaben sich 90 verschiedene Antikörperkombinationen, deren Ergebnisse in Tabelle 8 dargestellt sind.

Tabelle 8: Ergebnisse des Zwei-Schritt-Assayansatzes mit r-PENK A (grau > 20 %, weiß < 20 % Bindung)

		AS <sub>121-134</sub>	AS <sub>139-155</sub>			AS <sub>191-205</sub>			AS <sub>220-236</sub>		
	Tracer CT's	50-3-7	CF108	CF109	CF110	CF111	CF112	CF113	CF114	CF115	CF116
AS <sub>121-134</sub>	50-3-7	-									
AS <sub>139-155</sub>	CF108		-								
	CF109			-							
	CF110				-						
AS <sub>191-205</sub>	CF111					-					
	CF112						-				
	CF113							-			
AS <sub>220-236</sub>	CF114								-		
	CF115									-	
	CF116										-

20 dieser Antikörperkombinationen zeigten Bindungen von mehr als 20 % (in Tabelle 8 grau hinterlegt). Diese Antikörperkombinationen wurden anschließend mit einer 1:5000-Verdünnung des r-PENK A im Ein-Schritt-Assayformat auf Bindung getestet. Die höhere Verdünnung des rekombinanten Materials wurde gewählt, um den so genannten „High dose hook (HDH)-Effekt“ zu vermeiden. Dieser Effekt tritt bei Ein-Schritt-Immunoassays auf, wenn die Antigenkonzentration der Probe die der eingesetzten Antikörpermenge übersteigt. Die Folge sind falsch-niedrige Messwerte. 18 der 20 Antikörperkombinationen zeigten im Ein-Schritt-Testformat weniger als 1 % Bindung. Bei Verwendung des mk Antikörpers anti-PENK A<sub>121-134</sub> (50-3-7) als Festphase und des pk Antikörpers anti-PENK A<sub>139-155</sub> (CF108) als Flüssigphase wurden 10 % des eingesetzten Tracerantikörpers gebunden. Vertauscht man diesen Fest- und Flüssigphasenantikörper, so erhält man ein um den Faktor 3 niedrigeres Messsignal. Die Anti-

körperkombination aus anti-PENK A<sub>121-134</sub> (50-3-7) als Festphase und anti-PENK A<sub>139-155</sub> (CF108) als Flüssigphase zeigte mit r-PENK A die besten Bindungseigenschaften.

Um zu überprüfen welche PENK A-Fragmente endogen, d.h. im Blut oder CSF, mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern detektiert werden können, wurden EDTA-Plasma-Proben von 5 gesunden Blutspendern und 5 Patienten mit einer AD sowie 3 CSF-Proben von Patienten ohne bekannte kognitive Störungen im Ein-Schritt-Assayformat in drei verschiedenen PENK A-Immunoassays vermessen. Dabei wurde der anti-PENK A<sub>139-155</sub> (CF108)-Antikörper als Tracer eingesetzt und die Antikörper anti-PENK A<sub>121-134</sub> (50-3-7), anti-PENK A<sub>191-205</sub> (CF111) sowie anti-PENK A<sub>220-236</sub> (CF116) auf der Festphase immobilisiert (siehe Abb. 13).

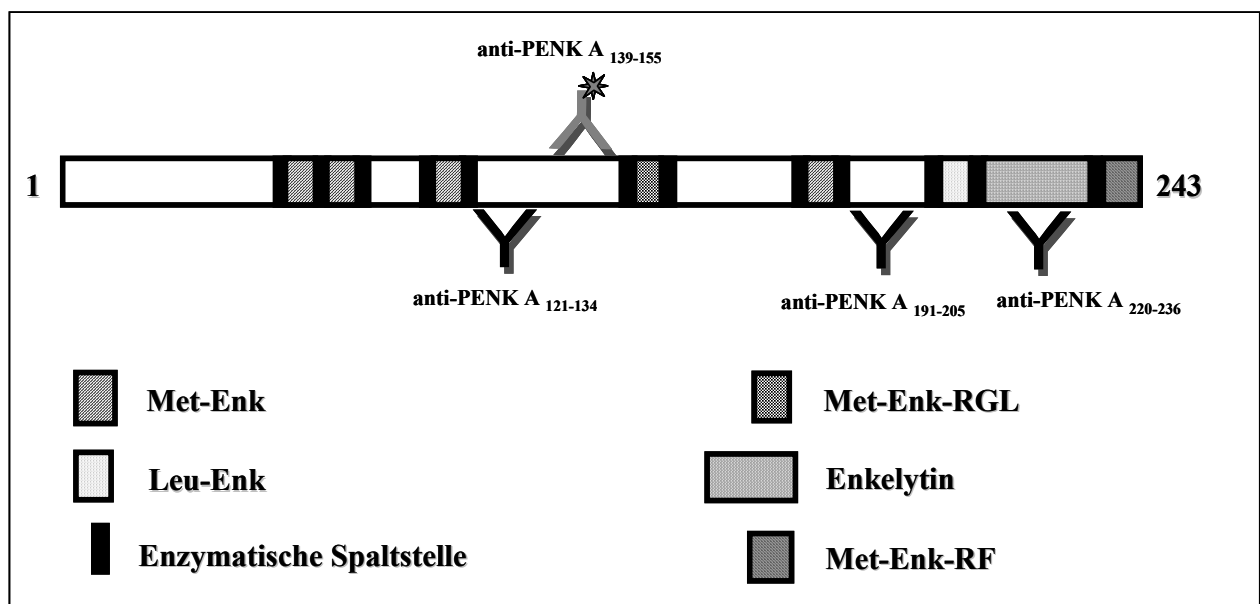


Abb. 13: Schematische Darstellung der PENK A-Sequenz (AS 1 – 243) und der Bindungsstellen der spezifischen Antikörper gegen die immunogenen Peptide PENK A<sub>121-134</sub>, PENK A<sub>139-155</sub>, PENK A<sub>191-205</sub> und PENK A<sub>220-236</sub>. Der Antikörper anti-PENK A<sub>139-155</sub> (mit Stern) wurde als Tracerantikörper eingesetzt.

Es zeigte sich, dass mit allen drei getesteten Immunoassays PENK A-IR sowohl im Plasma von gesunden Blutspendern als auch von AD-Patienten detektierbar waren (siehe Abb. 14). Im Gegensatz dazu konnte im CSF eine PENK A-IR nur mit der Antikörperkombination anti-PENK A<sub>121-134</sub> und anti-PENK A<sub>139-155</sub> detektiert werden, die um den Faktor 40 höher lag als im Plasma der Blutspender.

Aufgrund der Ergebnisse mit rekombinantem und endogenem PENK A wurde für die weitere Immunoassayentwicklung die Antikörperkombination aus anti-PENK A<sub>121-134</sub> (50-3-7) als Festphase und anti-PENK A<sub>139-155</sub> (CF108) als Flüssigphase ausgewählt.

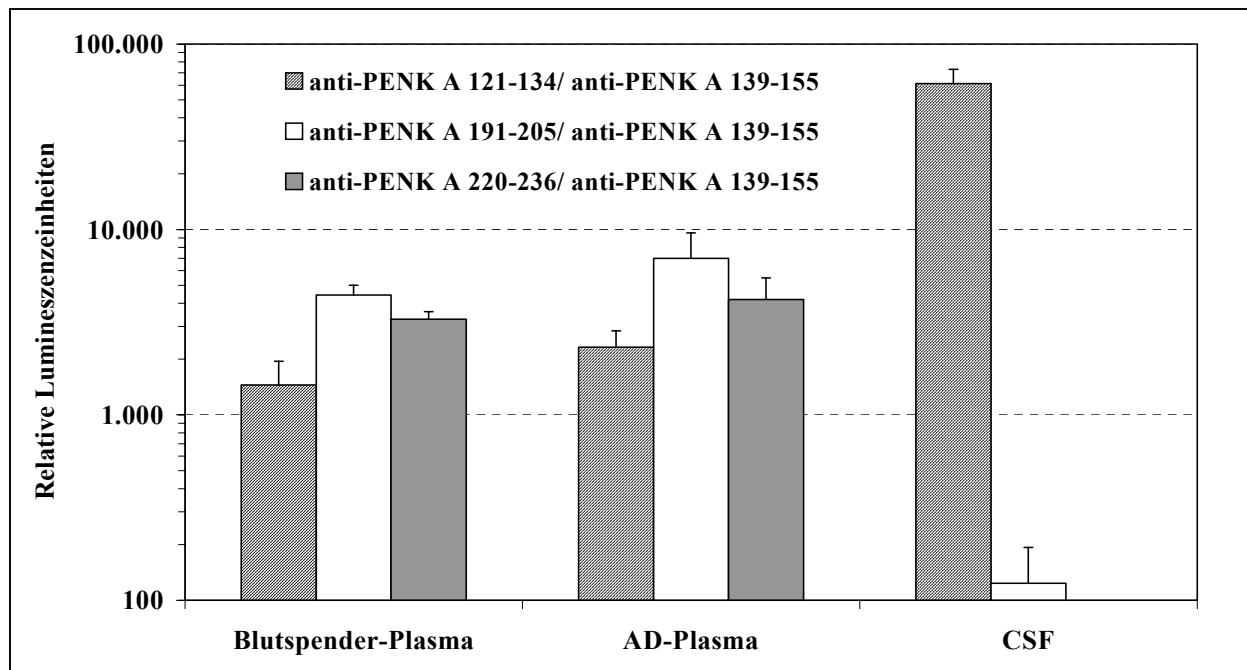


Abb. 14: Darstellung der mittleren relativen Lumineszenzmesswerte (+ S.D.) der in den drei Antikörperkombinationen vermessenen EDTA-Plasmaproben von Blutspendern ( $n = 5$ ) und AD-Patienten ( $n = 5$ ) sowie CSF-Proben von Patienten ohne kognitive Störungen ( $n = 3$ ). Pro Röhrchen wurden  $100 \mu\text{l}$  Probe und  $100 \mu\text{l}$  Tracer für 20 h bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert.

Ein Peptid mit den Aminosäuren 119 bis 159 der PENK A-Sequenz (PENK A<sub>119-159</sub>) wurde als Kalibrator durch die Jerini AG synthetisch hergestellt. Es hat eine molekulare Masse von 4.583 Da. Standardkonzentrationen zwischen 10 und 450.000 pmol/l wurden in Pferdeserum verdünnt und je  $100 \mu\text{l}$  im Ein-Schritt-Assay vermessen (Abb. 15).

Die kleinste messbare Konzentration lag bei 35 pmol/l. Der HDH-Effekt trat ab etwa 100.000 pmol/l auf. Um diesen Effekt zu vermeiden, muß bei höheren Konzentrationen eine Verdünnung der Probe eingesetzt werden. Die Standardkurve war bis zu einer Konzentration von 2.500 pmol/l linear. Es wurden Standardkonzentrationen zwischen 0 und 2.500 pmol/l für die Optimierung des Immunoassays als Lyophilisat hergestellt.

Der Immunassay zur Detektion der PENK A<sub>119-159</sub>-IR wurde hinsichtlich der Inkubationszeit, der Inkubationstemperatur, der Menge an Festphasenantikörper, direkter oder indirekter Antikörperbeschichtung der Röhrchen, der Menge an Tracerantikörper und des eingesetzten Probenvolumens mit dem Standardmaterial sowie nativen EDTA-Plasmaproben von gesunden Blutspendern optimiert. Der Assay wurde für die weiteren Messungen wie folgt angesetzt: Je  $100 \mu\text{l}$  PENK A<sub>119-159</sub>-Standardpeptidlösung bzw. Probe und  $100 \mu\text{l}$  Traceransatz (eingestellt auf 15 ng anti-PENK A<sub>139-155</sub>-Antikörper pro Ansatz) werden in Röhrchen, indirekt beschichtet mit

je 0,5 µg anti-PENK A<sub>122-136</sub>-Antikörper, für 20 h bei RT inkubiert und anschließend im Lumimeter vermessen.

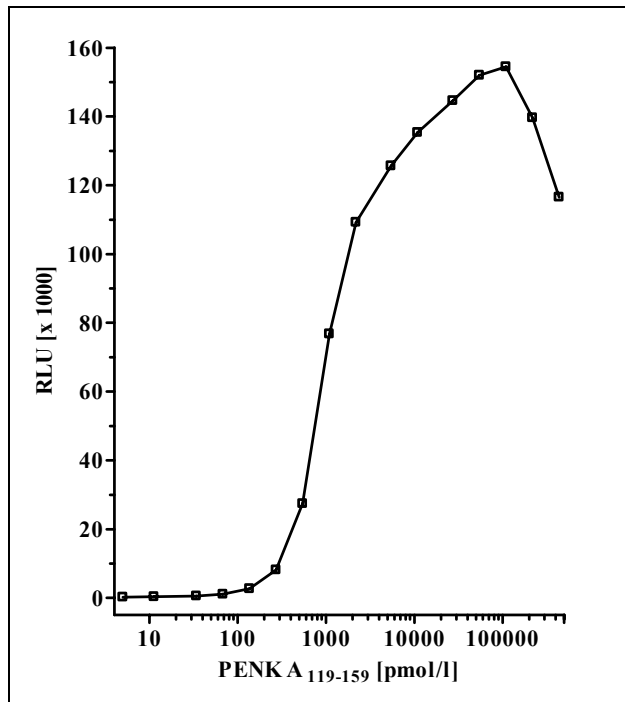


Abb. 15: Darstellung einer typischen Kalibrationskurve von synthetisch hergestelltem PENK A<sub>119-159</sub>-Peptid im Ein-Schritt-Assayformat (Mittelwerte aus Doppelbestimmung, VK < 10 %) unter Verwendung der Antikörper anti-PENK<sub>121-134</sub> (50-3-7) als Röhren- und anti-PENK<sub>139-155</sub> (CF108) als Tracerantikörper. 100 µl Standardmaterial und 100 µl Traceransatz (eingestellt auf 15 ng Antikörper pro Ansatz) wurden für 20 h bei 4 °C inkubiert und anschließend vermessen.

Die analytische Assaysensitivität (untere Nachweisgrenze) wurde durch eine 10fache Bestimmung der PENK A<sub>119-159</sub>-IR in Pferdeserum quantifiziert. Die Konzentration des berechneten Mittelwertes plus der 2fachen Standardabweichung wurde an der mitgeführten Standardkurve extrapoliert. Die untere Nachweisgrenze für PENK A<sub>119-159</sub> lag bei 20 pmol/l.

Die PENK A<sub>119-159</sub>-IR war mit dem hier entwickelten Immunoassay sowohl im Blut von gesunden Blutspendern als auch im CSF von Patienten ohne demenzielle Erkrankungen messbar. Der Normalbereich lag im EDTA-Plasma zwischen 26,1 und 155 pmol/l und im CSF bei 2.320 bis 11.000 pmol/l (siehe Kapitel 5.4.1. und 5.4.2.).

Die Stabilität der PENK A<sub>119-159</sub>-IR wurde in je fünf Serum-, EDTA- und Heparin-Plasmaproben von gesunden Blutspendern, sowie in drei CSF-Proben von Patienten ohne kognitive Störungen untersucht. In Abb. 16 ist gezeigt, dass endogenes PENK A<sub>119-159</sub> in allen untersuchten Matrices für 48 h bei Raumtemperatur absolut stabil war und somit für die Detektion im Assay verwendet werden kann.

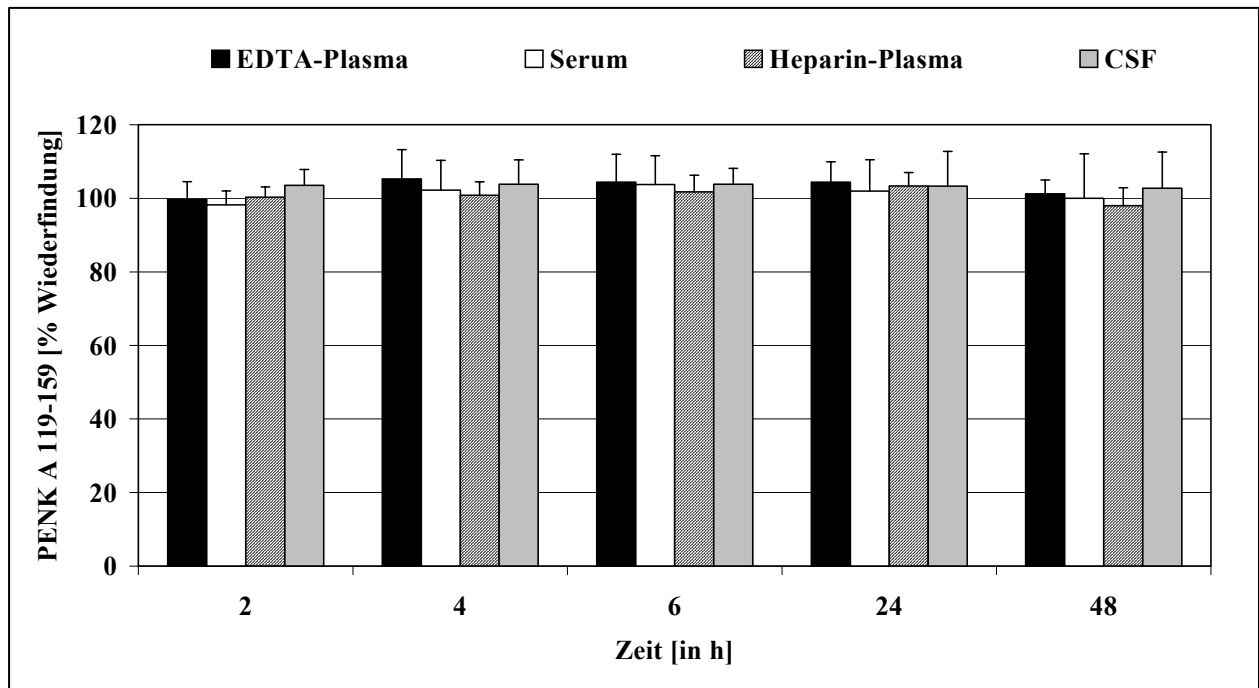


Abb. 16: Darstellung der Stabilität von PENK A<sub>119-159</sub> in verschiedenen Probenmatrices nach max. 48 h Inkubation bei RT. Die Konzentration des Referenzwerts (0 h) wurde für jede Matrix als 100 % definiert. Der Mittelwert (+ S.D.) der wiedergefundenen prozentualen Messwerte wurde für jeden Zeitpunkt berechnet.

Von 10 gesunden Blutspendern wurde parallel Serum, EDTA-Plasma sowie Heparin-Plasma präpariert. Diese Proben wurden im PENK A<sub>119-159</sub>-Immunoassay vermessen und die ermittelten Konzentrationen zwischen den verschiedenen Matrices verglichen (Abb. 17).

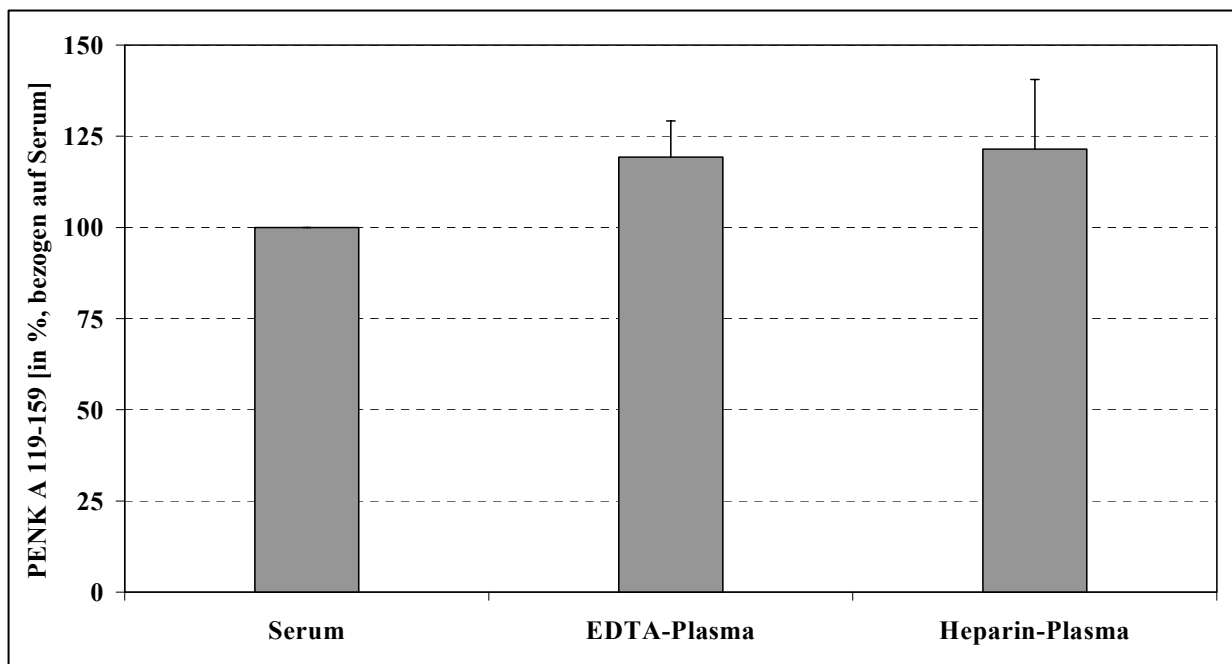


Abb. 17: Darstellung der Konzentrationen (in % + S.D.) in verschiedenen Probenmatrices bezogen auf die Serum-messwerte. Für jede Matrix wurden n = 10 Proben vermessen.

EDTA- und Heparin-Plasma lieferten im Vergleich zu Serum im Mittel 19 bzw. 22 % höhere Konzentrationswerte.

Die endogene PENK A<sub>119-159</sub>-IR aus Serum sowie CSF wurde mit Hilfe der Reversed-Phase-Chromatographie analysiert. 61,0 und 70,3 % der auf die  $\mu$ Bondapak-Säule applizierten PENK A<sub>119-159</sub>-IR aus dem Serum bzw. dem CSF konnten in den Fraktionen wiedergefunden werden. Wie in Abb. 18 dargestellt, ist die Retentionszeit der Hauptimmunreaktivität des endogenen PENK A<sub>119-159</sub> aus Serum und CSF identisch mit der des synthetischen PENK A<sub>119-159</sub>-Peptids. Darüber hinaus konnten im Serum PENK A<sub>119-159</sub>-IR mit mehr oder weniger hydrophoben Eigenschaften im Vergleich zum PENK A<sub>119-159</sub> detektiert werden, die scheinbar im CSF nicht zu finden sind.

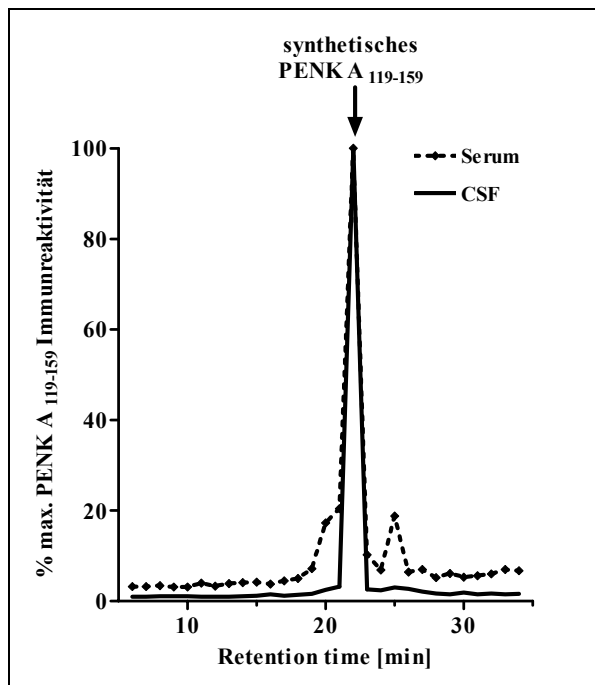


Abb. 18: Darstellung der RP-HPLC-Analyse der endogenen PENK A<sub>119-159</sub>-IR aus Serum und CSF sowie des synthetischen PENK A<sub>119-159</sub>-Peptids. Die Retentionszeit des synthetischen PENK A<sub>119-159</sub>-Peptids ist durch einen Pfeil markiert. Die PENK A<sub>119-159</sub>-IR wurde in den Fraktionen 5 bis 35 gemessen. Der jeweilige maximale Messwert wurde als 100 % definiert.

### 5.3. Immunoassayentwicklung zur Detektion von stabilen PTA-Fragmenten

Für die Auswahl einer geeigneten Antikörperkombination wurden EDTA-Plasmaproben von 5 gesunden Blutspendern und 5 Patienten mit einer diagnostizierten AD sowie 3 CSF-Proben von Probanden ohne bekannte kognitive Störung vermessen, da kein rekombinantes PTA-Material zur Verfügung stand. Die spezifischen Antikörper gegen die PTA-Peptide PTA<sub>21-36</sub>, PTA<sub>53-66</sub> und PTA<sub>76-89</sub> wurden immobilisiert (siehe Abb. 19). Da pro Peptid jeweils zwei Kaninchenantikörper vorhanden waren, wurde zunächst pro Röhrchen ein Gemisch aus beiden Antikörpern (je 1 µg) verwendet. Als Tracerantikörper diente ein Gemisch aus den beiden markierten Kaninchenantikörpern 5194 und 5195 gegen das PTA<sub>3-22</sub>-Peptid, wobei pro Antikörper 10 ng eingesetzt wurden.

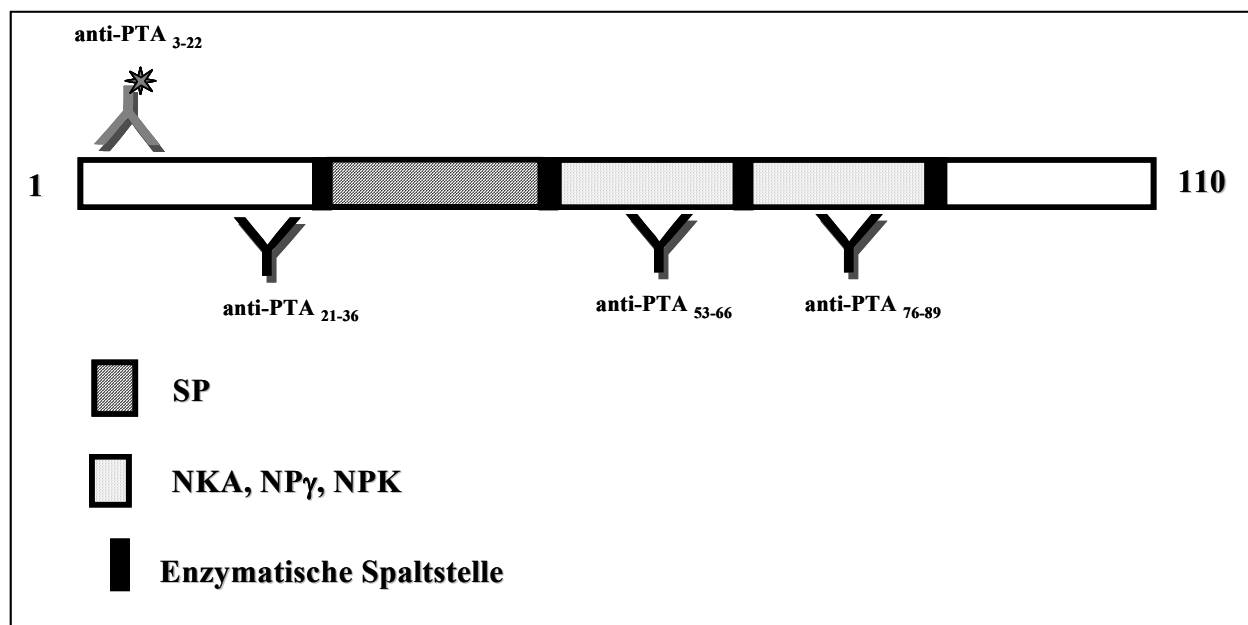


Abb. 19: Schematische Darstellung der PTA-Sequenz (AS 1 – 110, β-Spleißvariante) und der Bindungsstellen der spezifischen Antikörper gegen die immunogenen Peptide PTA<sub>3-22</sub>, PTA<sub>21-36</sub>, PTA<sub>53-66</sub> und PTA<sub>76-89</sub>. Der Antikörper anti-PTA<sub>3-22</sub> (mit Stern) wurde als Tracerantikörper eingesetzt.

Die Antikörper erkennen Sequenzen in verschiedenen PTA-Spleißvarianten: PTA<sub>3-22</sub> und PTA<sub>21-36</sub> sind in allen vier Spleißvarianten (α, β, γ, δ) vorhanden, Antikörper gegen das PTA<sub>53-66</sub>-Peptid erkennen spezifisch nur Sequenzen der α- und β-Spleißform und Antikörper gegen das PTA<sub>76-89</sub>-Peptid sind spezifisch gegen die PTA-Spleißformen β und γ gerichtet.



Die Kombination aus Antikörpern gegen das PTA<sub>3-22</sub>- und PTA<sub>21-36</sub>-Peptid der PTA-Sequenz lieferte für alle eingesetzten Proben messbare Lumineszenzwerte (siehe Abb. 20). Der Mittelwert der Alzheimer-EDTA-Plasmaproben unterschied sich nicht signifikant von dem der Blutspender, wohingegen der mittlere Lumineszenzwert der CSF-Proben 75fach höher lag als im EDTA-Plasma der Blutspender bzw. AD-Patienten. Sowohl in den CSF-Proben als auch im EDTA-Plasma der Blutspender und Alzheimerpatienten ist keine PTA-IR mit den Antikörperkombinationen anti-PTA<sub>53-66</sub>/ anti-PTA<sub>3-22</sub> und anti-PTA<sub>76-89</sub>/ anti-PTA<sub>3-22</sub> detektierbar. Hinsichtlich dieser Ergebnisse wurde im Folgenden mit den Antikörpern gegen die Peptide PTA<sub>3-22</sub> und PTA<sub>21-36</sub> weiter gearbeitet.

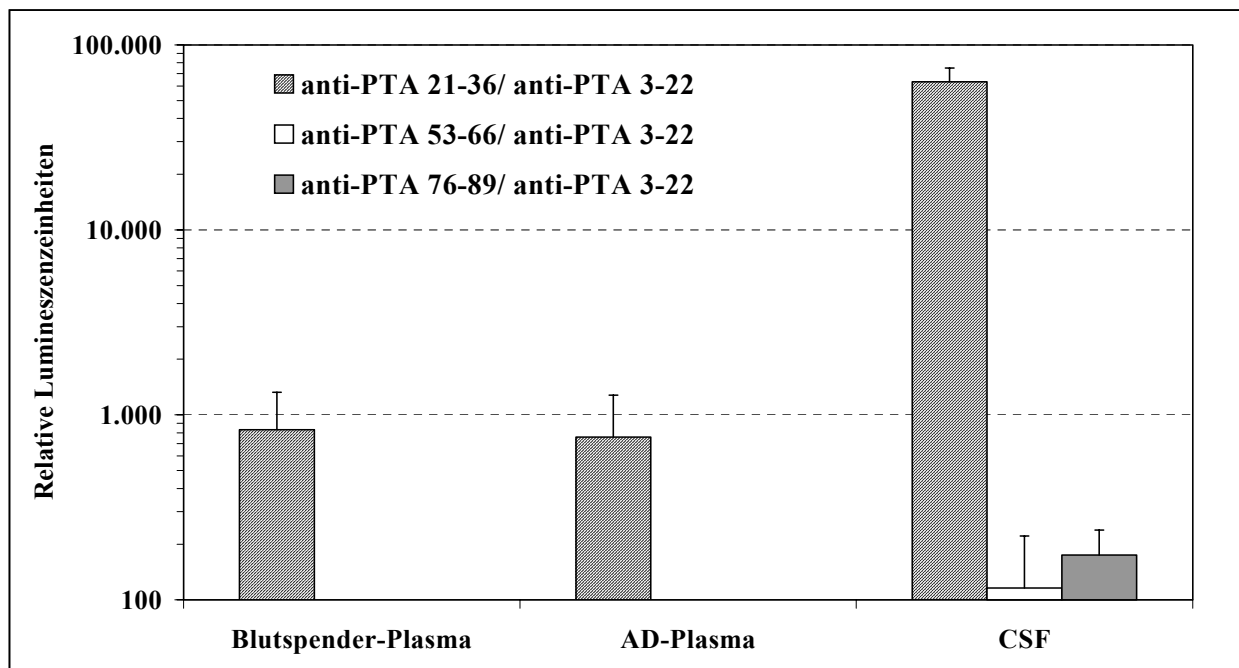


Abb. 20: Darstellung der mittleren relativen Lumineszenzmesswerte (+ S.D.) der in den drei Antikörperkombinationen vermessenen EDTA-Plasmaproben von Blutspendern ( $n = 5$ ) und AD-Patienten ( $n = 5$ ) sowie CSF-Proben von Patienten ohne kognitive Störungen ( $n = 3$ ). Pro Röhrchen wurden 100  $\mu$ l Probe und 100  $\mu$ l Assaypuffer für 20 h bei 4 °C inkubiert. Die Inkubation von 200  $\mu$ l Tracer erfolgte für 2 h.

Ein Peptid mit den Aminosäuren 1 bis 37 der PTA-Sequenz (PTA<sub>1-37</sub>) wurde als Kalibrator durch die Jerini AG synthetisch hergestellt. PTA<sub>1-37</sub> hat eine molekulare Masse von 4.476 Da. Es wurden Standardkonzentrationen zwischen 2 und 220.000 pmol/l in Assaypuffer verdünnt. Pferdeserum konnte nicht als Nullmatrix für das PTA<sub>1-37</sub>-Peptid eingesetzt werden, da die unspezifischen Bindungen (UB) hier im Vergleich zum Assaypuffer deutlich höher waren und somit die Sensitivität des Immunoassays herabgesetzt würde. Gegen die Peptide PTA<sub>3-22</sub> und PTA<sub>21-36</sub> standen je zwei verschiedene Kaninchenantikörper zur Verfügung, woraus sich 8 mögliche Antikörperkombinationen ergaben. Je 100  $\mu$ l der Standardpeptidlösung wurde im Ein-

Schritt-Assay vermessen. Alle getesteten Antikörpervarianten zeigten einen Anstieg der Lumineszenzmesswerte mit zunehmender Standardkonzentration. Die Kombination aus dem Festphasenantikörper anti-PTA<sub>21-36</sub> (5197) und dem Flüssigphasenantikörper anti-PTA<sub>3-22</sub> (5195) zeigte sowohl die höchsten Lumineszenzmesswerte als auch die größte Sensitivität und wurde für die weitere Entwicklung ausgewählt. Die Linearität der PTA<sub>1-37</sub>-Standards ist mit dieser Antikörperkombination bis zu einer Konzentration von 20.000 pmol/l gegeben (Abb. 21). Für die weiteren Messungen wurden Standardkonzentrationen zwischen 0 und 3.000 pmol/l als Lyophilisat hergestellt.

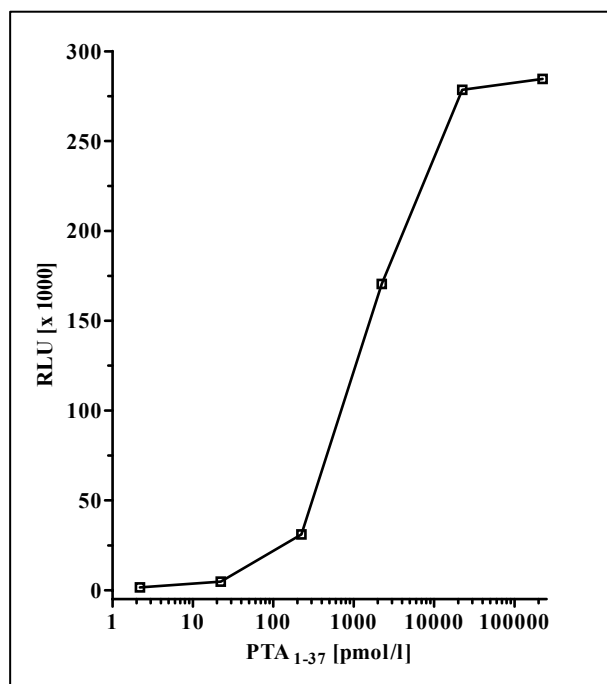


Abb. 21: Darstellung einer typischen Kalibrationskurve mit synthetischem PTA<sub>1-37</sub>-Peptid im Ein-Schritt-Assayformat (Mittelwerte aus Doppelbestimmung, VK < 10 %) unter Verwendung der Antikörper anti-PTA<sub>21-36</sub> (5197) als Festphasen- und anti-PTA<sub>3-22</sub> (5195) als Tracerantikörper. 100 µl Standardmaterial und 200 µl Tracer (eingestellt auf 5 ng Antikörper pro Ansatz) wurden für 20 h bei 4 °C inkubiert und anschließend vermessen.

Der Immunoassay zur Detektion der PTA<sub>1-37</sub>-IR wurde hinsichtlich der Inkubationstemperatur, der Inkubationszeit, der Menge an Tracerantikörper und des eingesetzten Probevolumens optimiert und wurde für die weiteren Messungen wie folgt angesetzt: Je 100 µl Standard bzw. Probe und 200 µl Traceransatz (eingestellt auf 5 ng anti-PTA<sub>3-22</sub> (5195)-Antikörper pro Ansatz) werden in Röhrchen, direkt beschichtet mit je 2 µg anti-PTA<sub>21-36</sub> (5197)-Antikörper für 20 h bei 4 °C inkubiert und anschließend im Luminometer vermessen.

Die analytische Assaysensitivität wurde durch eine 10fache Vermessung von PTA<sub>1-37</sub> in Assaypuffer bestimmt. Die Konzentration des berechneten Mittelwertes plus der 2fachen Standardabweichung wurde an der mitgeführten Standardkurve extrapoliert. Die untere Nachweisgrenze der PTA<sub>1-37</sub>-IR lag bei 2,3 pmol/l. Die PTA<sub>1-37</sub>-IR ist mit dem hier entwickelten Immunoassay sowohl im Blut von gesunden Blutspendern als auch im CSF messbar. Der Normalbereich lag im EDTA-Plasma zwischen < 2,3 und 22,3 pmol/l und im CSF bei 260 bis 960 pmol/l (siehe Kapitel 5.4.1. und 5.4.2.).

Die Stabilität der PTA<sub>1-37</sub>-IR wurde in Serum-, EDTA-Plasma- und Heparin-Plasma-proben von gesunden Blutspendern, sowie in CSF-Proben von Patienten ohne kognitive Störungen überprüft. Abb. 22 zeigt, dass die endogene PTA<sub>1-37</sub>-IR über den getesteten Zeitraum von 48 h nur in EDTA-Plasma und CSF stabil ist. In Serum erfolgt bereits nach 2 h bei RT ein Abbau, wohingegen im Heparin-Plasma ein Verlust der PTA<sub>1-37</sub>-IR von 15 % erst nach 24 h Standzeit auftritt. Die Bestimmung von PTA<sub>1-37</sub> ist im Serum aufgrund der Instabilität des Parameters nicht geeignet. Dagegen können EDTA- und Heparin-Plasma sowie CSF für die Vermessung der PTA<sub>1-37</sub>-IR verwendet werden.

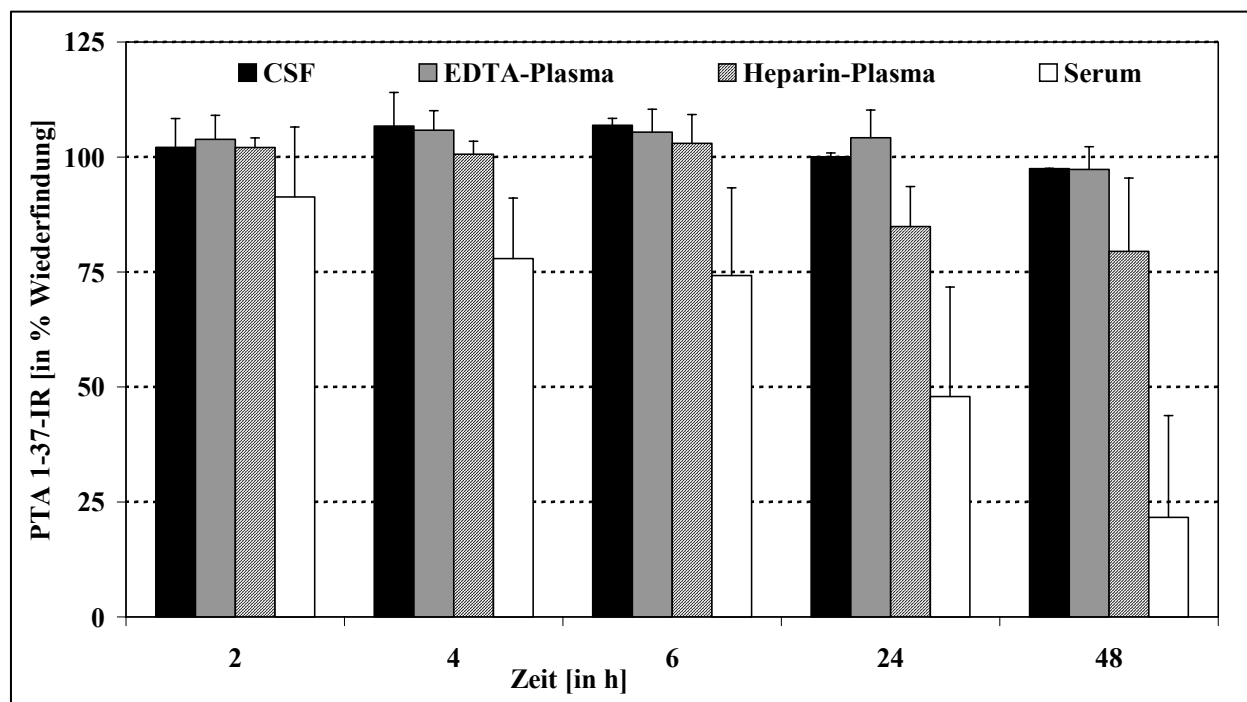


Abb. 22: Darstellung der Stabilität der PTA<sub>1-37</sub>-IR in verschiedenen Probenmatrices nach max. 48 h Inkubation bei RT. Die Konzentration des Referenzwertes (0 h) wurde für jede Matrix als 100 % definiert. Der Mittelwert (+ S.D.) der wiedergefundenen prozentualen Messwerte wurde für jeden Zeitpunkt berechnet.

Die Messwerte in Heparin-Plasma lagen im Vergleich zu den Werten in parallel abgenommenen EDTA-Plasmaproben (n = 5) im Mittel um 20 % höher.

Analog zum PENK A<sub>119-159</sub> wurde die endogene PTA<sub>1-37</sub>-IR aus EDTA-Plasma sowie CSF mit Hilfe der Reversed-Phase-Chromatographie analysiert. Die in den Fraktionen der auf die  $\mu$ Bondapak-Säule applizierten PTA<sub>1-37</sub>-IR aus EDTA-Plasma bzw. CSF betrug 67,3 bzw. 64,5 %. Wie in Abb. 23 dargestellt, ist die Retentionszeit der Hauptimmunreaktivität der endogenen PTA<sub>1-37</sub>-IR aus dem EDTA-Plasma mit dem aus CSF identisch. Das synthetische PTA<sub>1-37</sub>-Peptid hatte stärkere hydrophobe Eigenschaften, da es im Gegensatz zur nativen PTA<sub>1-37</sub>-IR eine um eine Minute längere Retentionszeit aufwies. Die mittels Immunoassay detektierte native PTA<sub>1-37</sub>-IR ist somit nicht identisch mit dem für den Immunoassay verwendeten Standardpeptid.

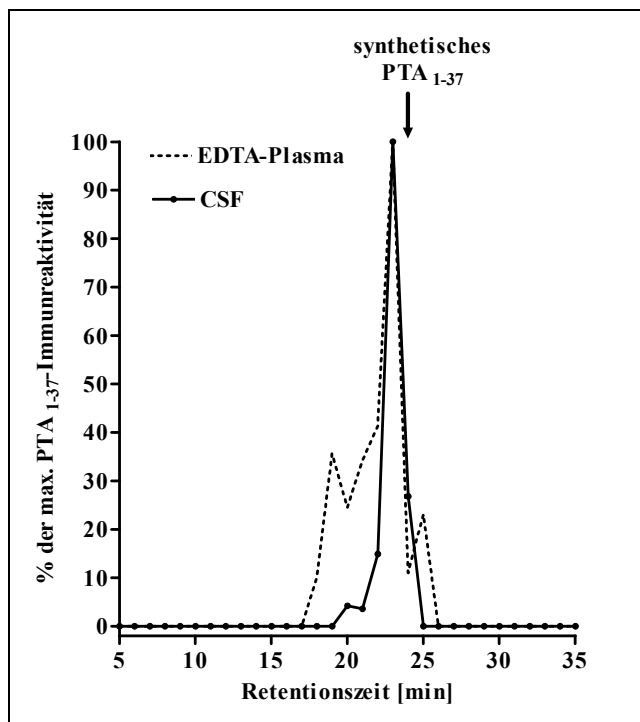


Abb. 23: Darstellung der RP-HPLC-Analyse der endogenen PTA<sub>1-37</sub>-IR aus EDTA-Plasma und CSF sowie des synthetischen PTA<sub>1-37</sub>-Peptids. Die Retentionszeit des synthetischen PTA<sub>1-37</sub>-Peptids ist durch einen Pfeil markiert. Die PTA<sub>1-37</sub>-IR wurde in den Fraktionen 5 bis 35 gemessen. Der jeweilige maximale Messwert wurde als 100 % definiert.

## 5.4. Detektion von PENK A<sub>119-159</sub>, PTA<sub>1-37</sub>-IR und PCT im Blut und CSF

### 5.4.1. Verteilung der PENK A<sub>119-159</sub>, PTA<sub>1-37</sub>- und PCT-Konzentrationen im Blut von gesunden Blutspendern

EDTA-Plasmaproben standen von insgesamt 132 gesunden Blutspendern im Alter zwischen 17 und 84 Jahren zur Verfügung. Das Probenmaterial reichte nicht für alle drei Immunoassays aus, so dass die PTA<sub>1-37</sub>-IR und die PCT-Konzentration nicht in allen Proben vermessen werden konnte. Eine Übersicht der Probandencharakteristika sowie der mittleren gemessenen PENK A<sub>119-159</sub>, PTA<sub>1-37</sub>- und PCT-Konzentrationen ist in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9: Charakterisierung der gesunden Blutspender für die Detektion der PENK A<sub>119-159</sub>, PTA<sub>1-37</sub>- und PCT-Konzentrationen im EDTA-Plasma

	PENK A <sub>119-159</sub>	PTA <sub>1-37</sub>	PCT
n Gesamt	132	130	97
Altersmedian (Altersbereich)	58 (17 – 84)	58 (17 – 84)	57 (23 – 84)
Geschlecht m/ w	70/ 62	68/ 62	60/ 37
mittlere Konzentration (Messbereich)	64,3 pmol/l (26,1 – 155)	6,1 pmol/l (1 – 22,3)	14,0 pg/ml (5 – 154)

Die PENK A<sub>119-159</sub>-Konzentration lag in allen gemessenen Proben über der analytischen Assaysensitivität von 20 pmol/l. Die Verteilung der PENK A<sub>119-159</sub>-Messwerte im EDTA-Plasma von gesunden Blutspendern (n = 132) ist in Abb. 24 A gezeigt. Die Messwerte wiesen keine Normalverteilung auf (Kolmogorov-Smirnov-Test  $P < 0,001$ ) und lagen in einem Konzentrationsbereich zwischen 26,1 und 155 pmol/l (Median 64,3 pmol/l).

In zwei der 130 vermessenen EDTA-Plasmaproben lag die PTA<sub>1-37</sub>-IR unter der analytischen Assaysensitivität von 2,3 pmol/l (definiert als 1 pmol/l). Die Verteilung der PTA<sub>1-37</sub>-IR in einem Konzentrationsbereich zwischen 1 und 22,3 pmol/l (Median 6,1 pmol/l) ist in Abb. 24 B gezeigt. Die Messwerte wiesen ebenfalls keine Normalverteilung auf (Kolmogorov-Smirnov-Test  $P < 0,001$ ).

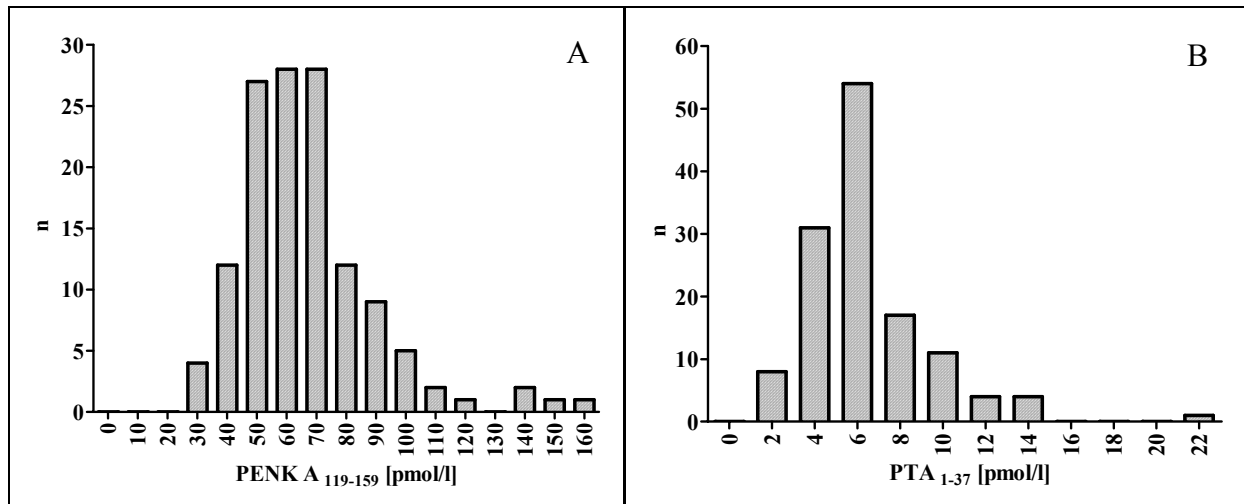


Abb. 24: Verteilung der PENK A<sub>119-159</sub>- (n = 132) (A) und der PTA<sub>1-37</sub>-Konzentrationen (n = 130) (B) im EDTA-Plasma von gesunden Blutspendern. Die Messwerte unterlagen keiner Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test  $P < 0,001$ ).

In zwei der 97 im PCT-Immunoassay vermessenen EDTA-Plasmaproben lag die PCT-Konzentration unter der funktionellen Assaysensitivität von 7 pg/ml (definiert als 5 pg/ml). In Abb. 25 ist die Verteilung der gemessenen PCT-Konzentrationen im Bereich von 5 bis 154 pg/ml (Median 14,0 pg/ml) dargestellt. Die Messwerte wiesen ebenfalls keine Normalverteilung auf (Kolmogorov-Smirnov-Test  $P < 0,001$ )

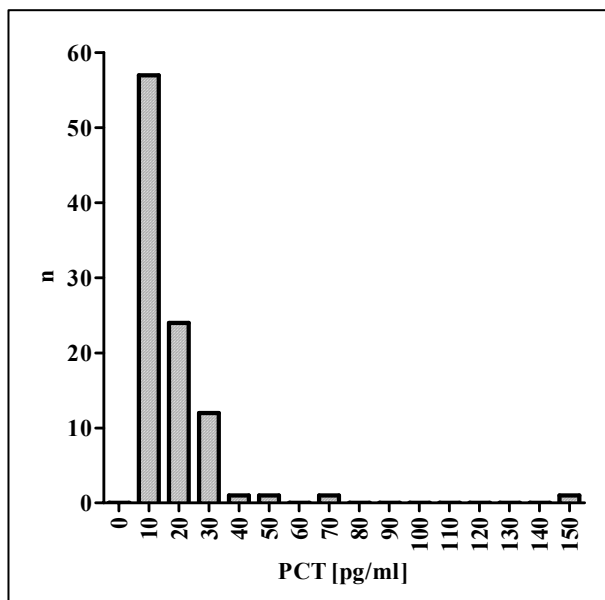


Abb. 25: Verteilung der PCT-Konzentrationen im EDTA-Plasma von gesunden Blutspendern (n = 97). Die Messwerte unterlagen keiner Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test  $P < 0,001$ ).

Die PENK A<sub>119-159</sub>- und PTA<sub>1-37</sub>-Konzentrationen zwischen männlichen und weiblichen Probanden unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 26 A und B; Mann-Whitney U-Test  $P > 0,05$ ). Dagegen waren die PCT-Konzentrationen im Blut der Männer im Vergleich zu den Frauen signifikant höher (Mann-Whitney U-Test  $P < 0,05$ ; Abb. 27).

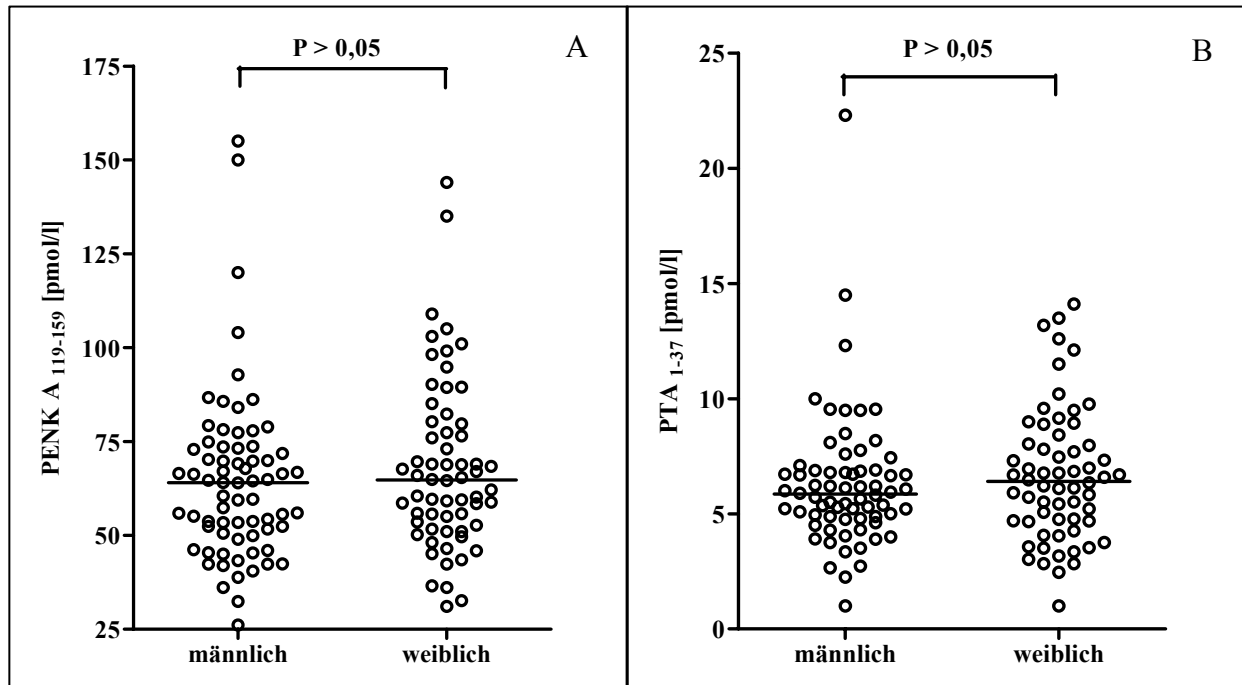


Abb. 26: Verteilung der PENK A<sub>119-159</sub>- (A) und PTA<sub>1-37</sub>-Konzentrationen (B) im EDTA-Plasma von männlichen ( $n = 70$  bzw.  $n = 68$ ) und weiblichen ( $n = 62$ ) Blutspendern. Der Unterschied ist nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test  $P > 0,05$ ).

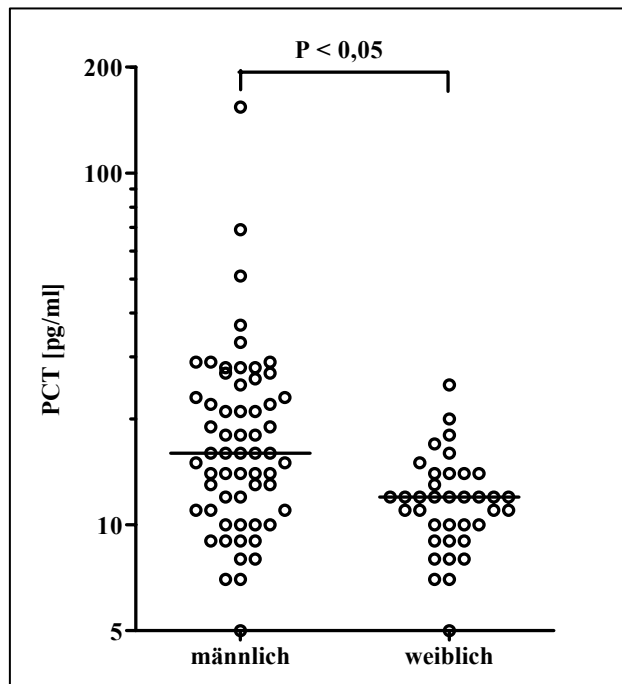


Abb. 27: Verteilung der PCT-Konzentrationen im EDTA-Plasma von männlichen ( $n = 60$ ) und weiblichen ( $n = 37$ ) Blutspendern. Der Unterschied ist signifikant (Mann-Whitney U-Test  $P < 0,05$ ).

Betrachtet man die PENK A<sub>119-159</sub>-IR in Abhängigkeit vom Alter der Probanden, so ergibt sich eine negative Korrelation (Abb. 28; Spearman  $r = -0,28$ ;  $P < 0,001$ ). Die PTA<sub>1-37</sub>- und PCT-Konzentrationen korrelieren nicht mit dem Alter der gesunden Probanden ( $P > 0,05$ ).

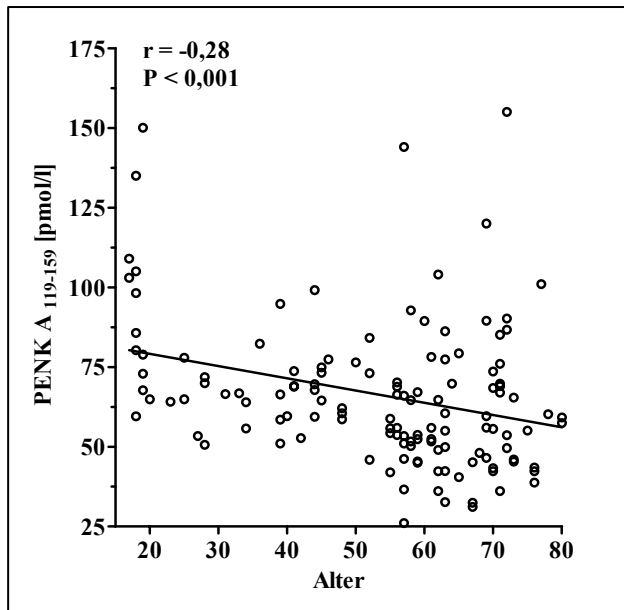


Abb. 28: Altersabhängigkeit der PENK A<sub>119-159</sub>-Konzentrationen im Blut von gesunden Blutspendern ( $n = 132$ ).

Die PENK A<sub>119-159</sub>-IR ist signifikant negativ mit dem Alter korreliert (Spearman  $r = -0,28$ ;  $P < 0,001$ ).

Die PENK A<sub>119-159</sub>- und PTA<sub>1-37</sub>-IR im EDTA-Plasma der Kontrollen sind signifikant positiv miteinander korreliert (Abb. 29; Spearman  $r = 0,34$ ;  $P < 0,0001$ ).

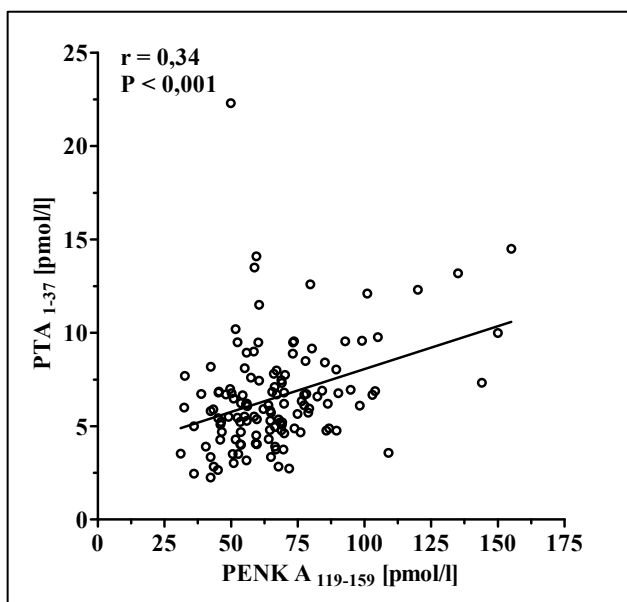


Abb. 29: Korrelation der PENK A<sub>119-159</sub>- und der PTA<sub>1-37</sub>-Konzentrationen im EDTA-Plasma von gesunden Blutspendern ( $n = 130$ ; Spearman  $r = 0,34$ ;  $P < 0,0001$ ).

Dagegen korrelierten die im Blut gemessenen PCT-Konzentrationen der Kontrollprobanden weder mit der PENK A<sub>119-159</sub>- noch mit der PTA<sub>1-37</sub>-Konzentration ( $P > 0,05$ ).



### 5.4.2. Verteilung der PENK A<sub>119-159</sub>-, PTA<sub>1-37</sub>- und PCT-Konzentrationen im CSF von Kontrollprobanden ohne kognitive Beeinträchtigung

Von 50 Probanden ohne klinisch feststellbare kognitive Beeinträchtigungen standen CSF-Proben zur Verfügung. Eine Übersicht der Probandencharakteristika sowie der mittleren gemessenen PENK A<sub>119-159</sub>-, PTA<sub>1-37</sub>- und PCT-Konzentrationen ist in Tabelle 10 gegeben.

Tabelle 10: Charakterisierung der Kontrollprobanden (ohne kognitive Störungen) für die Detektion der PENK A<sub>119-159</sub>-, PTA<sub>1-37</sub>- und PCT-Konzentration im CSF

	PENK A <sub>119-159</sub>	PTA <sub>1-37</sub>	PCT
n Gesamt	49	49	50
Geschlecht m/ w	27/ 14	27/ 14	28/ 14
Altersmedian (Altersbereich)	60 (24 – 84)	60 (24 – 84)	60 (24 – 84)
mittlere Konzentration (Messbereich)	6.240 pmol/l (2.320 – 11.000)	490 pmol/l (260 – 960)	27,5 pg/ml (8 – 450)

Die Verteilung der PENK A<sub>119-159</sub>- und PTA<sub>1-37</sub>-Messwerte im CSF der Kontrollprobanden ist in Abb. 30 A und B dargestellt.

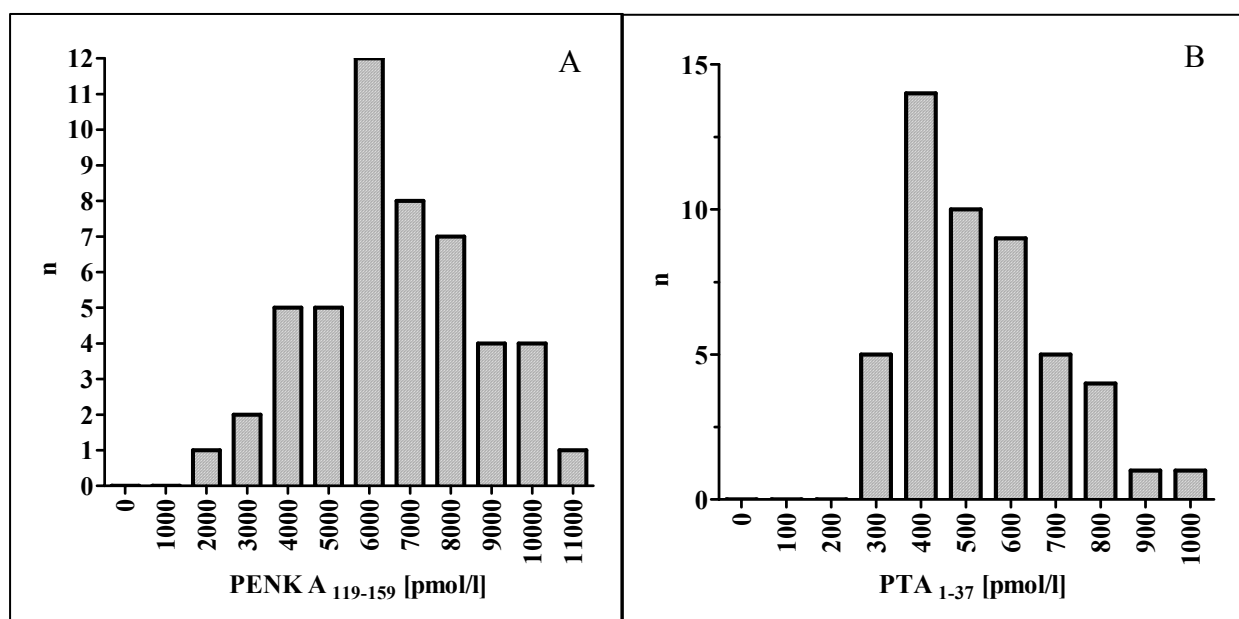


Abb. 30: Verteilung der PENK A<sub>119-159</sub>- (A) und PTA<sub>1-37</sub>-Konzentrationen (B) im CSF von Kontrollprobanden ohne klinisch feststellbare kognitive Defizite (n = 49). Die Messwerte unterliegen einer Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test  $P > 0,05$ ).

Die Kontrollen wiesen im Mittel PENK A<sub>119-159</sub>-Konzentrationen von 6.240 pmol/l in einem Messbereich zwischen 2.320 und 11.000 pmol/l auf. Die mittlere PTA<sub>1-37</sub>-Konzentration der gesunden Probanden lag bei 490 pmol/l (Bereich von 260 bis 960 pmol/l). Sowohl PENK A<sub>119-159</sub> als auch PTA<sub>1-37</sub> wiesen im CSF eine Normalverteilung auf (Kolmogorov-Smirnov-Test  $P > 0,05$ ).

Die Verteilung der PCT-Messwerte im CSF der Kontrollprobanden ist in Abb. 31 gezeigt. Die mittlere PCT-Konzentration der Kontrollen lag bei 27,5 pg/ml in einem Messbereich zwischen 8 und 450 pg/ml. Die Messwerte sind nicht normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test  $P < 0,001$ ). Ein 84-Jähriger Kontrollproband wies einen PCT-Wert im CSF von 450 pg/ml auf. Mit Hilfe des Grubb's-Tests konnte dieser als statistischer Ausreißer identifiziert werden.

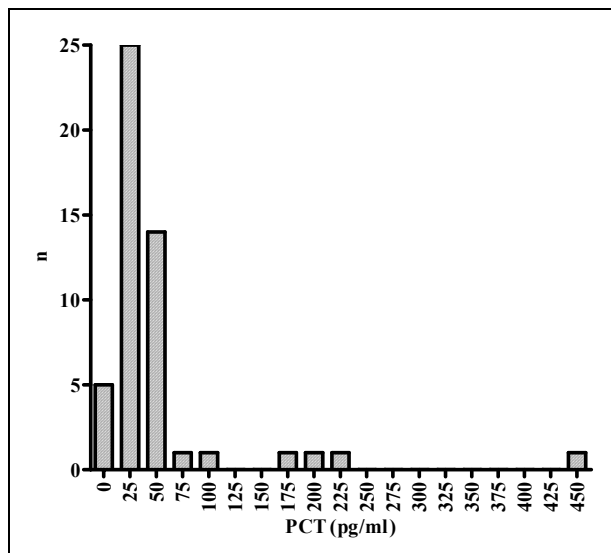


Abb. 31: Verteilung der PCT-Konzentrationen im CSF von Kontrollen ohne feststellbare kognitive Störungen ( $n = 50$ ). Die Messwerte unterliegen keiner Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test  $P < 0,001$ ).

Im Gegensatz zum Blut war PENK A<sub>119-159</sub> im CSF nicht vom Alter der Probanden abhängig ( $P > 0,05$ ). Auch für die PTA<sub>1-37</sub>-IR des CSF ergab sich keine Abhängigkeit vom Alter ( $P > 0,05$ ). Im Unterschied dazu waren die PCT-Konzentrationen im CSF signifikant positiv mit dem Alter der Kontrollprobanden korreliert (Abb. 32; Spearman  $r = 0,39$ ;  $P < 0,01$ ). Die PENK A<sub>119-159</sub>-, PTA<sub>1-37</sub>- sowie PCT-Konzentrationen unterschieden sich im CSF nicht signifikant zwischen männlichen und weiblichen Probanden ( $P > 0,05$ ).

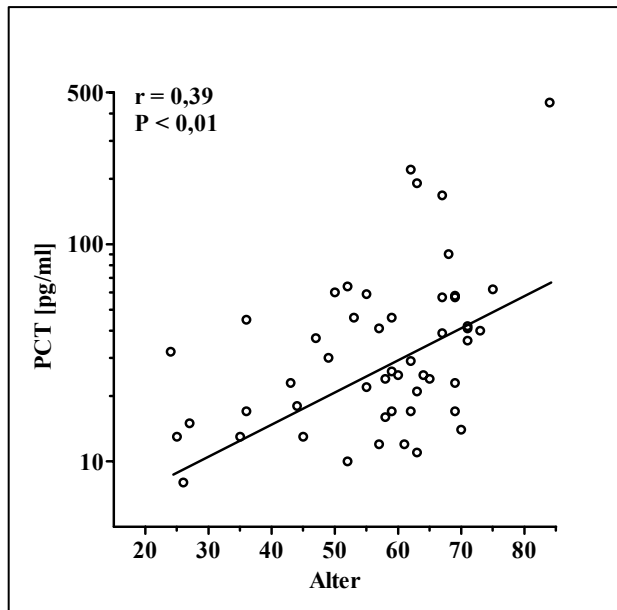


Abb. 32: Korrelation der PCT-Konzentration mit dem Alter von Kontrollprobanden ohne vorliegende neurologische Störungen (n = 50) im CSF (Spearman  $r = 0,39$ ;  $P < 0,01$ ).

Wie in der Zirkulation war die PENK A<sub>119-159</sub>-Konzentration auch im CSF signifikant positiv mit der PTA<sub>1-37</sub>-Konzentration der Kontrollprobanden korreliert (Abb. 33; Spearman  $r = 0,61$ ;  $P < 0,0001$ ). Dagegen zeigten weder die PENK A<sub>119-159</sub>- noch die PTA<sub>1-37</sub>-Messwerte im CSF eine signifikante Abhängigkeit von der entsprechenden PCT-Konzentration ( $P > 0,05$ ).

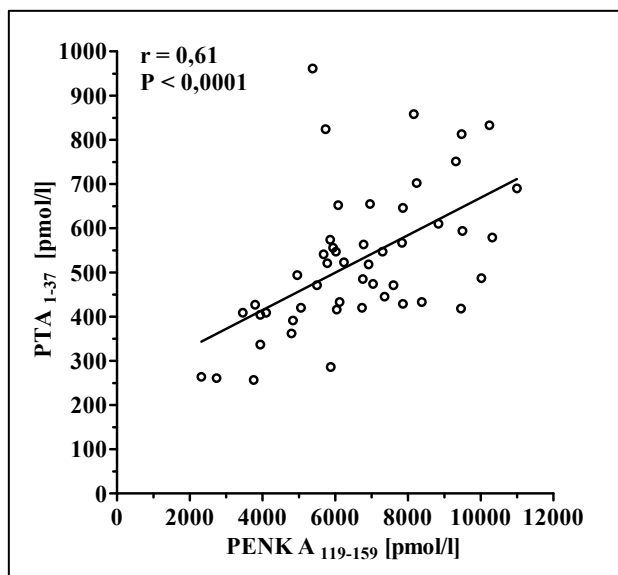


Abb. 33: Korrelation der PENK A<sub>119-159</sub>- und der PTA<sub>1-37</sub>-Konzentrationen im CSF von Kontrollprobanden ohne kognitive Beeinträchtigung (n = 49; Spearman  $r = 0,61$ ;  $P < 0,0001$ ).

### 5.4.3. PENK A<sub>119-159</sub>-, PTA<sub>1-37</sub>- und PCT-Konzentrationen im Blut von Patienten mit demenziellen Erkrankungen und dem Alter angepasste Kontrollen

82 der 132 unter Punkt 5.4.1. untersuchten gesunden Probanden wurden von Prof. Hampel (LMU, München) als dem Alter der Demenzpatienten entsprechende Kontrollgruppe (45 bis 84 Jahre) ohne kognitive Beeinträchtigung (MMS-Test  $\geq 28$ ) zur Verfügung gestellt. Diese Probandengruppe dient im Folgenden als Vergleichsgruppe zu den Patienten mit primären Demenzsyndromen. Eine Übersicht der Patienten ist für die gemessenen PENK A<sub>119-159</sub>-, PTA<sub>1-37</sub>- und PCT-Konzentrationen in den Tabellen 11 bis 13 gegeben.

Tabelle 11: Übersicht der im PENK A<sub>119-159</sub>-Immunoassay vermessenen EDTA-Plasmaproben

Indikation	gesunde Kontrollen	SKS	LKB	ws AD	FTD	DLB	VD
n	82	63	42	127	19	9	13
Altersmedian	64	69	74	75	61	75	77
mittlere PENK A <sub>119-159</sub> - Konz. in pmol/l (Messbereich)	56 (26 – 155)	56 (27 – 178)	56 (33 – 129)	59 (30 – 151)	50 (38 – 87)	48 (33 – 74)	50 (42 – 167)

Tabelle 12: Übersicht der im PTA<sub>1-37</sub>-Immunoassay vermessenen EDTA-Plasmaproben

	gesunde Kontrollen	SKS	LKB	ws AD	FTD	DLB	VD
n	80	61	46	135	17	8	14
Altersmedian	65	70	74	75	62	78	77
mittlere PTA <sub>1-37</sub> - Konzentration in pmol/l (Messbereich)	6,2 (1–22,3)	6,2 (2,7 – 25,5)	6,7 (1– 22,0)	6,4 (1– 48,9)	5,2 (2,4– 19,7)	5,9 (2,5- 18,4)	4,1 (3,1– 49,4)

Tabelle 13: Übersicht der im PCT-Immunoassay vermessenen EDTA-Plasmaproben

Indikation	gesunde Kontrollen	SKS	LKB	ws AD	FTD	DLB	VD
n	69	55	10	76	12	8	10
Altersmedian	60	64	63	74	60	74	75
mittlere PCT-Konz. in pg/ml (Messbereich)	12 (7 – 154)	13 (5 – 72)	16 (8 – 44)	13 (5 – 80)	11 (6 – 44)	12 (10 – 28)	13 (6 – 18)

Im Vergleich zur dem Alter angepassten Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied in der PENK A<sub>119-159</sub>- (Abb. 34 A; Kruskal-Wallis-Test  $P > 0,05$ ) und der PTA<sub>1-37</sub>-Konzentration (Abb. 34 B; Kruskal-Wallis-Test  $P > 0,05$ ) im EDTA-Plasma von Patienten mit SKS, LKB, ws AD, FTD, DLB oder VD gefunden werden.

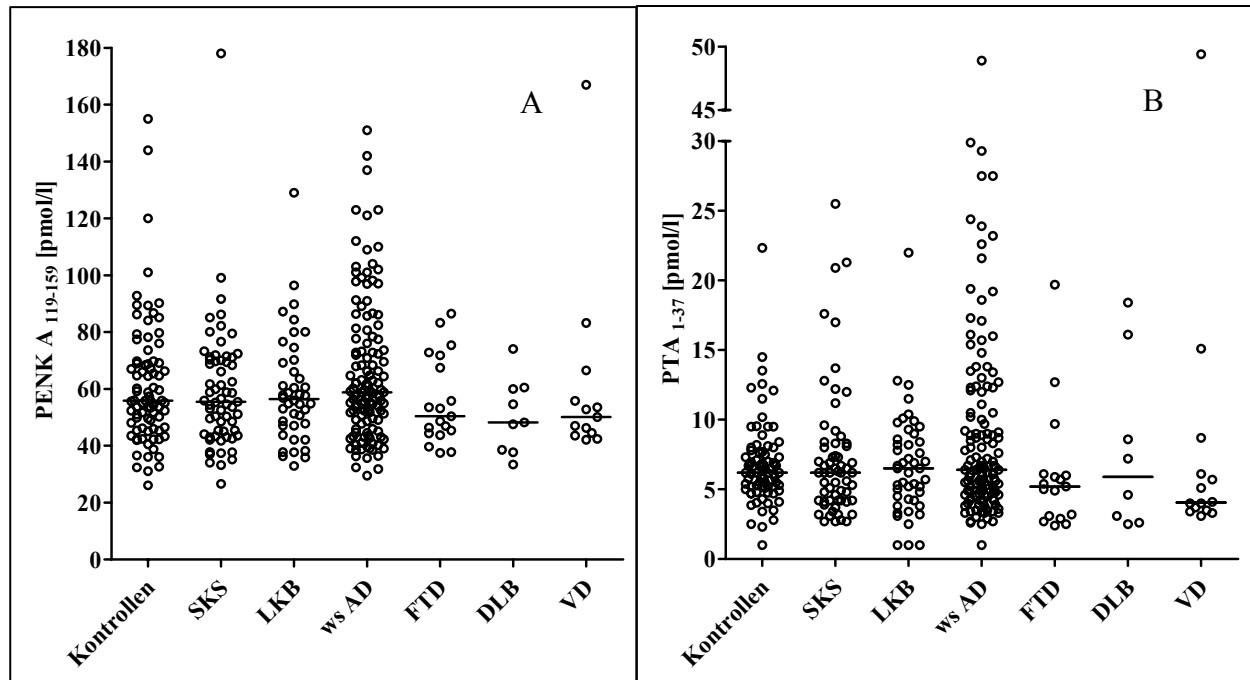


Abb. 34: Verteilung der PENK A<sub>119-159</sub>- (A) und PTA<sub>1-37</sub>-Konzentrationen (B) im EDTA-Plasma von gesunden, dem Alter angepassten Kontrollen und Patienten mit diversen primären Demenzerkrankungen. Die Mediane der Patientengruppen unterscheiden sich nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test  $P > 0,05$ ).

Auch die PCT-Konzentration der einzelnen Demenzpatientengruppen unterschied sich nicht signifikant von den Kontrollprobanden (Abb. 35; Kruskal-Wallis-Test  $P > 0,05$ ).

Die PENK A<sub>119-159</sub>- und PTA<sub>1-37</sub>-Messwerte der Demenzpatienten ( $n = 149$ ) mit ws AD, FTD, DLB und VD zeigten, wie die gesunden Kontrollen ( $n = 132$ ) unter Punkt 5.4.1., eine signifikant positive Korrelation (Spearman  $r = 0,37$ ;  $P < 0,0001$ ). Im Unterschied zu den gesunden Blutspendern zeigte sich für die untersuchten Demenzpatienten sowohl für PENK A<sub>119-159</sub> ( $n = 82$ ; Spearman  $r = 0,34$ ;  $P < 0,01$ ) als auch für PTA<sub>1-37</sub> ( $n = 71$ ; Spearman  $r = 0,50$ ;  $P < 0,0001$ ) eine positive Abhängigkeit von den zugehörigen PCT-Konzentrationen.

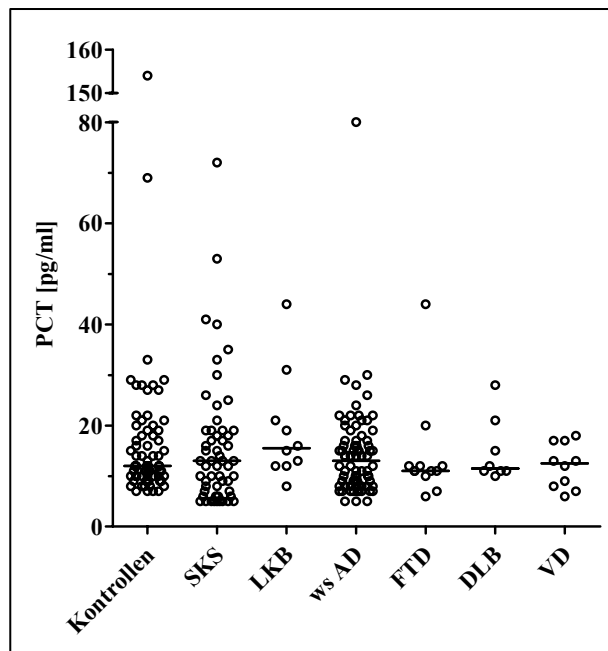


Abb. 35: Verteilung der PCT-Konzentrationen im EDTA-Plasma von gesunden, dem Alter angepassten Kontrollprobanden und Patienten mit verschiedenen klinisch diagnostizierten Demenzerkrankungen. Die Mediane der Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant (Kruskall-Wallis-Test  $P > 0,05$ ).

#### 5.4.4. PENK A<sub>119-159</sub>-, PTA<sub>1-37</sub>- und PCT-Konzentrationen im CSF von Patienten mit demenziellen Erkrankungen und akuter Neuroinflammation

Die PENK A<sub>119-159</sub>-, PTA<sub>1-37</sub>- sowie die PCT-Konzentration wurde im CSF von Patienten mit unterschiedlichen Demenzformen sowie von Patienten mit einer klinisch diagnostizierten Meningitis oder Enzephalitis vermessen. Die Meningitis- und Enzephalitispatienten wurden in der Gruppe „akute Neuroinflammation“ zusammengefasst. Die Charakterisierung der Patientengruppen sowie die mittleren gemessenen CSF-Konzentrationen sind für PENK A<sub>119-159</sub>-, PTA<sub>1-37</sub>- sowie PCT in Tabelle 14 zusammengestellt. Die Probanden der nicht-dementen Kontrollgruppe entsprechen den bereits unter 5.4.2. betrachteten Personen.

Die mittlere PENK A<sub>119-159</sub>-Konzentration war im Vergleich zur Kontrollgruppe in allen Patientengruppen erniedrigt (Abb. 36). Der Konzentrationsunterschied der Gruppen war signifikant (Kruskall-Wallis-Test  $P < 0,01$ ). Der nachfolgende Dunn's-Post-Test, der eine Aussage über das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen trifft, zeigte eine signifikante Abweichung zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten mit einer VD ( $P < 0,05$ ). Für alle weiteren Patientengruppen ergaben sich dagegen keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 14: Übersicht der im PENK A<sub>119-159</sub>, PTA<sub>1-37</sub> und PCT-Immunoassay vermessenen Patienten (CSF)

Indikation	nicht-demente Kontrollen	SKS	ws AD	FTD	DLB	VD	akute Neuroinflammation
Anzahl	50*	13	40	12	8	12	16
Altersmedian	60	60	75	60	74	75	72
mittlere	6.200	5.500	5.400	5.300	4.700	4.500	4.700
PENK A <sub>119-159</sub> Konz. in pmol/l (Messbereich)	(2.300 – 11.000)	(3.100 – 8.500)	(1.500 – 9.900)	(2.600 – 10.600)	(1.800 – 6.200)	(1.800 – 9.100)	(1.500 – 11.500)
mittlere PTA <sub>1-37</sub> Konz. in pmol/l (Messbereich)	490 (260–960)	490 (290–690)	410 (200-850)	470 (270-970)	315 (210-520)	475 (200-810)	235 (30-650)
mittlere PCT- Konz. in pg/ml (Messbereich)	28 (8 – 450)	64 (13 – 156)	68 (11– 564)	61 (45- 693)	200 (78-413)	143 (42-461)	70 (20-3910)

\* n = 49 Patienten für die Bestimmung der PENK A<sub>119-159</sub> sowie der PTA<sub>1-37</sub>-IR

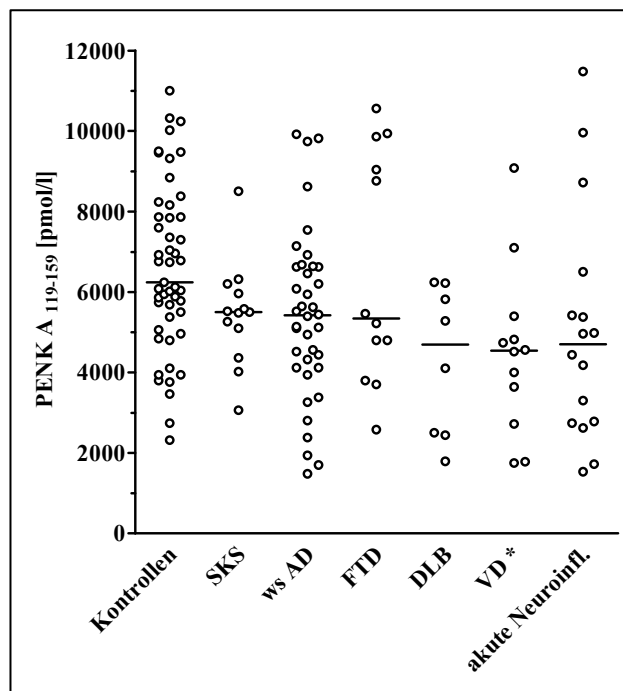


Abb. 36: Darstellung der PENK A<sub>119-159</sub>-Messwerte im CSF von Kontrollen ohne kognitive Beeinträchtigungen, Patienten mit verschiedenen Demenzerkrankungen sowie Patienten mit akuter Neuroinflammation (Kruskal-Wallis-Test  $P < 0,01$ ). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen und der Kontrollgruppe wurden mit dem Dunn's-Post Test ermittelt (\*  $P < 0,05$ ).

Für die ROC-Analyse wurden die 49 Kontrollen sowie 70 Patienten mit primärer Demenz (ws AD, FTD, DLB und VD) herangezogen. Es ergab sich eine AUC von 0,67 (95% CI: 0,58 - 0,77;  $P < 0,01$ ) (siehe Abb. 37). Für eine Konzentration von  $< 4.900$  pmol/l PENK A<sub>119-159</sub> (Schwellenwert) ergab sich eine Spezifität von 79,6 % bei einer Sensitivität von 45,7 %. Das bedeutet, dass knapp 80 % der nicht-dementen Patienten vom PENK A<sub>119-159</sub>-Test als richtig gesund erkannt werden, wohingegen nur 45 % der tatsächlichen Demenzpatienten als Erkrankte erkannt wurden. Die Chance zu erkranken (so genannte Odds Ratio) lag bei einem Schwellenwert von 4.900 pmol/l bei 3,3.

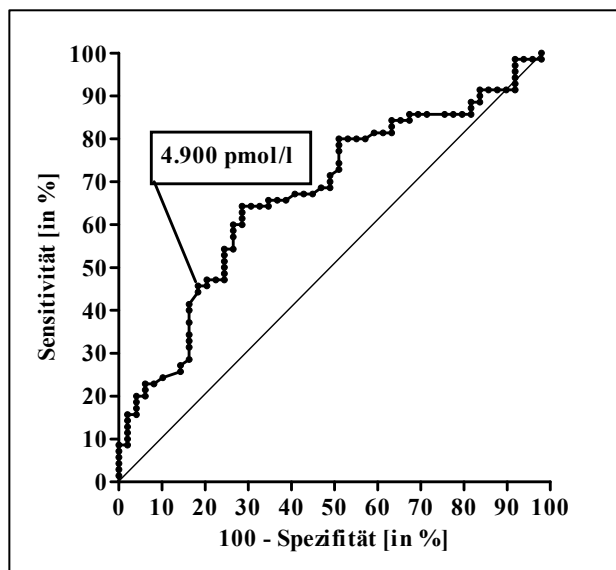


Abb. 37: ROC-Plot Analyse der PENK A<sub>119-159</sub>-Messwerte im CSF von Kontrollen ohne kognitive Beeinträchtigungen und Patienten mit primärem Demenzsyndrom. Die AUC beträgt 0,67 (95% CI: 0,58 – 0,77;  $P < 0,01$ ). Sensitivitäts- und Spezifitätsdatenpaare wurden bestimmt durch die Variation des Schwellenwerts über den gesamten PENK A<sub>119-159</sub>-Messbereich.

Die mittlere PTA<sub>1-37</sub>-Konzentration war im Vergleich zur Kontrollgruppe bei den untersuchten Patientengruppen erniedrigt (siehe Abb. 38). Der Konzentrationsunterschied der Gruppen war auch hier signifikant (Kruskall-Wallis-Test  $P < 0,001$ ). Der nachfolgende Dunn's-Post-Test zeigte eine signifikante Abweichung zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten mit akuter Neuroinflammation ( $P < 0,001$ ) sowie zwischen SKS- bzw. FTD-Patienten und Patienten mit akuter Neuroinflammation ( $P < 0,05$  und  $P < 0,05$ ). Für die weiteren Patientengruppen ergaben sich dagegen keine signifikanten Unterschiede.



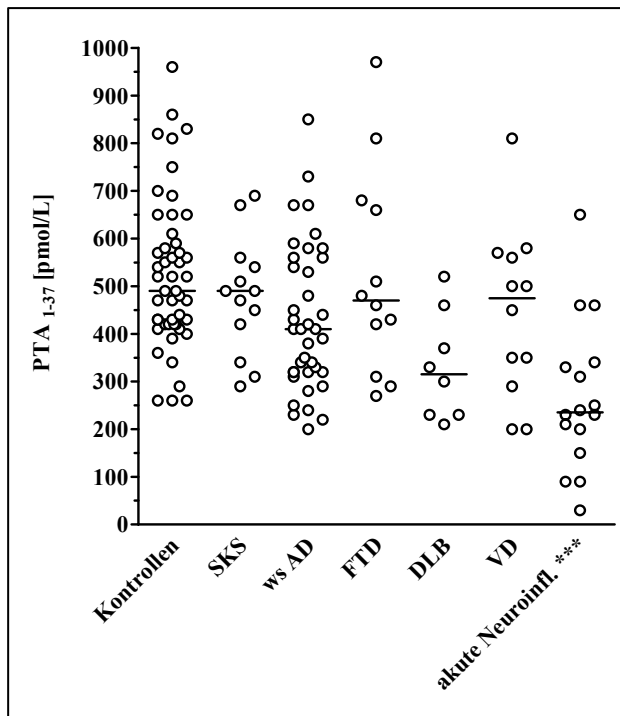


Abb. 38: Darstellung der PTA<sub>1-37</sub>-Werte im CSF von Kontrollen, Patienten mit verschiedenen Demenzerkrankungen sowie akuter Neuroinflammation (Kruskal-Wallis-Test  $P < 0,001$ ). Signifikante Unterschiede zwischen den Patienten- und der Kontrollgruppe wurden mit dem Dunn's-Post Test ermittelt; \*\*\*  $P < 0,001$ ).

Die ROC-Analyse unter Betrachtung der 49 Kontrollprobanden sowie der 70 Patienten mit primärem Demenzsyndrom (Abb. 39) resultierte in einer AUC von 0,66 (95% CI: 0,59 - 0,75;  $P < 0,01$ ). Bei einem Schwellenwert von  $< 415$  pmol/l PTA<sub>1-37</sub> ergab sich eine Spezifität von 79,6 % bei einer Sensitivität von 50,0 %. Die Odds-Ratio lag bei 3,9.

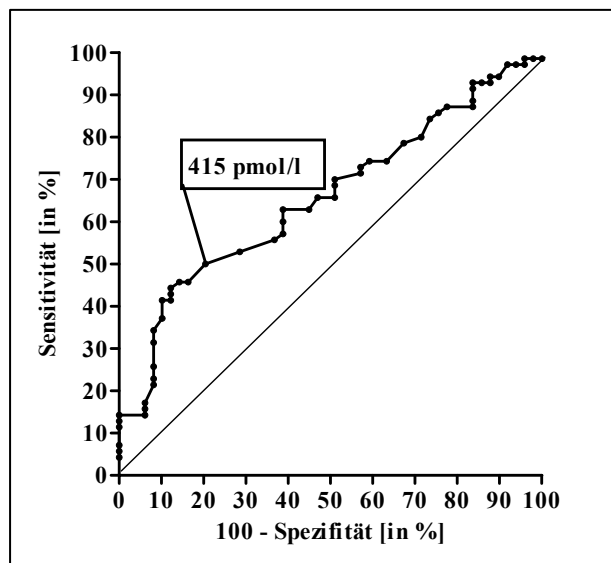


Abb. 39: ROC-Plot Analyse der PTA<sub>1-37</sub>-Messwerte im CSF von Kontrollen ohne kognitive Beeinträchtigungen und Patienten mit primärer Demenz. Die AUC beträgt 0,66 (95 % CI: 0,59 – 0,75;  $P < 0,01$ ). Sensitivitäts- und Spezifitätsdatenpaare wurden bestimmt durch die Variation des Schwellenwerts über den gesamten PTA<sub>1-37</sub>-Messbereich.

Im Vergleich zu den 50 Kontrollprobanden waren die mittleren PCT-Konzentrationen im CSF von allen Patientengruppen signifikant erhöht (siehe Abb. 40; Kruskal-Wallis-Test  $P < 0,001$ ). Der nachfolgende Dunn's-Post-Test zeigte signifikante Abweichungen zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten mit ws AD ( $P < 0,001$ ), einer FTD ( $P < 0,05$ ), einer DLB ( $P < 0,001$ ), einer VD ( $P < 0,001$ ) sowie einer akuten Neuroinflammation ( $P < 0,05$ ). Dagegen unterschieden sich die PCT-Konzentrationen im CSF von Patienten mit SKS nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe ( $P > 0,05$ ).

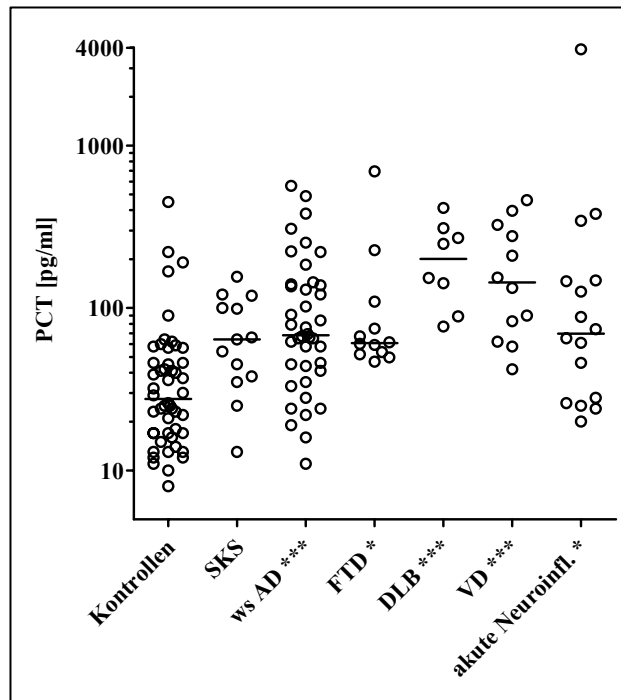


Abb. 40: Darstellung der PCT-Konzentrationen im CSF von Kontrollen ohne kognitive Beeinträchtigungen, Patienten mit primären Demenzerkrankungen sowie Patienten mit akuter Neuroinflammation (Kruskal-Wallis-Test  $P < 0,001$ ). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen und der Kontrollgruppe wurden mit dem Dunn's-Post Test ermittelt (\*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ).

Die ROC-Analyse unter Betrachtung der 50 Kontrollprobanden sowie 72 Demenzpatienten (Abb. 41) resultierte in einer AUC von 0,83 (95% CI: 0,76 - 0,91;  $P < 0,001$ ). Bei einem Schwellenwert von  $< 57$  pmol/l PCT ergab sich eine Spezifität von 80,0 % bei einer Sensitivität von 75,0 %. Die Wahrscheinlichkeit an einer Demenz zu erkranken lag bei diesem Schwellenwert bei 12,0.

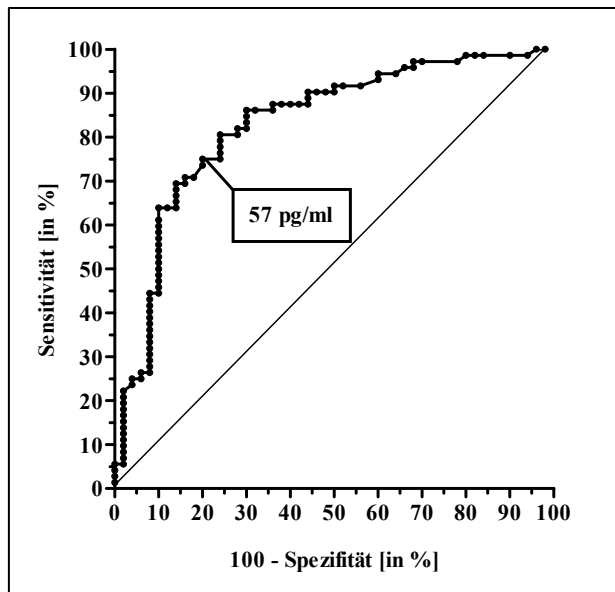


Abb. 41: ROC-Plot Analyse der PCT-Konzentrationen im CSF von Kontrollen ohne kognitive Beeinträchtigungen und Patienten mit primärem Demenzsyndrom. Die AUC beträgt 0,83 (95 % CI: 0,76 – 0,91;  $P < 0,001$ ). Sensitivitäts- und Spezifitätsdatenpaare wurden durch die Variation des Schwellenwerts über den gesamten PCT-Messbereich bestimmt.

Die PENK A<sub>119-159</sub>- und PTA<sub>1-37</sub>-Messwerte im CSF von Patienten mit ws AD, FTD, DLB, VD und akuter Neuroinflammation ( $n = 86$ ) zeigten, wie die Kontrollprobanden unter Punkt 5.4.2., eine signifikant positive Korrelation (siehe Abb. 42; Spearman  $r = 0,77$ ;  $P < 0,0001$ ). Die PCT-Konzentrationen hängen dagegen, wie auch bei den Kontrollen, weder mit der PENK A<sub>119-159</sub>- noch mit der PTA<sub>1-37</sub>-IR ( $P > 0,05$ ) zusammen.

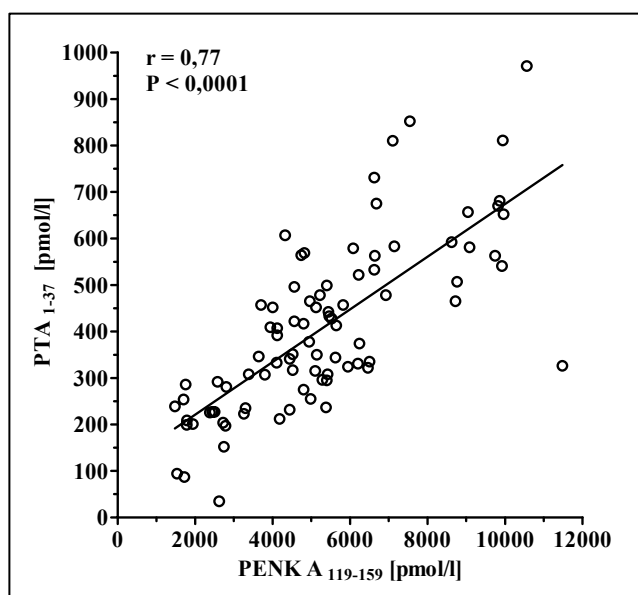


Abb. 42: Korrelation der PENK A<sub>119-159</sub>- und PTA<sub>1-37</sub>-Konzentrationen im CSF von Patienten mit verschiedenen Demenzformen sowie Patienten mit akuter Neuroinflammation ( $n = 86$ ; Spearman  $r = 0,77$ ;  $P < 0,0001$ ).

Ähnlich wie für Blut ergab sich für CSF keine Korrelation der PENK A<sub>119-159</sub>- sowie der PTA<sub>1-37</sub>-Werte ( $P > 0,05$ ) mit dem MMS-Score. Dieser stellt ein Maß zur Beurteilung des Schweregrades einer Demenz dar (siehe Kapitel 1.1.4.). Die PCT-Werte wiesen im Unterschied zum Blut ( $P > 0,05$ ), eine signifikant negative Abhängigkeit vom entsprechenden MMS-Score auf (Spearman  $r = -0,29$ ;  $P < 0,05$ ).

#### **5.4.5. Vergleich der PENK A<sub>119-159</sub>-, PTA<sub>1-37</sub>- und PCT-Konzentrationen in CSF und Blut**

Von den 50 CSF-Proben der als kognitiv unbeeinträchtigt eingestuften Kontrollen standen parallel von 23 Probanden EDTA-Plasma- sowie von 24 Probanden Serumproben zur Verfügung. Des Weiteren standen parallel zu den CSF-Proben der 72 Patienten mit primärem Demenzsyndrom sowie der 13 SKS-Patienten EDTA-Plasmaproben und von den 16 Patienten mit akuter Neuroinflammation Serumproben bereit. Serum und EDTA-Plasma wurden im PCT-Assay vermessen, wohingegen nur die EDTA-Plasmaproben im PENK A<sub>119-159</sub>- sowie PTA<sub>1-37</sub>-Assay vermessen wurden. Die Serumproben wurden bei letzteren beiden aufgrund der geringen Stabilität von PTA<sub>1-37</sub> im Serum (siehe Kapitel 5.3.4.) sowie der um 20 % erniedrigten Serummesswerte des PENK A<sub>119-159</sub> im Vergleich zum EDTA-Plasma nicht berücksichtigt (siehe Kapitel 5.2.4.).

Die mittlere PENK A<sub>119-159</sub>-Konzentration von Patienten ohne kognitive Defizite ( $n = 23$ ) war im CSF (Median 7.000 pmol/l) im Vergleich zum EDTA-Plasma (Median 49,2 pmol/l) signifikant um das 140fache erhöht (Abb. 43 A; Wilcoxon signed rank Test  $P < 0,0001$ ). Dagegen lag der Konzentrationsgradient zwischen CSF- und Plasmapaaren bei den Patienten mit primärer Demenz mit durchschnittlich 95 deutlich niedriger (Abb. 42 B; Wilcoxon signed rank Test  $P < 0,0001$ ). Die PENK A<sub>119-159</sub>-Messwerte im EDTA-Plasma korrelierten nicht mit den Werten im CSF ( $P > 0,05$ ).

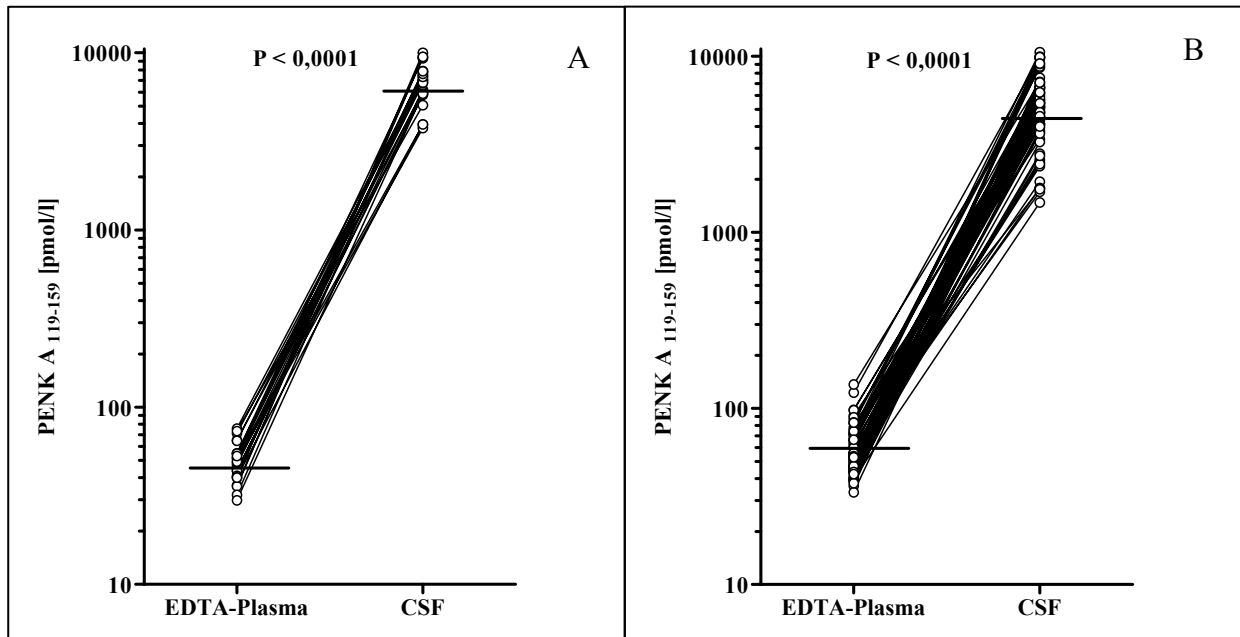


Abb. 43: Darstellung der PENK A<sub>119-159</sub>-Konzentrationsgradienten zwischen parallel entnommenen EDTA-Plasma- und CSF-Proben von Kontrollprobanden ohne kognitive Defizite (n = 23) (A) und Patienten mit einem primären Demenzsyndrom (n = 70) (B). Die Messwerte der Probenpaare unterschieden sich für beide Probandengruppen signifikant (Wilcoxon signed rank Test  $P < 0,0001$ ).

Betrachtet man den Konzentrationsgradienten zwischen CSF und EDTA-Plasma von PENK A<sub>119-159</sub> der einzelnen Gruppen, so ergibt sich auch hier ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 44; Kruskal-Wallis-Test  $P < 0,01$ ).

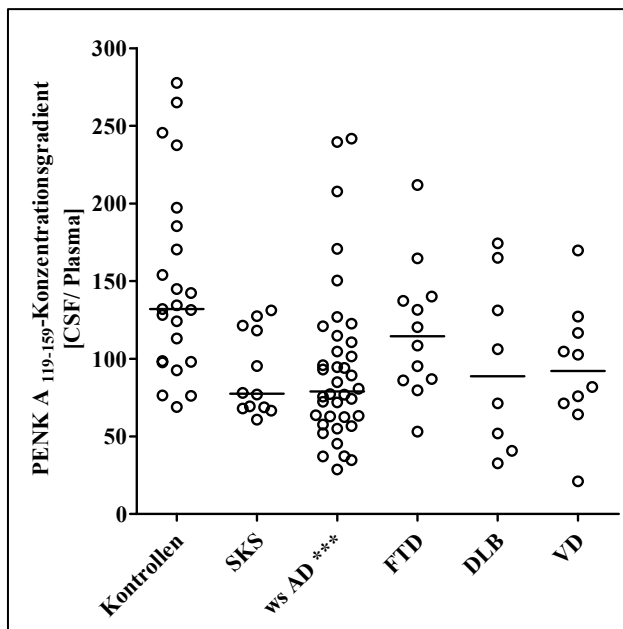


Abb. 44: Darstellung der PENK A<sub>119-159</sub>-Konzentrationsgradienten zwischen CSF- und EDTA-Plasmapaaren von Kontrollen und Patienten mit verschiedenen Demenzerkrankungen (Kruskal-Wallis-Test  $P < 0,01$ ). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen und der Kontrollgruppe wurden mit dem Dunn's-Post Test ermittelt; \*\*\*  $P < 0,001$ ).

Der nachfolgende Dunn's-Post-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den ws AD-Patienten ( $P < 0,001$ ), wohingegen die Patienten mit FTD, DLB und VD keine signifikante Abweichung ( $P > 0,05$ ) des Konzentrationsgradienten in Bezug auf die Kontrollen aufwiesen.

Eine ROC-Analyse unter Betrachtung der 23 Kontrollprobanden sowie der 38 Patienten mit ws AD (siehe Abb. 45) ergab eine AUC von 0,79 (95 % CI: 0,68 - 0,91;  $P < 0,001$ ). Bei einem Schwellenwert des PENK A<sub>119-159</sub>-Konzentrationsgradienten von  $< 96,7$  ergab sich eine Spezifität von 82,6 % bei einer Sensitivität von 68,4 %. Die Wahrscheinlichkeit, an einer Demenz zu erkranken lag bei diesem Schwellenwert bei 10,3. Betrachtet man im Vergleich dazu nur die PENK A<sub>119-159</sub>-Messwerte im CSF, so resultierte dies in einer deutlich niedrigeren Sensitivität von 36,8 % bei einer Spezifität von 79,2 %.

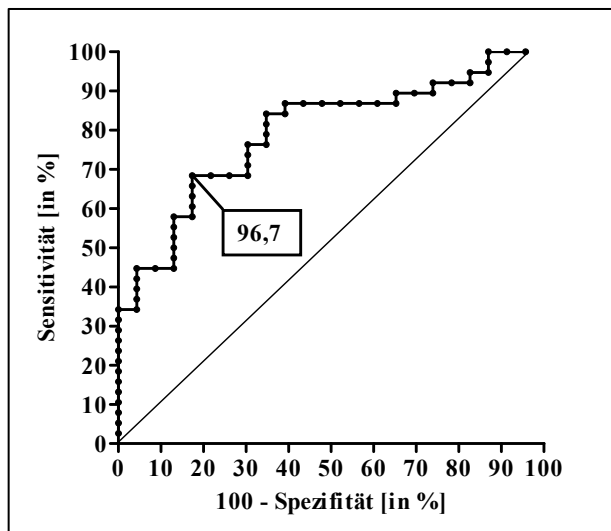


Abb. 45: ROC-Plot Analyse der PENK A<sub>119-159</sub>-Konzentrationsgradienten zwischen parallel entnommenen CSF- und EDTA-Plasmaproben von Kontrollen und Patienten mit ws AD. Die AUC beträgt 0,79 (95% CI: 0,68 – 0,91;  $P < 0,001$ ). Sensitivitäts- und Spezifitätsdatenpaare wurden bestimmt durch die Variation des Schwellenwerts über den gesamten Bereich der ermittelten PENK A<sub>119-159</sub>-Konzentrationsgradienten.

Für die PTA<sub>1-37</sub>-IR ergab sich ein Gradient von 72 zwischen CSF (Median 490 pmol/l) und Plasma (Median 6,8 pmol/l) in den Kontrollen (Abb. 46 A; Wilcoxon signed rank Test  $P < 0,0001$ ). Der Konzentrationsgradient der Demenzpatienten (Abb. 46 B; Wilcoxon signed rank Test  $P < 0,0001$ ) lag bei 73 und unterschied sich nicht von dem der Kontrollprobanden. Die PTA<sub>1-37</sub>-IR im Plasma korrelierte nicht mit der gemessenen IR im CSF ( $P > 0,05$ ).

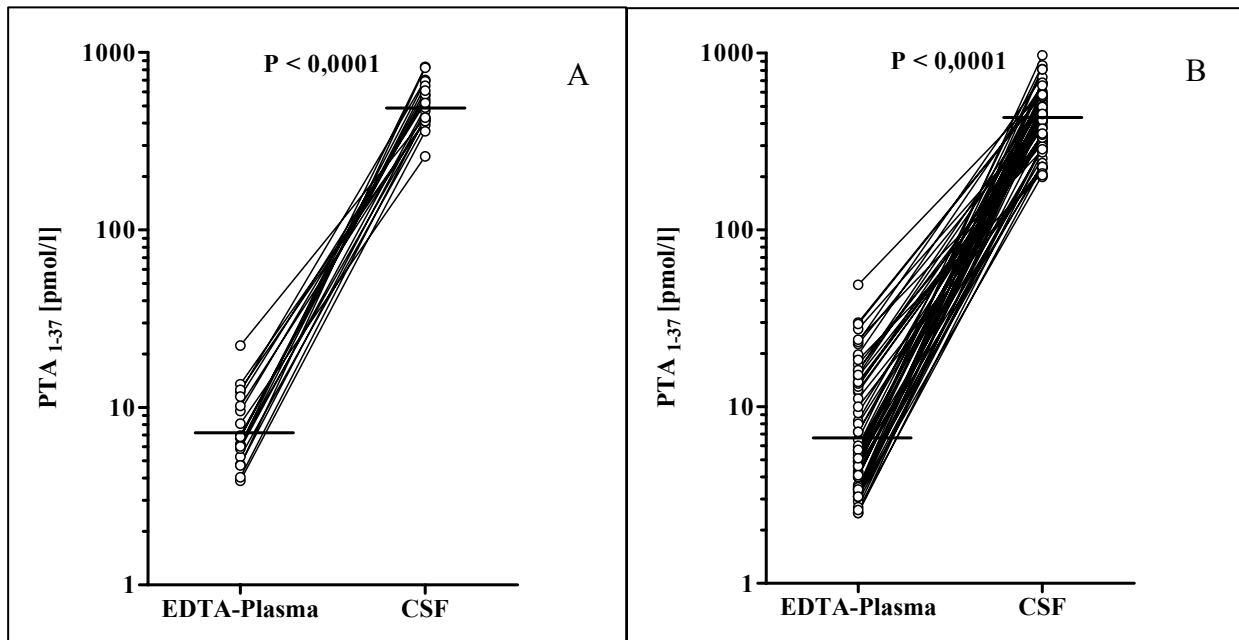


Abb. 46: Darstellung der PTA<sub>1-37</sub>-Konzentrationsgradienten zwischen parallel entnommenen CSF- und EDTA-Plasmaproben von Kontrollprobanden (n = 21) (A) und Patienten mit primärer Demenz (n = 70) (B). Die Abweichungen beider Gruppen waren signifikant (Wilcoxon signed rank Test  $P < 0,0001$ ).

Die Konzentrationsgradienten der PTA<sub>1-37</sub>-IR der einzelnen Gruppen unterschieden sich ebenfalls signifikant (siehe Abb. 47; Kruskal-Wallis-Test  $P < 0,001$ ).

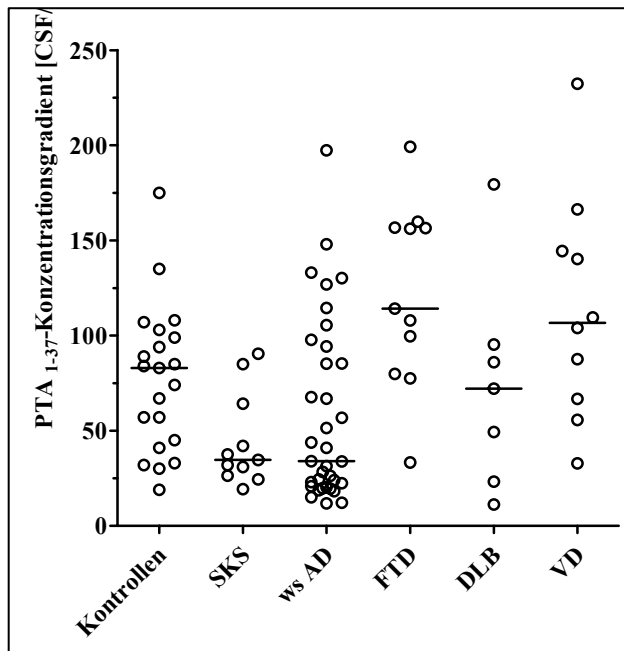


Abb. 47: Darstellung der PTA<sub>1-37</sub>-Konzentrationsgradienten zwischen parallel entnommenen CSF- und EDTA-Plasmaproben von Kontrollen und Patienten mit diversen primären Demenzerkrankungen (Kruskal-Wallis-Test  $P < 0,001$ ). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen und der Kontrollgruppe wurden mit dem Dunn's-Post Test ermittelt.

Die mittlere PCT-Konzentration lag im CSF der Kontrollen signifikant um das 2,3fache höher als in den parallel abgenommenen Serum- bzw. EDTA-Plasmaproben (Abb. 47 A; Wilcoxon signed rank Test  $P < 0,0001$ ).

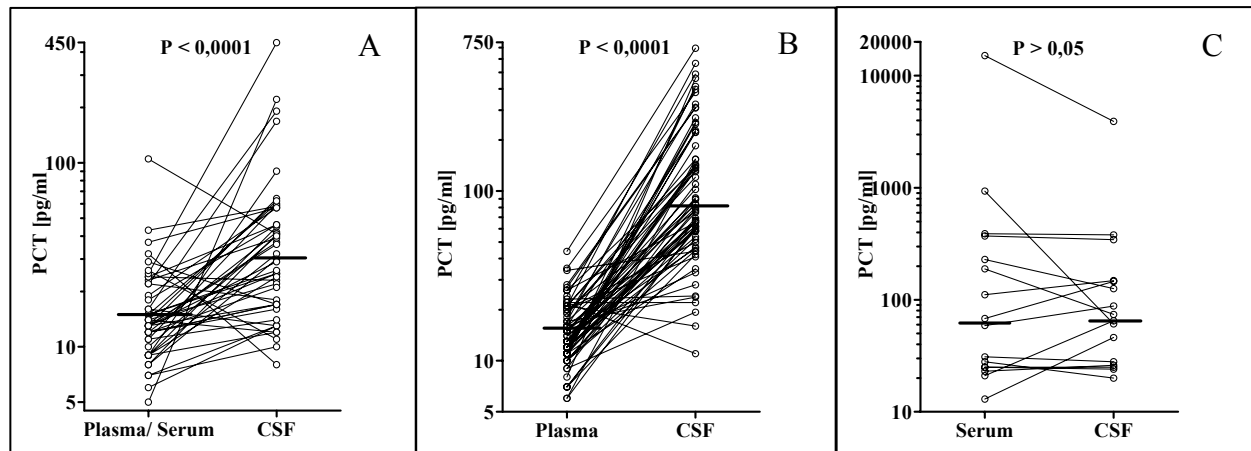


Abb. 48: Darstellung der PCT-Konzentrationsgradienten zwischen CSF- und Serum/ EDTA-Plasma-Paaren von Kontrollprobanden ohne kognitive Störungen ( $n = 47$ ) (A), Patienten mit primärem Demenzsyndrom ( $n = 70$ ) (B) und Patienten mit akuter Neuroinflammation ( $n = 16$ ) (C). Die Abweichungen sind für die Kontrollen und Demenzpatienten signifikant (Wilcoxon signed rank Test  $P < 0,0001$ ), nicht jedoch für die Patienten mit akuter Neuroinflammation (Wilcoxon signed rank Test  $P > 0,05$ ).

Dagegen lag der PCT-Gradient bei den Demenzpatienten im Mittel bei 6,0 (Abb. 47 B; Wilcoxon signed rank Test  $P < 0,0001$ ) und bei den Patienten mit akuter Neuroinflammation bei 1,1 (Abb. 48 C; Wilcoxon signed rank Test  $P > 0,05$ ). Die PCT-Konzentrationen im Serum/ Plasma und CSF korrelierten nicht signifikant miteinander ( $P > 0,05$ ).

Der PCT-Konzentrationsgradient unterschied sich signifikant zwischen den einzelnen Gruppen (siehe Abb. 49; Kruskal-Wallis-Test  $P < 0,0001$ ). Der folgende Dunn's-Post-Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten mit ws AD ( $P < 0,05$ ), FTD ( $P < 0,05$ ), DLB ( $P < 0,001$ ) und VD ( $P < 0,001$ ), wohingegen die Patienten mit SKS sowie einer akuten Neuroinflammation keine signifikante Abweichung des Konzentrationsgradienten in Bezug auf die Kontrollen aufwiesen ( $P > 0,05$ ). Des Weiteren war der PCT-Gradient der Patienten mit akuter Neuroinflammation im Vergleich zu den Patienten mit SKS ( $P < 0,01$ ), ws AD ( $P < 0,001$ ), FTD ( $P < 0,001$ ), DLB ( $P < 0,001$ ) sowie VD ( $P < 0,001$ ) signifikant niedriger.



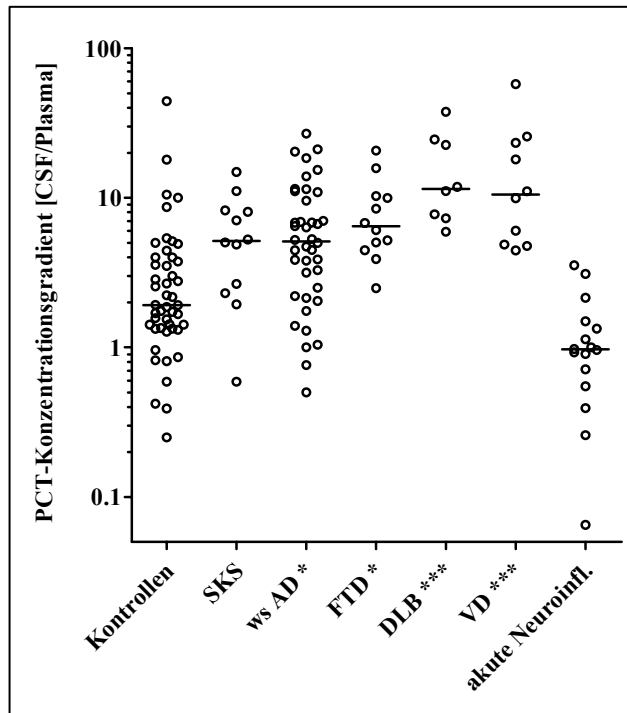


Abb. 49: Darstellung der PCT-Gradienten zwischen parallel entnommenen CSF- und Serum-/ EDTA-Plasmaproben von Kontrollen, Patienten mit diversen primären Demenzerkrankungen sowie akuter Neuroinflammation (Kruskal-Wallis-Test  $P < 0,001$ ). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen und der Kontrollgruppe wurden mit dem Dunn's-Post Test ermittelt (\*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ).