

1. Einleitung

Die Alzheimer-Demenz (AD) ist mit ca. 60 % die bei weitem häufigste demenzielle Erkrankung. Allein in Deutschland leiden derzeit mehr als 600.000 Menschen an dieser Krankheit, wobei die Zahl mit zunehmendem Alter stark ansteigt. Dies führt in den kommenden Jahren aufgrund der sich verändernden Altersstruktur, nicht nur in Deutschland, zu einem deutlichen Anstieg der Alzheimer-Fälle und damit unweigerlich zu einer drastischen Erhöhung der Gesundheits- und Pflegekosten. Die Diagnose „Alzheimer-Demenz“ kann mit 100 %iger Sicherheit erst post mortem durch eine histopathologische Untersuchung des Gehirns gestellt werden. Der behandelnde Arzt muss sich jedoch bei der diagnostischen Zuordnung auf Anamnese, klinische Symptome und zusätzliche Untersuchungen stützen, die sehr aufwändig und teuer sind. Eine richtige Diagnose wird nur in etwa 60 bis 65 % der Fälle von nicht-spezialisierten Medizinern richtig gestellt. Da sich die AD durch eine sehr lange präklinische Phase von 10 bis 40 Jahren ohne Symptomatik auszeichnet, können Patienten erst im diagnostisch gesicherten späten klinischen Stadium medikamentös behandelt werden. Dabei könnte gerade eine möglichst früh einsetzende Therapie von großem Vorteil in Hinblick auf den Krankheitsverlauf sein. Ein gegenwärtig intensiv erforschtes Feld ist die Suche nach spezifischen Biomarkersubstanzen im Blut oder der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF), die mit hinreichender Genauigkeit die Diagnose einer AD in einem möglichst frühen Krankheitsstadium ermöglichen. Derzeit steht ein solcher Biomarker jedoch nicht zur Verfügung. Die Anforderungen, die an einen idealen Biomarker zur Diagnose der AD gestellt werden, wurden 1998 vom „Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association“ und der „National Institute on Aging Working Group“ veröffentlicht (Consensus Report, 1998). Demnach sollte ein solcher Biomarker einen grundlegenden neuropathologischen Vorgang der Erkrankung detektieren, eine Sensitivität und Spezifität von mindestens 80 % aufweisen, einfach, anwenderfreundlich und kostengünstig sein.

Neuropeptide und Peptidhormone spielen im zentralen Nervensystem (ZNS) als Neurotransmitter und Neuromodulatoren eine wichtige signalgebende und regulatorische Rolle. Eine Vielzahl von Untersuchungen hat gezeigt, dass es zu Veränderungen der Neuropeptidkonzentrationen bei neurodegenerativen Prozessen im Gehirn kommen kann (Gottfries, 1995). Neuropeptide könnten somit als potenzielle Biomarker bei Demenzerkrankungen fungieren. Deshalb soll im Rahmen dieser Arbeit die Verwendbarkeit von Neuropeptiden bzw. deren Vorläufermolekülen für die (Früh-) Diagnostik der AD sowohl im Blut als auch in CSF untersucht werden. Dabei erfolgt eine Fokussierung auf die Peptide Enkephalin, Substanz P und Calcitonin.

1.1. Morbus Alzheimer

Alois Alzheimer, ein deutscher Psychiater, entdeckte Anfang des 20. Jahrhunderts in München die pathologischen Symptome einer senilen Demenz, die später seinen Namen tragen sollte. Doch diese Arbeit wurde wenig beachtet und geriet in Vergessenheit. Erst in den 1960er Jahren änderte sich die Situation, als Michael Kidd und Robert Terry die ultrastrukturellen Veränderungen im Gehirn von Demenzpatienten unter dem Elektronenmikroskop betrachteten und die bereits von A. Alzheimer beschriebenen senilen Plaques und Neurofibrillenbündel fanden (Kidd, 1963; Terry, 1963).

1.1.1. Epidemiologie

Die Demenz ist eine erworbene und meist fortschreitende Beeinträchtigung geistiger Fähigkeiten als Folge einer organischen Hirnerkrankung, die überwiegend im höheren Lebensalter auftritt. Die häufigste Demenzform ist die Alzheimer-Krankheit, die ca. 60 % aller Demenzen ausmacht. Differenzialdiagnostisch können die Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB, ca. 15 %), die vaskuläre Demenz (VD, ca. 15 %) sowie die frontotemporale Demenz (FTD, 10-15 %) unterschieden werden (siehe 1.1.5.). Die Prävalenz, d.h. die Anzahl der zu einem bestimmten Zeitpunkt an der AD leidenden Personen, sowie die Inzidenz, d.h. die Zahl der Neuerkrankungen innerhalb eines definierten Zeitraums, zeigen eine deutliche Altersabhängigkeit. Alzheimer ist die führende Ursache von Demenz und zeigt in verschiedenen Ländern Prävalenzraten, die mit dem Alter nahezu exponentiell zunehmen (Tabelle 1). Die Prävalenzraten in Australien und Spanien liegen etwas niedriger als die der angegebenen Vergleichsländer, wie die USA. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt.

Tabelle 1: Prävalenzraten der AD für einige Länder (Moise et al., 2004)

Land	Männer						Frauen					
	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90+	65-69	70-74	75-79	80-84	85-89	90+
Australien	0,8	2,0	3,2	5,8	16,4	-	0,3	1,3	3,1	7,4	23,9	-
Kanada	-	4,5	8,2	15,1	22,6	30,4	-	4,6	9,1	17,4	28,1	41,1
England & Wales	2,2	-	8,0	-	18,0	-	1,8	-	10,3	-	26,0	-
Frankreich	-	-	7,7	12,5	22,9	27,0	-	-	5,7	16,6	29,9	52,8
Spanien	1,0	1,2	2,0	4,3	9,3	15,4	0,4	2,9	2,4	8,9	14,8	28,1
Schweden	3,4	-	7,7	-	21,9	-	2,5	-	9,6	-	26,1	-
USA	1,6	2,9	7,2	15,5	23,5	29,9	1,3	3,6	7,7	15,1	28,4	42,2

In Deutschland steigt die AD-Prävalenzrate von 0,9 % in der Gruppe der 65- bis 75-Jährigen auf nahezu 30 % bei den über 85-Jährigen und die AD-Ersterkrankungsrate steigt von 0,1 % in der Gruppe der 65- bis 69-Jährigen auf 6,6 % unter den über 90-Jährigen, was einer derzeitigen AD-Patientenzahl von etwa 600.000 und mehr als 120.000 Neuerkrankungen pro Jahr entspricht (Bickel, 2000). Aufgrund der Altersstruktur und der höheren Lebenserwartung wird die Zahl der an AD erkrankten Menschen in den kommenden Jahren deutlich zunehmen. Es wird prognostiziert, dass im Jahr 2020 weltweit 42 Millionen Menschen und bis zum Jahr 2050 mehr als 81 Millionen Menschen von einer Demenz betroffen sein werden (Ferri et al., 2005) (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Weltweite Prognose der Demenz-Prävalenz (Ferri et al., 2005)

Region	Population (Mio), > 60 Jahre (2001)	Prävalenz (%), > 60 Jahre	Inzidenz pro 1000	Demenzfälle (Mio), > 60 Jahre			Anstieg (%) der Demenzfälle	
				2001	2020	2040	2001-2020	2001-2040
West-Europa	89,6	5,4	8,8	4,9	6,9	9,9	43	102
Ost-Europa	72	3,9	7,9	2,8	3,9	4,0	41	127
Nordamerika	53,1	6,4	10,5	3,4	5,1	9,2	49	172
Lateinamerika	40,1	4,6	9,2	1,8	4,1	9,1	120	393
Nord-Afrika & Mittlerer Osten	27,5	3,6	7,6	1,0	1,9	4,7	95	385
Entwickelter West-Pazifik	34,5	4,3	7,0	1,5	2,9	4,3	99	189
China & sich entwickelnder West-Pazifik	151,1	4,0	8,0	6,0	11,7	26,1	96	336
Indonesien, Thailand & Sri Lanka	23,7	2,7	5,9	0,6	1,3	2,7	100	325
Indien & Süd-Asien	93,1	1,9	4,3	1,8	3,6	7,5	98	314
Afrika	31,5	1,6	3,5	0,5	0,9	1,6	82	235
TOTAL	616,2	3,9	7,5	24,3	42,3	81,1	74	234

1.1.2. Genetische Prädispositionen

Bei über 90 % der Fälle tritt die AD sporadisch ohne familiäre Häufung auf. Für diese Form konnten genetische Veranlagungen beschrieben werden, die das Risiko an Alzheimer zu erkranken, erhöhen können. So finden sich hier z.B. Veränderungen im Apolipoprotein E (ApoE)-Gen (Corder et al., 1993), im α 1-Antichymotrypsin-Gen (Kamboh et al., 1995), in den mitochondrialen Cytochrom-C-Oxidase-Genen (Davis et al., 1997) und im Interleukin-6 (IL-6)-Gen (Papassotiropoulos et al., 1999).

Das am besten untersuchte Gen der sporadisch auftretenden AD ist das ApoE-Gen. ApoE ist Bestandteil verschiedener Lipoproteine und spielt eine zentrale Rolle im Lipid-Metabolismus (Mahley, 1988). Das aus 299 Aminosäuren bestehende Protein wird hauptsächlich in der Leber und im Gehirn synthetisiert (Boyles et al., 1985). Das ApoE-Gen weist einen Polymorphismus mit drei verschiedenen Allelen auf (ϵ 2, ϵ 3 und ϵ 4), die zu 6 verschiedenen Phänotypen (E2/2, E2/3, E2/4, E3/3, E3/4 und E4/4) führen. Das Vorhandensein des ApoE4-Allels wurde als Risikofaktor der sporadischen AD identifiziert (Corder et al., 1993). Heterozygote Allelträger der ApoE4-Variante weisen ein 3fach und homozygote sogar ein 15fach erhöhtes Risiko auf, an Alzheimer zu erkranken (Farrer et al., 1997), wobei das Erkrankungsalter im Vergleich zu ApoE4-negativen Personen deutlich niedriger liegt (Meyer et al., 1998). Der molekulare Mechanismus des ApoE4, der zu einem erhöhten AD-Erkrankungsrisiko führt, ist nicht genau bekannt. Es wird u.a. diskutiert, dass es durch Interaktionen des ApoE4 mit dem Amyloid β (A β)-Protein zu einer gesteigerten A β -Ablagerung in Form von Plaques kommt (Holtzman et al., 2000).

Bei nur 5-10 % der Alzheimerpatienten liegt ein genetischer Defekt vor. Diese auch als familiäre AD bezeichnete Form ist durch einen frühen Krankheitsbeginn (vor dem 60. Lebensjahr) und einen sehr progressiven Krankheitsverlauf gekennzeichnet. In den letzten Jahren wurden drei verschiedene autosomal dominant vererbte Genveränderungen bei familiären AD-Patienten identifiziert, zu denen Mutationen im Amyloid-Precursor-Protein (APP)-Gen auf Chromosom 21 (Schellenberg et al., 1993), im Präsenilin-1-Gen auf Chromosom 14 (Sherrington et al., 1995) und im Präsenilin-2-Gen auf Chromosom 1 (Levy-Lahad et al., 1995) gehören.

1.1.3. Histopathologische Veränderungen

Es gibt drei pathologische Hauptmerkmale, die bei der Autopsie von Alzheimerkranken zur gesicherten Diagnose führen: 1) senile Plaques, 2) Neurofibrillen und 3) Neurodegeneration.

Die Hauptprotein­komponente der extrazellulären senilen Plaques sind fibrilläre Ablagerungen des A β -Proteins (Drouet et al., 2000). A β wird aus dem Vorläufermolekül APP durch die proteolytische Spaltung der Enzyme β - und γ -Sekretase freigesetzt. Dabei entstehen überwiegend das lösliche A β_{1-40} und zu einem geringeren Teil das weniger lösliche A β_{1-42} (siehe Abb. 1). A β_{1-42} hat im Gegensatz zum A β_{1-40} eine höhere Tendenz zur Aggregation und Plaquebildung (Miller et al., 1993).

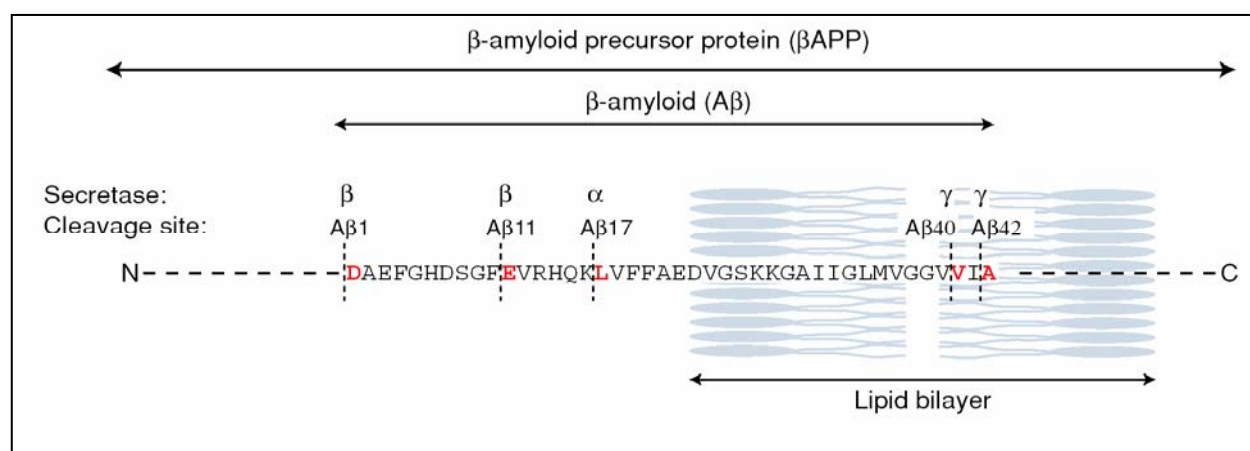


Abb. 1: Schematische Darstellung des Amyloidprecursorproteins und der potenziellen Spaltstellen der Sekretasen (aus Gouras, 2001).

Das zweite Merkmal der Alzheimer-Pathologie sind die Neurofibrillenbündel. Diese setzen sich hauptsächlich aus sogenannten „Paired Helical Filaments“ (PHF's) zusammen, die wiederum aus hyperphosphorylierten und ubiquitinierten Formen des Tau-Proteins, einem mikrotubuli-assoziierten Phosphoprotein, bestehen (Billingsley and Kincaid, 1997). Alternatives Spleißen der Tau-mRNA resultiert in 6 Tau-Isoformen mit einer molekularen Masse von 50 bis 65 kDa (Goedert et al., 1989). Physiologisch spielt das Tau-Protein eine wichtige Rolle bei der Bindung und Stabilisierung des intrazellulären Mikrotubulsystems (Buee et al., 2000). Tau ist ein Phosphoprotein mit mehr als 30 potenziellen Phosphorylierungsstellen (Buee et al., 2000). In den Neurofibrillen liegt das Tau-Protein in hyperphosphorylierter Form vor, wodurch es die Fähigkeit der Mikrotubulibindung und somit seine stabilisierenden Eigenschaften verliert. Dies führt schließlich zu einer nicht-reversiblen neuronalen Degeneration, dem dritten wesentlichen Merkmal der Alzheimer-Pathologie (Trojanowski et al., 1995).

1.1.4. Klinische Diagnose der Alzheimer-Demenz

Das „National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke“ (NINCDS) und die „Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association“ (ARDA) bildeten Anfang der 1980er Jahre eine Arbeitsgruppe, die detaillierte klinische Kriterien für die Diagnosestellung der AD erarbeitete (McKhann et al., 1984). Diese Kriterien unterscheiden zwischen einer „möglichen“, einer „wahrscheinlichen“ und einer neuropathologisch „gesicherten“ AD. Eine gesicherte Diagnose kann erst nach dem Ableben des Patienten durch die Untersuchung histopathologischer Veränderungen im Gehirn gestellt werden. Die klinische Diagnose einer „wahrscheinlichen“ AD (ws AD) wird gestellt, wenn das typische klinische Bild mit einem schleichenden Krankheitsbeginn und einem langsamen Fortschreiten der Symptome vorliegt und andere Ursachen der Demenz ausgeschlossen wurden. Eine „mögliche“ AD wird diagnostiziert, wenn andere demenzverursachende Erkrankungen vorliegen, aber dennoch die AD nach klinischer Einschätzung als wahrscheinlichere Ursache der Demenz angenommen werden kann oder wenn das klinische Bild und der Verlauf für eine AD atypisch sind. Neuropathologische Studien zeigten eine Spezifität (richtig negativ) von 65-79 % und eine Sensitivität (richtig positiv) von 92-95 % der NINCDS/ ADRA-Kriterien (Lopez et al., 1999).

Patienten die kognitive Störungen aufweisen, die über die physiologische Leistungsabnahme der jeweiligen Altersstufe hinaus gehen, aber nicht die Kriterien einer Demenz erfüllen, bezeichnet man als Patienten mit leichten kognitiven Beeinträchtigungen (LKB). LKB ist kein stabiler Zustand. Abhängig von der Ursache entwickeln diese Patienten im weiteren Verlauf eine Demenz, verbleiben im Stadium einer LKB oder es kommt zu einer Verbesserung des Zustands. Etwa 10 % der Patienten mit LKB entwickeln innerhalb eines Jahres eine Demenz (Bruscoli and Lovestone, 2004), von denen ca. 90 % eine AD aufweisen (Visser et al., 2006).

Die Diagnose einer AD ist prinzipiell eine Ausschlussdiagnose. Die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 2005) sehen ein zweistufiges Verfahren in der Demenzdiagnostik vor (siehe Abb. 2): Zunächst wird durch Anamnese, psychopathologischen Befund und neuropsychologische Screeningverfahren (z.B. Mini-Mental-State-Test) der Demenzbefund gesichert. Der Mini-Mental-State-Test (MMS-Test) ist ein Screeningverfahren zur Beurteilung des Demenzschweregrades (Folstein et al., 1975). Er liefert einen Wert zwischen 0 und 30 Punkten, wobei 0-11 einer schweren Demenz, 12-18 einer mittelschweren Demenz, 19-23 einer leichten Demenz, 24-26 einer kognitiven Beeinträchtigung und 27-30 einer unbeeinträchtigten Leistungsfähigkeit entsprechen. In einem zweiten Schritt wird nach der Ursache des Demenzsyndroms gesucht. Dies beinhaltet eine kör-

perliche Untersuchung mit Elektrokardiogramm (EKG), den Einsatz eines bildgebenden Verfahrens, wie der Computertomographie (CT) oder der Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) sowie basaler laborchemischer Blutuntersuchungen. Die Erstellung eines Elektroenzephalogramms (EEG), die Durchführung der bildgebenden Verfahren Positronen-Emissions- und Single-Photon-Emissions-Tomographie sowie Untersuchungen des CSF können ebenfalls hilfreich sein. Die Untersuchung des CSF dient zum Ausschluss entzündlicher Erkrankungen des zentralen Nervensystems als Demenzursache. Die Bestimmung der Parameter A β und Tau aus dem CSF können die Diagnose der AD unterstützen (siehe Abschnitt 1.1.5.). Letztere gehören heute jedoch noch nicht zur Routinediagnostik.

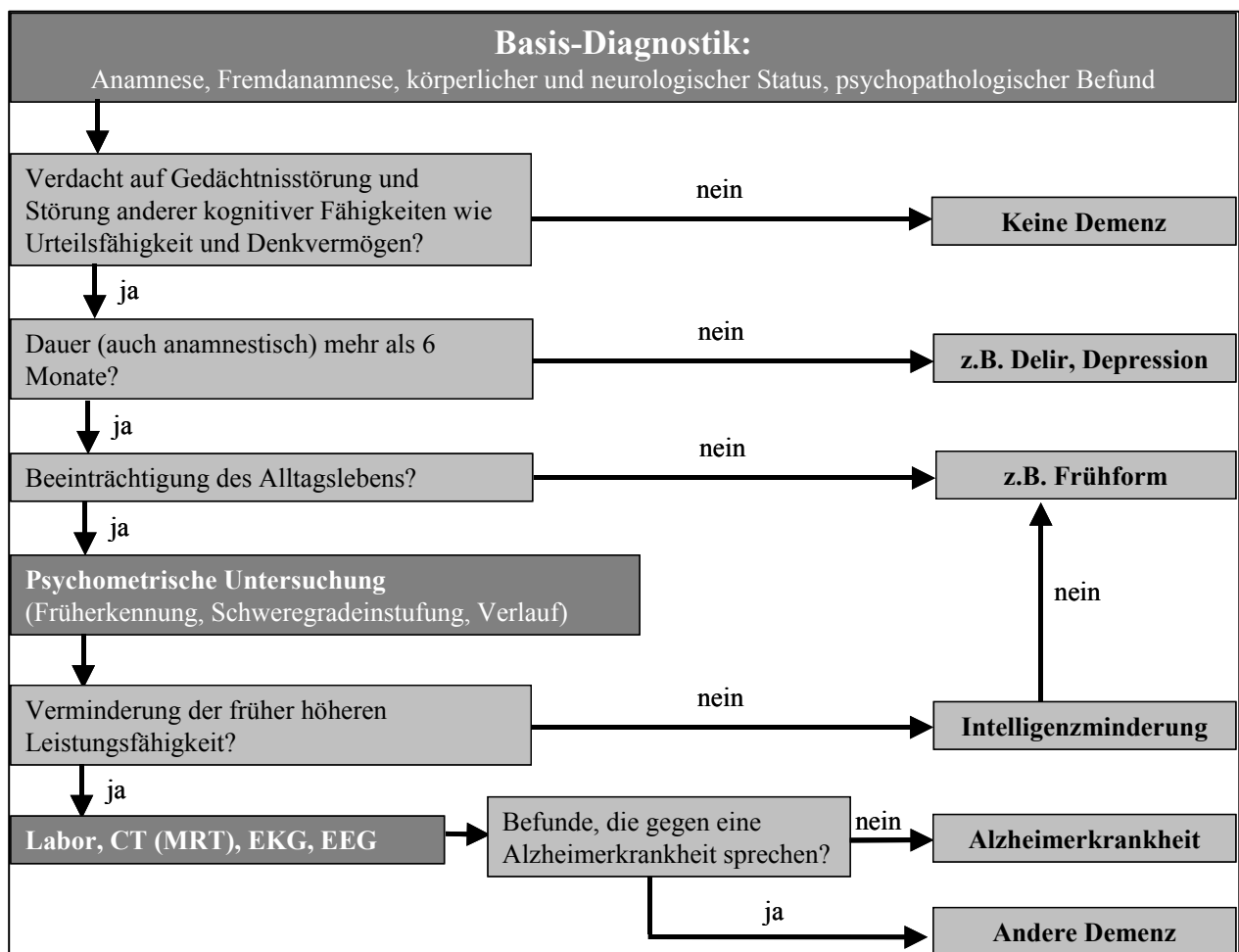


Abb. 2: Schematische Darstellung der Demenzdiagnostik, modifiziert nach (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 2005)

In Frühstadien der AD ist eine Diagnose sehr viel schwieriger. Therapieansätze sind aber gerade in diesem Stadium wahrscheinlich um ein Vielfaches effektiver als bei einer bereits bestehenden schweren Neurodegeneration.

1.1.5. Potenzielle Alzheimer-Biomarker

CSF steht in direktem Kontakt mit dem extrazellulären Raum des Gehirns und des Rückenmarks. Seine Bestandteile reflektieren biochemische Veränderungen, die während eines Krankheitsverlaufes auftreten können. Zwei CSF-Biomarker, das Tau-Protein und das $A\beta_{1-42}$ -Protein, wurden bereits vielfach in Hinblick auf ihre Diagnosetauglichkeit der AD untersucht.

Die Konzentration von Total-Tau-Protein (t-Tau), unabhängig von einer Phosphorylierung des Proteins, ist im CSF von AD-Patienten um bis zu 300 % im Vergleich zu Kontrollen erhöht (Blennow et al., 2001). Diese Erhöhung ist jedoch nicht AD-spezifisch, da sie auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. der Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD) (Kapaki et al., 2001) eine Rolle spielt. Auch das Alter des Patienten scheint einen Einfluss auf die t-Tau-Konzentration im CSF zu haben (Sjogren et al., 2001). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass t-Tau einen nicht-AD-spezifischen Neurodegenerationsmarker darstellt. Wie bereits erwähnt, weist das Tau-Protein mehr als 30 potenzielle Phosphorylierungsstellen auf (Buee et al., 2000). Die Bedeutung von phosphoryliertem Tau-Protein (p-Tau) im CSF wird zurzeit intensiv erforscht. Dabei konnte ein signifikanter Anstieg von Tau phosphoryliert am Threonin 181 (p-Tau₁₈₁) (Hampel et al., 2004; Vanmechelen et al., 2000), am Serin 199 (p-Tau₁₉₉) (Hampel et al., 2004; Itoh et al., 2001) und am Threonin 231 (p-Tau₂₃₁) (Hampel et al., 2004; Kohnken et al., 2000) im CSF von AD-Patienten nachgewiesen werden. Erhöhte p-Tau-Werte konnten auch bei Patienten mit anderen Demenzen, wie der DLB oder der FTD gemessen werden (Hampel et al., 2004), weshalb auch dieser Markerkandidat für eine Differenzialdiagnose ungeeignet scheint.

Das $A\beta_{1-42}$, die am häufigsten in den senilen Plaques vorkommende $A\beta$ -Form, ist im CSF bei AD-Patienten um ca. 50 % erniedrigt (Blennow, 2004). Es wurde vermutet, dass es durch den Verbrauch von $A\beta_{1-42}$ bei der Ablagerung im Gehirn zu einer erniedrigten Konzentration im CSF kommt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass $A\beta_{1-42}$ auch bei anderen Erkrankungen ohne Amyloid-Plaques, wie CJD (Otto et al., 2000) und der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) (Sjogren et al., 2002) reduziert ist, was eine direkte Korrelation zwischen niedrigen $A\beta_{1-42}$ -Konzentrationen und den $A\beta$ -Plaquelagerungen fraglich erscheinen lässt. Im Gegensatz zum $A\beta_{1-42}$ konnte für das $A\beta_{1-40}$ kein signifikanter Unterschied im CSF von AD-Patienten gefunden werden (Blennow, 2004). Weil sowohl Tau als auch $A\beta$ nicht spezifisch für AD sind, genügen sie nicht den Anforderungen, die an einen AD-Biomarker gestellt werden (Wiltfang et al., 2005).

Es werden weitere potenzielle Marker im Blut bzw. CSF, wie Isoprostan, Homocystein, Glutaminsynthetase oder „neuronal thread protein“, für die Diagnose der AD diskutiert (Frank et al., 2003). Diese werden hier jedoch nicht näher betrachtet.

1.1.6. Pharmakotherapie der Alzheimer-Demenz

Für die Behandlung einer leichten bis mittelgradigen AD stehen derzeit verschiedene Therapeutika zur Verfügung, deren Wirksamkeit in klinischen Studien gezeigt wurde. Hierzu gehören die Cholinesterase (ChE)-Hemmer, der Glutamatmodulator Memantine sowie die so genannten Nootropika, die zusammen als „Antidementiva“ bezeichnet werden.

Die Wirksamkeit von ChE-Hemmern, wie Donezepil und Rivastigmin, beruht auf der „Acetylcholinmangel-Hypothese“. Acetylcholin (ACh) ist maßgeblich für kognitive Funktionen, insbesondere für Lern- und Gedächtnisfunktionen sowie das räumliche Orientieren, verantwortlich und wird durch die Cholin-Acetyltransferase (CAT) synthetisiert. In verschiedenen Hirnregionen von AD-Patienten findet sich eine reduzierte CAT-Aktivität (Hansen et al., 1988) sowie ein regionenspezifischer Verlust cholinerg Axone (Geula and Mesulam, 1996). Die Ursache für die besondere Empfindlichkeit dieser Hirnregionen in der Alzheimer-Pathologie ist unbekannt. Neben dem cholinergen System sind bei der AD auch andere Neurotransmittersysteme, wie das glutamaterge System, betroffen (Cummings et al., 1998). Deshalb stellt die Modulation der Glutamat-Neurotransmission einen weiteren therapeutischen Ansatz in der AD-Behandlung dar. Glutamat ist im Gehirn an Funktionen wie Gedächtnis, Lernen, Wahrnehmung und Motorik beteiligt, besitzt jedoch auch neurotoxische Wirkungen (Muller et al., 1995). Der Glutamatmodulator Memantine wirkt am NMDA-Rezeptor als nicht-kompetitiver Antagonist, macht den NMDA-Kanal für Glutamat-vermittelte Lern- und Gedächtnisvorgänge voll verfügbar und weist gleichzeitig eine neuroprotektive Wirkung auf (Molinuevo et al., 2005). Nootropika sind Medikamente, die den Zellmetabolismus verbessern und eine Zellschädigung durch endo- und exogene Noxen verhindern können (Giurgea, 1973). Hierzu zählt z.B. Gingko biloba-Extrakt.

Eine entscheidende Voraussetzung für eine wirkungsvolle AD-Therapie ist die Früherkennung der Krankheit. Häufig wird jedoch mit einer antidementiven Therapie erst im Stadium einer mittelgradigen Demenz begonnen. Es wäre jedoch von Vorteil bereits Patienten mit einer leichtgradigen Demenz oder besser im wahrscheinlichen Vorstadium der AD, d.h. bei leichten kognitiven Beeinträchtigungen zu behandeln (Fuchsberger et al., 2002). Eine eindeutige Diagnose in diesem präklinischen Stadium ist zurzeit jedoch nicht möglich.

1.1.7. Pathologie weiterer differenzialdiagnostisch bedeutsamer Demenzen

Es werden primäre und sekundäre Formen der Demenz unterschieden. Dabei machen die primären Demenzformen, zu denen die AD, vaskuläre Demenzformen, die DLB sowie die FTD zählen, mit 80 bis 90 % den größten Teil aus.

Unter dem Begriff „vaskuläre Demenz“ werden Erkrankungen zusammengefasst, bei denen eine Demenz aufgrund von Durchblutungsstörungen des Gehirns auftritt. Die beiden häufigsten Formen sind die Multi-Infarkt-Demenz und die subkortikale VD (Kischka and Ettl, 2005). Entsprechend der Lokalisation des vaskulären Ereignisses können die Symptome sehr variabel sein. Mischformen von VD und AD sind häufig. Die DLB wurde 1984 zum ersten Mal beschrieben (Kosaka et al., 1984). Diese Erkrankung zeichnet sich sowohl durch das Auftreten von Lewy-Körperchen, die zum großen Teil aus Aggregaten des präsynaptischen Proteins α -Synuclein bestehen, als auch durch Amyloid-Plaques aus (McKeith et al., 2004). Diese Strukturen und viele der auftretenden Symptome der DLB sind sowohl mit der Parkinson'schen Krankheit als auch mit der AD assoziiert. Die klinischen Kriterien der DLB wurden 1996 in einer Konsensus-Konferenz festgelegt (McKeith et al., 1996). Hierzu zählen periodisch visuelle Halluzinationen, eine veränderte Wahrnehmung und spontane motorische Eigenschaften des Morbus Parkinson. Die FTD ist durch eine Atrophy des Frontal- und/ oder Temporallappens und eine Degeneration des Striatums gekennzeichnet. Klinische Merkmale sind Veränderungen der Persönlichkeit und Sprache sowie Antriebsverlust. Das Gedächtnis und die Orientierungsfähigkeit bleiben jedoch weitgehend erhalten (McKhann et al., 2001). Neuropathologisch ist die FTD durch das Auftreten von intrazellulären tau- und ubiquitinhaltigen Einschlüssen, sogenannten Pick-Körpern, gekennzeichnet, weshalb diese Erkrankung zu den sogenannten „Tauopathien“ gehört (Munoz et al., 2003). Etwa 20 % der FTD-Fälle sind familiär bedingt und weisen eine auf dem Chromosom 17 liegende Mutation des Tau-Gens auf (Spillantini and Goedert, 2000).

Sekundäre Demenzen, die 10 bis 20 % der Demenzerkrankungen ausmachen, können durch infektiöse Erkrankungen (z.B. HIV, CJD), Hydrozephalus sowie durch metabolische und toxische Ursachen (z.B. Alkoholdemenz) hervorgerufen werden, auf die in dieser Arbeit jedoch nicht näher eingegangen wird.

Auf die Patientengruppe mit subjektiv empfundenen kognitiven Störungen (SKS) soll in diesem Zusammenhang ebenfalls hingewiesen werden, wenngleich es sich hierbei nicht um eine Form der Demenz handelt. Diese Patienten, zu denen die Mehrzahl der älteren Personen gehört, klagen über ein allgemeines Versagen des Gedächtnisses, wobei objektiv keine kognitiven Defizite festgestellt werden können (Crook et al., 1987).

1.1.8. Demenz und Inflammation

Inflammatorische Prozesse spielen eine wichtige Rolle nicht nur in der Alzheimer-Pathologie (Akiyama et al., 2000), sondern auch bei anderen demenziellen Erkrankungen wie der FTD (Rentzos et al., 2006; Sjogren et al., 2004), der VD (Jia et al., 2005; Wada-Isoe et al., 2004) und der DLB (Katsuse et al., 2003; Mackenzie, 2000). Ob die inflammatorischen Prozesse eine Ursache der Demenz darstellen oder es sich um eine Reaktion auf die pathologischen Veränderungen handelt, ist unklar.

Inflammatorische Ereignisse im Gehirn von AD-Patienten können durch geschädigte Neuronen, A β -Plaques und Neurofibrillenbündel stimuliert werden. Neben dem Komplementsystem sind Zytokine, Chemokine und Akutphaseproteine an diesen Entzündungsreaktionen beteiligt. Fast alle bisher untersuchten Zyto- und Chemokine, die in Zusammenhang mit AD untersucht wurden, sind im Vergleich zu nicht-dementen Probanden erhöht. Hierzu zählen IL-6, Tumornekrosefaktor α (TNF α), Macrophageninflammationsprotein 1 α (MIP-1 α) oder IL-8 (Akiyama et al., 2000). Erhöhte Konzentrationen von IL-6 im CSF von Patienten mit einer VD deuten darauf hin, dass auch hier inflammatorische Mechanismen eine Rolle spielen (Jia et al., 2005; Wada-Isoe et al., 2004). Auch bei der DLB konnte eine Überexpression von IL-1 α und TNF α sowie der induzierbaren NO-Synthase nachgewiesen werden (Katsuse et al., 2003). Sjogren und Kollegen zeigten kürzlich, dass bei der FTD im Vergleich zu Kontrollen die Konzentrationen der Zytokine TNF α sowie des Transforming Growth Factors β (TGF β) im CSF signifikant erhöht sind (Sjogren et al., 2004), was auf eine verstärkte Immunaktivität hindeutet.

Auch zelluläre Mediatoren von Inflammationsprozessen, wie aktivierte Microglia, konnten im Gehirn von Patienten mit Morbus Alzheimer (Akiyama et al., 2000) sowie DLB (Mackenzie, 2000) nachgewiesen werden.

1.2. Neuropeptide und Peptidhormone

Neuropeptide und Peptidhormone sind Peptide, die sowohl im zentralen Nervensystem als auch in der Peripherie vorkommen und modulatorisch-regulatorische Eigenschaften besitzen. Zu diesen Substanzen zählen z.B. Neurotensin, Enkephalin, Substanz P, Somatostatin und Vasopressin. Es gibt eine Vielzahl von Hinweisen, dass es bei neurodegenerativen Erkrankungen im Gehirn zu Veränderungen bestimmter Peptidkonzentrationen kommt (Gottfries et al., 1995). Somit stellen Neuropeptide und Peptidhormone potenzielle Biomarker bei Demenzerkrankungen dar.

Viele Neuropeptide und Peptidhormone wirken lediglich lokal, entweder auf die peptidproduzierende Zelle selbst (autokrine Wirkung) oder auf unmittelbar benachbarte Zellen (parakrine Wirkung), werden durch Rezeptoren auf der Zelloberfläche gebunden und z.T. internalisiert und gelangen häufig nicht in die Zirkulation oder die cerebrospinale Flüssigkeit. Werden die Peptide in die Blutbahn abgegeben, so dass sie an Rezeptoren an weiter entfernt liegenden Zellen andocken können, so spricht man von einer endokrinen Wirkungsweise. Die Peptide werden jedoch sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* innerhalb weniger Minuten durch eine Vielzahl von Enzymen inaktiviert. Die Freisetzung von reifen, biologisch aktiven Neuropeptiden und Peptidhormonen ist daher nicht zuverlässig bestimmbar.

Die Produktion von Neuropeptiden und Peptidhormonen in neuronalen und endokrinen Geweben verläuft zumeist über den regulatorischen Sekretionsweg und beginnt mit der Synthese größerer Vorläuferproteine (Perone and Castro, 1997). Nach Abspaltung der hydrophoben N-terminalen Signalsequenz durch Signalpeptidasen und Faltung der Proteine im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) werden die Propeptide im Golgi-Apparat in Vesikel verpackt und zur Zellmembran transportiert (Stroud and Walter, 1999). Während des Transportes erfolgt die Prozessierung der Propeptide zu reifen Hormonen bzw. Neuropeptiden durch sogenannte Prohormon-Convertasen an zumeist dibasischen Aminosäuresequenzen (Beinfeld, 1998). Über verschiedene Stimuli werden die Peptide in den extrazellulären Raum bzw. ins Plasma freigesetzt. Der Ablauf der Neuropeptid- bzw. Peptidhormonsynthese ist in Abb. 3 schematisch dargestellt.

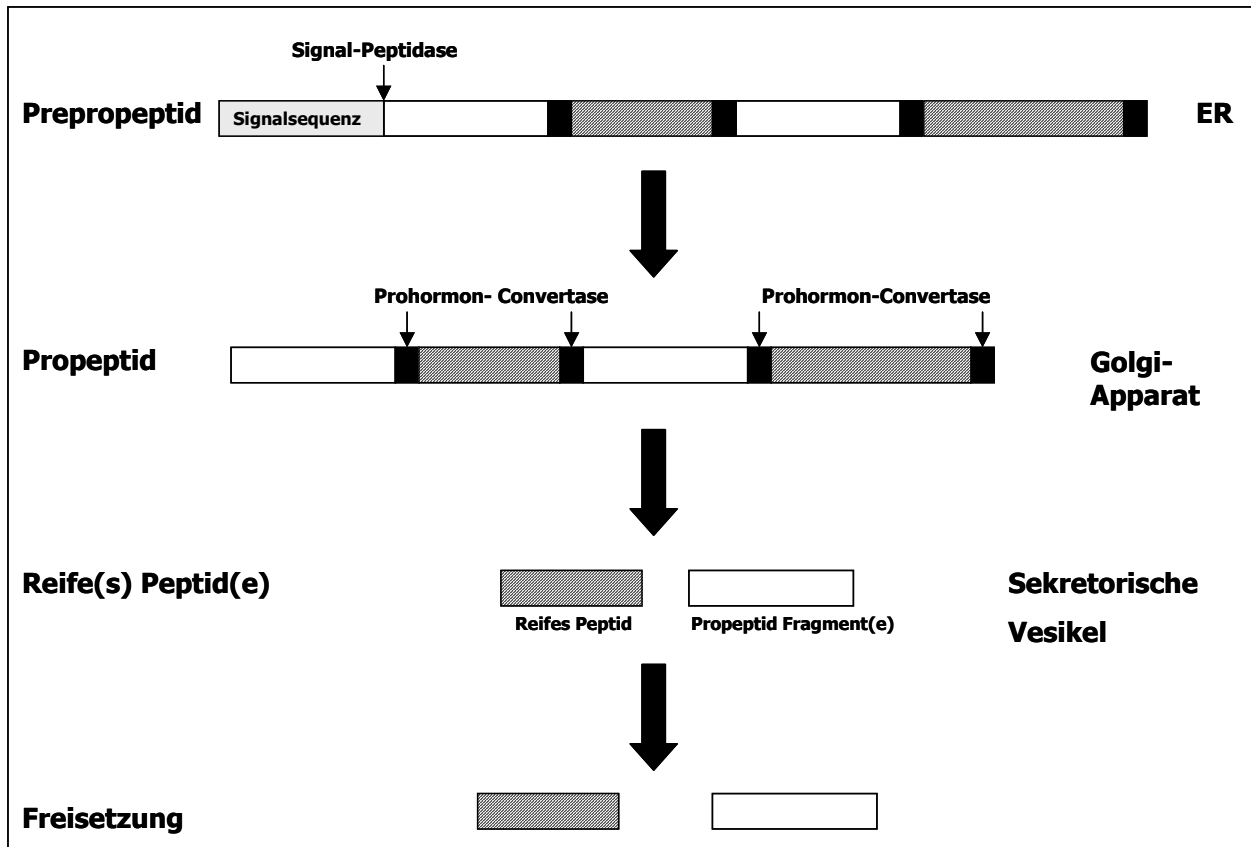


Abb. 3: Schematische Darstellung der Neuropeptid- und Peptidhormonsynthese. Enzymatische Spaltstellen der Prohormon-Convertasen sind durch schwarze Kästchen gekennzeichnet.

Für eine Vielzahl von Peptidhormonen und Neuropeptiden konnte jedoch gezeigt werden, dass diese über ihre sehr viel stabileren Vorstufenmoleküle bzw. Vorstufenfragmente quantifizierbar sind (Tabelle 3). So stellt z.B. das Proneurotensin/ neuromedin N₁₋₁₁₇-Molekül (proNT/ NMN₁₋₁₁₇) einen stabilen Surrogatmarker für das hauptsächlich in den N-Zellen des Darmes synthetisierte Neurotensin dar (Christ-Crain et al., 2006; Ernst et al., 2006). Neurotensin weist eine Halbwertszeit von nur 2 Minuten im Blut auf (Barelli et al., 1994), wohingegen das proNT/ NMN₁₋₁₁₇ für mehrere Tage bei Raumtemperatur sowohl im Serum als auch im Plasma stabil ist (Ernst et al., 2006).

Tabelle 3: Beispiele für Peptidhormone bzw. Neuropeptide, die über stabile Vorstufenfragmente quantifiziert werden können.

Vorstufenmolekül	reife Peptide	stabiles Vorstufen-fragment	Referenz
Pro-atriales natriuretisches Peptid (proANP)	ANP	proANP ₅₃₋₉₀	(Morgenthaler et al., 2004)
Pro-Arg-Vasopressin (proAVP)	AVP	Copeptin ₁₀₇₋₁₄₅	(Morgenthaler et al., 2006; Struck et al., 2005a)
Proendothelin-1 (proET-1)	ET-1	proET-1 ₁₅₁₋₁₉₅	(Papassotiriou et al., 2006; Struck et al., 2005b)
Proadrenomedullin (proADM)	ADM	proADM ₂₄₋₇₁	(Morgenthaler et al., 2005; Struck et al., 2004)
Procalcitonin (PCT)	Calcitonin	PCT ₃₋₁₁₆	(Weglohner et al., 2001)
Proneurotensin/ neuromedin N (proNT/ NMN)	NT, NMN	proNT/ NMN ₁₋₁₁₇	(Ernst et al., 2006)
Proinsulin	Insulin	C-Peptid ₃₃₋₆₃	(Melani et al., 1970)
Pro-brain natriuretisches Peptid (proBNP)	BNP	proBNP ₁₋₇₆	(Hunt et al., 1995)

1.2.1. Proenkephalin A

Enkephaline, die zur Gruppe der endogenen Opioide gehören, haben viele Funktionen: sie spielen eine Rolle bei der Stressantwort (Drolet et al., 2001), bei der Schmerzinhibition (Przewlocki and Przewlocka, 2001) sowie bei der Stimulation des Immunsystems (Plotnikoff et al., 1997; Salzet and Tasiemski, 2001) und können antibakteriell gegen bestimmte Bakterien wie z.B. *Staphylococcus aureus* wirken (Goumon et al., 1996).

Das humane Enkephalin-Vorläuferpeptid (Preproenkephalin A) besteht aus 267 Aminosäuren (AS) (Noda et al., 1982) und wird sowohl im Nervensystem (Pittius et al., 1983; Spruce et al., 1990) als auch im Nebennierenmark (Stern et al., 1981), in Knochenzellen (Rosen et al., 1991) und in verschiedenen Zellen des Immunsystems (Kamphuis et al., 1998; Plotnikoff et al., 1997) exprimiert. Durch eine spezifische Signalpeptidase wird das N-terminale Signalpeptid abgespalten und das aus 243 Aminosäuren bestehende Proenkephalin A (PENK A) freigesetzt (siehe Abb. 4). Die aktiven Peptide, 4 Kopien von Methionin-Enkephalin (Met-Enk) sowie je eine Kopie von Leucin-Enkephalin (Leu-Enk), Methionin-Enkephalin-Arginin-Glycin-Leucin

(Met-Enk-RGL), Methionin-Enkephalin-Arginin-Phenylalanin (Met-Enk-RF) und Enkelytin, werden durch enzymatische Spaltung an basischen Aminosäurepaaren freigesetzt (Goumon et al., 1996; Kojima et al., 1982). Das Proenkephalin A weist im Unterschied zum Protachykinin A (siehe Abschnitt 1.2.2.) keine Spleißvarianten auf. Die *ex vivo*-Halbwertszeit im Plasma liegt bei Met-Enk bei 13 bis 15 min (Mosnaim et al., 2003) und bei Leu-Enk bei 12 bis 13 min (Mosnaim et al., 1988).

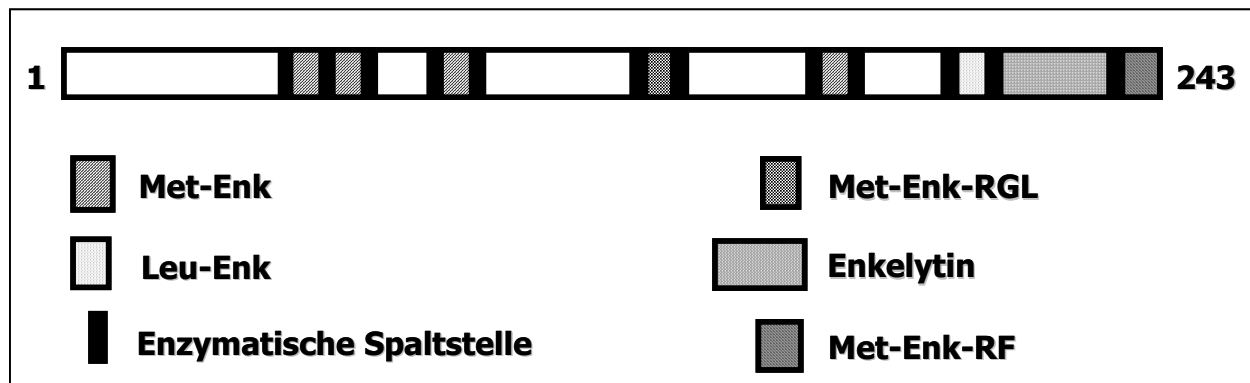


Abb. 4: Schematische Darstellung der PENK A-Sequenz (ohne Signalpeptid, AS 1 bis 243)

Die Rolle von Enkephalinen bei der AD wurde von Muhlbauer und Kollegen untersucht. Sie konnten zeigen, dass die Met-Enk-Rezeptoraktivität im CSF von Patienten mit AD signifikant höher ist als im CSF von Kontrollpersonen ohne bekannte neurologische Veränderungen (Muhlbauer et al., 1986). Des Weiteren war die Met-Enk-Konzentration im CSF von Patienten mit seniler Demenz im Vergleich zu Kontrollen deutlich erniedrigt (Korshunova et al., 1984). Zu Veränderungen des Enkephalingehalts im Blut von AD-Patienten sind in der Literatur keine Hinweise zu finden.

1.2.2. Protachykinin A

Tachykinin A-Peptide, zu denen Substanz P (SP), Neurokinin A (NKA), Neuropeptid K (NPK) und Neuropeptid γ (NP γ) gehören, besitzen vasodilatorische, d.h. gefäßerweiternde Eigenschaften (Maggi, 1995) und führen zur Kontraktion bzw. Relaxation der glatten Muskulatur im Gastrointestinal- (Bartho et al., 1994) und Urogenitaltrakt (Maggi, 1995) sowie der Bronchien (Figini et al., 1996). SP hat einen Einfluss auf verschiedene inflammatorische Zellen (Harrison and Geppetti, 2001), dient als Neurotransmitter für die Weiterleitung von Schmerz (Zubrzycka and Janecka, 2000) und hat eine regulatorische Funktion bei der Blutbildung (Rameshwar et al.,

1993). Die Tachykinine NKA, $NP\gamma$ sowie NPK spielen eine Rolle als Regulatoren reproduktiver Funktionen. Sie haben einen Einfluss auf die Sekretion von Gonadotropin und Prolactin auf der Ebene der Hypothalamus-Hypophysen-Achse sowie auf die Steroidsekretion der Hoden und Eierstöcke (Debeljuk and Lasaga, 1999). Wie andere aktive Peptide sind auch die Tachykinin A-Peptide sehr instabil. So weist SP eine *in vivo*-Halbwertszeit von weniger als 2 Minuten (Cailes et al., 1998) und eine *in vitro*-Halbwertszeit von etwa 12 Minuten (Berger et al., 1979; Conlon and Sheehan, 1983) im Blut auf.

Das humane Preprotachykinin A (PPT-A) wird in primären afferenten Nerven, die primäre (Rückenmark und Thymus) sowie sekundäre (Milz, Mandeln) lymphoide Organe innervieren, exprimiert (Maggi, 1997). Auch nicht-neuronale Zellen wie z.B. Endothelzellen (Linnik and Moskowitz, 1989) und Zellen des Immunsystems, wie Eosinophile (Aliakbari et al., 1987) und Makrophagen (Pascual and Bost, 1990), synthetisieren Protachykinin A (PTA). Alternatives Spleißen des primären PPT-A-Transkripts resultiert in vier verschiedenen mRNA-Isoformen (α PPT-A, β PPT-A, γ PPT-A und δ PPT-A) die sich in ihrer Exonkombination unterscheiden (Carter and Krause, 1990; Lai et al., 1998). Die am häufigsten vorkommenden Spleißvarianten sind γ PPT-A (80-90 %) und β PPT-A (10-20 %) (Debeljuk and Lasaga, 1999). Die Spleißvariante β PPT-A enthält alle 7 Exons, wohingegen bei α PPT-A das Exon 6, bei γ PPT-A das Exon 4 und bei δ PPT-A die Exons 4 und 6 fehlen. Das PPT-A-Gen kodiert für die Peptidsequenzen SP, NKA, NPK und $NP\gamma$. Substanz P, dessen Sequenz in Exon 3 kodiert ist, kann durch Translation aller vier mRNA-Moleküle synthetisiert werden. Exon 6 kodiert für NKA, die Sequenz für $NP\gamma$ ist in den Exons 3, 5 und 6 enthalten, wohingegen die Sequenz für NPK in den Exons 3, 4, 5 und 6 kodiert ist. Eine Übersicht der Spleißvarianten, ihrer Expressionsorte sowie der reifen Peptide ist in Abb. 5 gegeben.

mRNA	Exons	Reife Peptide	Expressionsort
αPPT-A	1 2 3 4 5 7	SP	ZNS
βPPT-A	1 2 3 4 5 6 7	SP, NKA, NPK	ZNS/ PNS
γPPT-A	1 2 3 5 6 7	SP, NKA, $NP\gamma$	ZNS/ PNS
δPPT-A	1 2 3 5 7	SP	ZNS/ Immunzellen

Abb. 5: Schematische Darstellung der mRNA-Spleißvarianten des PTA

(ZNS ... zentrales Nervensystem, PNS ... peripheres Nervensystem)

Hinsichtlich der proinflammatorischen Eigenschaften der Tachykinin A-Peptide könnten diese eine Rolle bei Entzündungsprozessen im Gehirn von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen, wie der AD, spielen. Tatsächlich wurde in 2 Studien eine Erniedrigung des SP-Gehalts im CSF von AD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen festgestellt (Cramer et al., 1985; Martinez et al., 1993). Dagegen konnte in einer Untersuchung kein signifikanter Unterschied der SP-Konzentration im CSF von AD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen ohne neurologische Erkrankungen gefunden werden (Rosler et al., 2001). In dieser Studie zeigte sich jedoch, dass die AD-Patienten mit einem späten Krankheitsbeginn (> 65 Jahre) eine höhere SP-Konzentration im CSF aufwiesen als Patienten mit einem früheren Krankheitsbeginn (< 65 Jahre). Übereinstimmend konnten verminderte SP-Konzentrationen im Kortex und Hypocampus von AD-Patienten gefunden werden (Beal and Mazurek, 1987; Bouras et al., 1990).

1.2.3. Procalcitonin

Procalcitonin (PCT) wurde in einer medullären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie identifiziert (Birnbäum et al., 1984). Das aus 116 AS bestehende Vorläuferprotein (Abb. 6) wird vom CALC-1-Gen, das sich auf Chromosom 11 befindet, kodiert und in den C-Zellen der Schilddrüse produziert. PCT enthält 3 strukturelle Teile: am N-terminalen Ende das Aminoprocacitonin, im mittleren Teil das Calcitonin und am C-terminalen Ende das Katalcalcin. Calcitonin spielt eine wichtige Rolle bei der Calcium-Homöostase. So inhibiert Calcitonin die knochenabbauenden Osteoklasten in ihrer Funktion (Zaidi et al., 1991). Katalcalcin hat eine Calciumspiegel-senkende Funktion im Plasma (Hillyard et al., 1983).

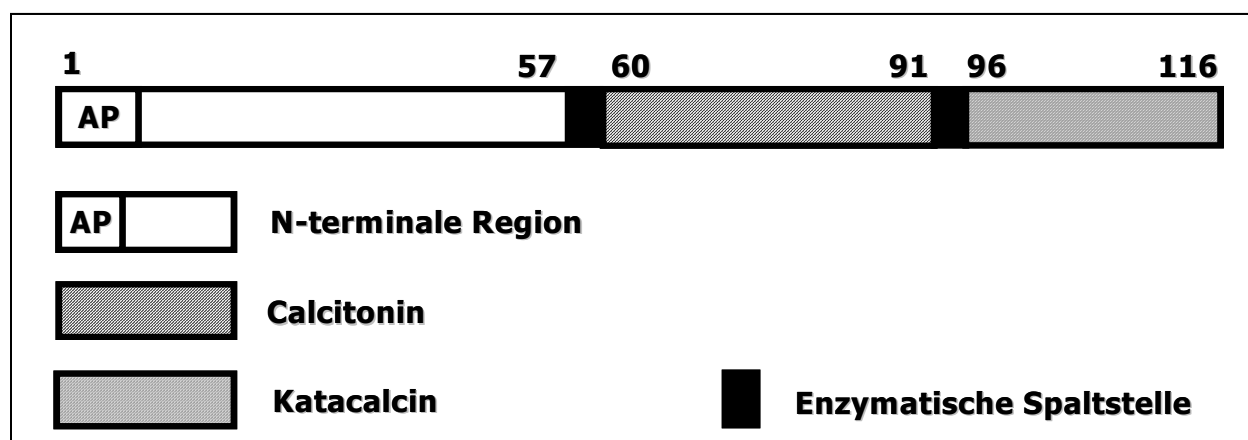


Abb. 6: Schematische Darstellung der PCT-Sequenz (ohne Signalpeptid, AS 1 bis 116, A ... Alanin, P ... Prolin)

Gesunde Menschen weisen sehr niedrige PCT-Konzentrationen in der Zirkulation auf. Dagegen zeigen Patienten mit bakteriellen Infektionen erhöhte Konzentrationen von PCT im Blut (Assicot et al., 1993). Die PCT-Konzentration korreliert mit der Schwere der bakteriellen Infektion, weshalb die Bestimmung von PCT im Blut von Patienten mit Sepsis und septischem Schock als Marker für die Diagnose dieser Erkrankung herangezogen wird (Snider et al., 1997; Whang et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass es sich beim zirkulierenden PCT um ein um 2 Aminosäuren verkürztes Molekül von 114 AS handelt, bei dem die N-terminalen Aminosäuren Alanin und Prolin fehlen (Weglohner et al., 2001). PCT liegt im Blut nicht chemisch modifiziert, d.h. frei von Glykosylierungen oder Phosphorylierungen, vor und weist vermutlich eine intramolekulare Disulfid-Brücke auf (Weglohner et al., 2001).

Als Ursprung des zirkulierenden PCT werden aktivierte Makrophagen und Hepatozyten vermutet (Braithwaite, 2000). Die biologische Funktion des PCT bei einer bakteriellen Infektion ist nicht eindeutig geklärt. Es wird angenommen, dass es eine modulatorische Wirkung auf die Inflamationsreaktion ausübt (O'Connor et al., 2001). Procalcitonin ist in der Zirkulation sehr stabil und weist eine Halbwertszeit von 25 bis 35 Stunden auf (Brunkhorst et al., 1998; Meisner et al., 2001). Im Vergleich dazu hat das reife Calcitonin eine Halbwertszeit von nur 4 bis 5 Minuten im Blut (Maruna et al., 2000). PCT kann mit kommerziell erhältlichen Immunoassays der Firma BRAHMS AG (Hennigsdorf, Deutschland), wie dem „PCT sensitiv“, im Blut detektiert werden. Die analytische Assaysensitivität des PCTsensitiv-Immunoassays liegt bei weniger als 7 pg/ml (Morgenthaler et al., 2002a). Der Normalbereich in 500 gesunden Probanden erstreckte sich zwischen nicht detektierbar (definiert als 5 pg/ml) und 63 pg/ml (Median 13,5 pg/ml), wobei es keinen signifikanten Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Probanden gab (Morgenthaler et al., 2002a).

Das Vorhandensein von PCT-Immunreaktivität (Ojeda et al., 2006) sowie die Stimulierbarkeit der PCT-Expression im Gehirn durch inflammatorische Prozesse (Kiryama et al., 2002; Morgenthaler et al., 2003) deuten darauf hin, dass PCT auch im Gehirn von Patienten mit AD eine Rolle spielen könnte. Diese Hypothese soll im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden.