

6. Diskussion

6.1. Entwicklung von Immunoassays zur Detektion von stabilen PENK A- und PTA-Fragmenten im Blut und CSF

Die Synthese vieler Neuropeptide und Peptidhormone erfolgt über größere Vorläuferproteine (Perone and Castro, 1997), die durch Prohormon-Convertasen an dibasischen Aminosäuresequenzen prozessiert werden und infolgedessen die reifen aktiven Peptide freisetzen (Beinfeld, 1998). Die quantitative Bestimmung von Neuropeptiden und Peptidhormonen im Blut bzw. CSF ist jedoch in den meisten Fällen schwierig. Infolge ihrer auto- bzw. parakrinen Wirkung gelangen viele aktive Peptide gar nicht erst in die Zirkulation oder ins CSF. Darüber hinaus werden zirkulierende Peptide, wie beispielsweise das Adrenomedullin, zum Teil von spezifischen Bindeproteinen maskiert (Pio et al., 2001) oder sie binden, wie das Vasopressin, an Blutplättchen (Preibisz et al., 1983) und sind somit für eine Immundetektion nicht zugänglich. Eine weitere Schwierigkeit stellt die geringe Stabilität der meisten Neuropeptide und Peptidhormone von nur wenigen Minuten, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, dar, die eine Vermessung dieser Moleküle in der Routine nicht möglich macht. Für einige aktive Peptide, wie Vasopressin, Endothelin-1, Adrenomedullin oder Neurotensin konnte eine immunometrische Quantifizierung über ihre stabilen Vorläuferfragmente Provasopressin₁₀₇₋₁₄₅ (Morgenthaler et al., 2006; Struck et al., 2005a), Proendothelin₁₅₁₋₁₉₅ (Papassotiriou et al., 2006; Struck et al., 2005b), Proadrenomedullin₂₄₋₇₁ (Morgenthaler et al., 2005; Struck et al., 2004) und Proneurotensin₁₋₁₁₇ (Ernst et al., 2006) gezeigt werden.

Eine zuverlässige Detektion von Enkephalinen, wie Met- und Leu-Enk, die sich von ihrem Vorläuferprotein Proenkephalin A ableiten, ist bisher nicht möglich. Enkephaline haben, wie andere aktive Peptide, eine sehr geringe Halbwertszeit von weniger als 15 Minuten im Blut (Mosnaim et al., 2003; Mosnaim et al., 1988). Auch die vom Protachykinin A abgeleiteten reifen Peptide SP und NKA sind im Blut sehr instabil (Berger et al., 1979; Cailles et al., 1998; Conlon and Sheehan, 1983). Des Weiteren wird ein großer Teil der zirkulierenden Enkephalin- bzw. SP-Moleküle durch Bindeproteine, wie Serumalbumin, für die Detektion durch spezifische Antikörper unzugänglich gemacht (Corbally et al., 1990; Possenti et al., 1983). Deshalb führen gerade Immunoassay-Techniken mit einem vorhergehenden Extraktionsschritt (z.B. SP-ELISA von IBL Immuno-Biological Laboratories) aufgrund der mangelnden Detektion des gebundenen Analyten zu falsch niedrigen Messergebnissen. Im CSF können oxidative Prozesse zur Modifizierung der

Aminosäurereste Methionin und Tryptophan führen. So kann Met-Enk aufgrund dieser Veränderungen eine zusätzliche negative Ladung aufweisen, die die Interaktion mit Antikörpern in Immunoassays beeinträchtigen können (Nyberg, 2004). Aufgrund dessen war ein Ziel der vorliegenden Arbeit die Entwicklung von zwei Sandwich-Immunoassays basierend auf der Chemilumineszenz- und Röhrenbeschichtungstechnik zur Detektion von stabilen Fragmenten der Proenkephalin A und Protachykinin A.

Mit Antikörpern spezifisch gegen die PENK A-Peptide₁₂₁₋₁₃₄ und₁₃₉₋₁₅₅ wurde ein Ein-Schritt-Immunoassay zur Detektion der PENK A₁₁₉₋₁₅₉-IR im Blut sowie im CSF erstellt. Die Charakterisierung der endogenen PENK A₁₁₉₋₁₅₉-IR im Serum und im CSF erfolgte mit Hilfe der Reversed-Phase-Chromatographie. Die Retentionszeit der Hauptimmunreaktivität war sowohl im Serum als auch im CSF identisch mit dem synthetisch hergestellten PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Peptid. Im Serum konnten zusätzlich PENK A₁₁₉₋₁₅₉-enthaltende Peptidfragmente mit stärkeren bzw. schwächeren hydrophoben Eigenschaften im Vergleich zum PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Peptid, aber in einem geringeren Ausmaß, detektiert werden (siehe Abb. 16). Diese PENK A₁₁₉₋₁₅₉-enthaltenden Fragmente waren im Gegensatz zum Serum nicht im CSF zu finden. Die spezifischen Antikörper anti-PENK A₁₂₁₋₁₃₄ (50-3-7) und anti-PENK A₁₃₉₋₁₅₅ (CF108) (siehe Tabelle 6) sind in der Lage, PENK A₁₁₉₋₁₅₉-enthaltende Peptidfragmente zu erkennen, da gezeigt werden konnte, dass sie auch mit rekombinantem PENK A kreuzreagieren (siehe Tabelle 8). Die Identifizierung des PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Moleküls im CSF erfolgte bereits im Jahr 2001 mittels Phasenseparation und anschließender Reversed-Phase-HPLC (Stark et al., 2001). Das Vorhandensein dieses Proenkephalinpeptidfragments in der Zirkulation konnte dagegen erstmals im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden.

Untersuchungen von Nyberg und Kollegen zufolge wird Proenkephalin A in der cerebrospinalen Flüssigkeit nur teilweise prozessiert (Nyberg and Terenius, 1985). Dies hätte zur Folge, dass größere Prozessierungsintermediate der PENK A-Sequenz in höheren Konzentrationen im Vergleich zu den aktiven Enkephalinpeptiden im CSF vorhanden wären (Nyberg et al., 1986; Nyberg and Terenius, 1985). Sowohl die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als auch die von Stark und Kollegen (Stark et al., 2001) deuten darauf hin, dass zumindest die potenziellen Prohormon-Spaltstellen Lysin¹¹⁷-Lysin¹¹⁸ sowie Lysin¹⁶⁰-Arginin¹⁶¹ des PENK A-Vorläufermoleküls im CSF vollständig gespalten und das PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Peptid freigesetzt wird. Dennoch ist denkbar, dass unprozessierte Enkephalin-enthaltende PENK A-Moleküle, die N- bzw. C-terminal vom PENK A₁₁₉₋₁₅₉ liegen, parallel zu PENK A₁₁₉₋₁₅₉ im CSF freigesetzt werden.

Die endogene PENK A₁₁₉₋₁₅₉-IR ist sowohl in Serum, EDTA-Plasma, Heparin-Plasma als auch im CSF für 48 h bei Raumtemperatur zu 100 % stabil. Die *in vitro*-Halbwertszeit der endogenen PENK A₁₁₉₋₁₅₉-IR liegt demnach weit über 48 h und damit um ein Vielfaches höher als die der reifen Enkephaline mit einer Halbwertszeit von weniger als 15 Minuten im Blut (Mosnaim et al., 2003; Mosnaim et al., 1988). Eine vergleichbar hohe Stabilität ist auch bei anderen Prohormonfragmenten, wie dem Proadrenomedullin₂₄₋₇₁ (Morgenthaler et al., 2005), dem Provasopressin₁₀₇₋₁₄₅ (Copeptin) (Morgenthaler et al., 2006) und dem Proneurotensin₁₋₁₁₇ (Ernst et al., 2006) zu finden. Über die Stabilität der aktiven Enkephalinpeptide im CSF ist bisher nichts bekannt, so dass hier kein direkter Vergleich zwischen dem PENK A-Fragment und den reifen Enkephalinen gezogen werden kann. Alle getesteten Probenmatrices sind aufgrund der Stabilität für die Bestimmung von PENK A₁₁₉₋₁₅₉ geeignet. Im Serum wurden etwa 20 % niedrigere PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Messwerte erreicht als im EDTA- oder Heparin-Plasma. Deshalb ist es für die Betrachtung und den Vergleich dieses Parameters zwischen verschiedenen Patientengruppen wichtig, eine identische Probenmatrix zu verwenden.

Die Detektion von PENK A₁₁₉₋₁₅₉ im Blut und CSF kann als Surrogatmarker für die Freisetzung der aktiven, aber instabilen PENK A-Peptide, wie Enkelytin, Met-Enk, Met-Enk-RGL und Met-Enk-RF dienen. Im Gegensatz zu diesen Enkephalinpeptiden ist das Pentapeptid Leu-Enk nicht nur auf dem PENK A-Voläufermolekül kodiert, sondern wird auch vom Prodynorphin freigesetzt (Horikawa et al., 1983), weshalb die Konzentration von PENK A₁₁₉₋₁₅₉ lediglich die Freisetzung des Leu-Enk aus dem PENK A-Precursor quantifizieren kann.

Ein Ein-Schritt-Immunoassay zur Detektion der PTA₁₋₃₇-IR in Blut und CSF wurde mit Antikörpern spezifisch gegen die PTA-Peptide PTA₃₋₂₂ und PTA₂₁₋₃₆ entwickelt. Die endogene PTA₁₋₃₇-Immunreaktivität wurde in EDTA-Plasma und im CSF, analog zu PENK A₁₁₉₋₁₅₉, mittels Reversed-Phase-HPLC charakterisiert (siehe Abb. 21). In beiden Körperflüssigkeiten war die Retentionszeit der PTA-Hauptimmunreaktivität identisch. Im Gegensatz zur nativen PTA-IR verschob sich die Retentionszeit des synthetischen PTA₁₋₃₇-Peptids jedoch um eine Minute, was den Schluss nahe legt, dass das verwendete Standardpeptid stärkere hydrophobe Eigenschaften aufweist als das native Molekül. Im EDTA-Plasma konnten zusätzlich PTA-Fragmente detektiert werden, die ähnlich wie bei dem endogenen PENK A₁₁₉₋₁₅₉, stärkere bzw. schwächere hydrophobe Eigenschaften im Vergleich zur Hauptimmunreaktivität aufwiesen. Im Gegensatz zum EDTA-Plasma waren diese PTA-Fragmente ebenfalls nicht im CSF zu finden, was auch hier die Vermutung nahe legt, dass Protachykinin A in der Cerebrospinalflüssigkeit nahezu vollständig prozessiert wird. Ähnlich wie andere Prohormone bzw. Proneuropeptide erfolgt die enzymati-

sche Spaltung des PTA-Vorläufermoleküls an dibasischen Aminosäuresequenzen und führt zur Freisetzung von Substanz P (AS 39 bis 49 der PTA-Sequenz) und einem N-terminalen PTA-Fragment (Beinfeld, 1998; Schwartz, 1986). Der Arginin-Rest an Position 38 wird anschließend durch eine Carboxypeptidase entfernt (Eipper et al., 1993), was zur Bildung des N-terminalen PTA-Fragments 1-37 führt. Dieses Fragment wurde bereits aus sogenannten Phaeochromocytoma-Zellen, Zellen aus einem gutartigen Tumor des Nebennierenmarks, isoliert (Kage et al., 1988). Die Ergebnisse der Reversed-Phase-HPLC deuten jedoch darauf hin, dass es sich bei der in der Zirkulation und im CSF detektierten PTA-IR nicht um das N-terminale PTA₁₋₃₇ handelt, sondern möglicherweise um ein noch kleineres Peptid-Fragment. Eine weitere potenzielle Spaltstelle für Enzyme stellt der Arginin-Rest an Position 35 dar (Devi, 1991). Die Spaltung zwischen Arginin³⁵-Isoleucin³⁶ und die nachfolgende Entfernung des Arginin³⁵ durch eine Carboxypeptidase würde zur Freisetzung des N-terminalen PTA₁₋₃₄ führen. Ungeachtet dieser Vermutungen müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die wahre Natur der endogenen, mit dem in dieser Arbeit entwickelten Immunoassay detektierbaren, PTA-IR in der Zirkulation und im CSF bestimmen zu können.

Die endogene PTA₁₋₃₇-IR ist in EDTA-Plasma und CSF für 48 h bei Raumtemperatur zu 100 % stabil. Die *in vitro*-Halbwertszeit dieses Moleküls liegt in diesen Matrices, wie auch die der endogenen PENK A₁₁₉₋₁₅₉-IR, weit über 48 h und somit deutlich über der Halbwertszeit der biologisch aktiven Tachykinin A-Peptide von weniger als 12 Minuten im Blut (Berger et al., 1979; Conlon and Sheehan, 1983). Die Stabilität der reifen Tachykinin A-Peptide wurde bisher nicht im CSF untersucht, so dass die Stabilitäten des hier immunoluminometrisch gemessenen PTA-Fragments und der biologisch aktiven PTA-Peptide im CSF nicht gegenüber gestellt werden können. Im Vergleich zum EDTA-Plasma und CSF nahm die gemessene PTA₁₋₃₇-IR im Serum mit der Zeit kontinuierlich ab, so dass nach 48 h Standzeit bei Raumtemperatur nur noch 22 % der ursprünglichen Immunreaktivität messbar war. Somit liegt die Halbwertszeit der PTA₁₋₃₇-IR im Serum bei etwa 24 Stunden. Auch im Heparin-Plasma findet über die Zeit ein kontinuierlicher Abbau der PTA₁₋₃₇-IR statt, der jedoch mit 20 % innerhalb von 48 h nicht so ausgeprägt ist wie im Serum. Dieser verstärkte Abbau der PTA₁₋₃₇-IR im Serum und Heparin-Plasma ist vermutlich auf die Degradation des Moleküls durch Proteasen zurück zu führen, die durch den Zusatz des Metallchelators EDTA im Plasma inaktiviert werden bzw. im CSF nicht vorkommen. Serum ist aufgrund der Instabilität für die Bestimmung der PTA₁₋₃₇-IR nicht geeignet, wohingegen frisch präparierte Heparin-Plasma- sowie EDTA-Plasma- und CSF-Proben verwendet werden können.

Die Detektion der PTA₁₋₃₇-IR kann im Blut und CSF als Surrogatmarker für die Freisetzung der aktiven, aber instabilen PTA-Peptide SP, NKA, NP γ und NPK fungieren, da die PTA₁₋₃₇-Sequenz in allen vier PTA-Spleißvarianten zu finden ist.

6.2. Untersuchung der diagnostischen Anwendbarkeit der Propeptidmessung von PENK A₁₁₉₋₁₅₉, PTA₁₋₃₇ und PCT bei Patienten mit AD

Die AD kann eindeutig erst nach dem Ableben des Patienten durch eine histopathologische Untersuchung des Gehirns auf das Vorhandensein der typischen Alzheimermerkmale, wie Amyloidplaques, Neurofibrillenbildung und Degeneration des Hirngewebes, diagnostiziert werden. Entsprechend den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie wird die AD heute durch Ausschluss anderer Demenzursachen diagnostiziert (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 2005), was sehr zeitaufwändig und teuer ist und oft zu einer Fehldiagnose führt. Eine einfache und sichere Diagnose der AD könnte durch die Bestimmung eines oder mehrerer spezifischer Biomarker im Blut oder CSF der Patienten erfolgen. Ein solcher Biomarker, der im Idealfall ein grundlegendes neuropathologisches Merkmal der Erkrankung mit einer Sensitivität und Spezifität von mindestens 80 % detektiert (Consensus Report, 1998), steht zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht zur Verfügung. Neuropeptide und Peptidhormone spielen eine zentrale Rolle in physiologischen Prozessen. So sind sie unter anderem in Gedächtnis- und Lernprozesse im Gehirn involviert (de Wied, 1997; Feany, 1996). Eine Dysfunktion dieser endogenen Peptide scheint unter anderem in Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen, wie der AD, zu stehen (Feany, 1996). Deshalb bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, die Quantifizierung der Proneuropeptide Proenkephalin A und Protachykinin A sowie des Prohormons Procalcitonin mittels stabiler Vorläufermoleküle auf ihre Anwendbarkeit als Biomarker für die Diagnose der AD im Vergleich zu nicht-dementen Kontrollprobanden bzw. Patienten mit weiteren primären Demenzerkrankungen sowohl in der Zirkulation als auch in der Cerebrospinalflüssigkeit zu untersuchen.

6.2.1. Untersuchung der PENK A₁₁₉₋₁₅₉-, PTA₁₋₃₇- und PCT-Immunreaktivität im Blut

Gesunde Menschen wiesen im Blut messbare PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Konzentrationen auf, die sich zwischen Männern und Frauen nicht unterschieden. Bei 92 % der untersuchten Probanden wurde eine Konzentration von unter 100 pmol/l gefunden. Das PENK A-Vorläuferprotein enthält 4 Kopien von Met-Enk und je eine Kopie der C-terminal verlängerten Met-Enk-Moleküle Met-Enk-RGL und Met-Enk-RF, die potenziell zu Met-Enk prozessiert werden können. 1 mol PENK A wird demnach bei vollständiger enzymatischer Spaltung zu 6 mol Met-Enk konvertiert. In verschiedenen Studien wurden im Blut von gesunden Personen mittlere Met-Enk-Konzentrationen von 30 bis 250 pmol/l gemessen (Figuerola et al., 1990; Spivey et al., 1994). Bei einer durchschnittlichen PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Konzentration von 64,3 pmol/l wird demnach 1 mol PENK A zu 0,5 bis 4 Met-Enk-Molekülen prozessiert. Dies könnte darauf hindeuten, dass in einer Vielzahl von Untersuchungen die Konzentration des biologisch aktiven Met-Enk, vermutlich bedingt durch die geringe Stabilität, das Vorkommen von Enkephalin-Bindeproteinen im Blut sowie die unterschiedlichen Messmethoden, unterbewertet wurde. Weiterhin wäre denkbar, dass PENK A im Blut nicht vollständig prozessiert wird und demzufolge niedrigere Konzentrationen des reifen Met-Enk detektiert werden. Tatsächlich wurden im Plasma bereits größere Enkephalin-enhaltende Polypeptide nachgewiesen (Boarder et al., 1982; Bush et al., 2006) und auch die hier erhaltenen Ergebnisse der RP-HPLC-Analyse (siehe Abb. 16) sowie die Untersuchung der endogenen PENK A-IR mit verschiedenen Antikörperkombinationen (siehe Abb. 12) deuten darauf hin, dass diese enkephalinhaltigen Polypeptide in der Zirkulation vorkommen. Im Gegensatz zum reifen Met-Enk, dessen Konzentration im Plasma in verschiedenen Studien keine Altersabhängigkeit zeigte (de Lourdes Figuerola et al., 1996; Govoni et al., 1987), wurde für die PENK A₁₁₉₋₁₅₉-IR eine signifikante Abnahme mit zunehmendem Alter nachgewiesen. Die Ursache für diesen Unterschied könnte zum Einen darauf beruhen, dass in der Studie von Govoni Kontrollprobanden mit einem Alter zwischen 55 und 86 Jahren einbezogen wurden (Govoni et al., 1987), wohingegen die Kontrollgruppe der vorliegenden Arbeit Probanden in einem größeren Altersspektrum zwischen 17 und 84 Jahren betrachtete. Die Studie von de Lourdes Figuerola und Kollegen berücksichtigte Probanden im Alter zwischen 25 und 78 Jahren, bezog sich aber auf eine sehr kleine Anzahl von nur 12 Kontrollpersonen (de Lourdes Figuerola et al., 1996).

Im Blut gesunder Menschen waren in 92 % der Fälle PTA₁₋₃₇-Konzentrationen von bis zu 10 pmol/l zu finden, die sich nicht zwischen männlichen und weiblichen Probanden unterschieden und nicht mit dem Alter der Probanden korreliert waren. Sowohl SP als auch die PTA₁₋₃₇-Sequenz werden von allen vier PTA-Spleißvarianten kodiert, so dass beide Moleküle in

einem equimolaren Verhältnis synthetisiert werden. In der Literatur sind im Vergleich zur PTA₁₋₃₇-IR ähnliche SP-Konzentrationen von durchschnittlich 10 pmol/l im Blut gesunder Personen zu finden (Kunt et al., 2000; Lockinger et al., 2004), die ebenfalls unabhängig vom Alter und Geschlecht der Probanden sind (Deuschle et al., 2005; Kunt et al., 2000). Es kann demnach angenommen werden, dass PTA in der Zirkulation vollständig prozessiert und SP sowie die PTA₁₋₃₇-IR freigesetzt werden. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Ergebnisse der Untersuchung der endogenen PTA₁₋₃₇-IR mit verschiedenen Antikörperkombinationen (siehe Abb. 18).

Die gesunden Probanden zeigten in dieser Studie unabhängig vom Alter eine mittlere PCT-Konzentration von 14 pg/ml im Blut, wobei 97 % der untersuchten Probanden PCT-Messwerte von weniger als 50 pg/ml aufwiesen. Dieses Ergebnis wird durch Untersuchungen an 500 gesunden Blutspendern, die eine durchschnittliche PCT-Konzentration von 13,5 pg/ml aufwiesen, unterstützt (Morgenthaler et al., 2002). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Morgenthaler und Kollegen, die keine Abhängigkeit der PCT-Messwerte vom Geschlecht finden konnten, wurde in dieser Arbeit eine signifikant niedrigere PCT-Konzentration bei weiblichen Probanden gemessen. Dieser Unterschied könnte auf die insgesamt niedrigere Anzahl der Probanden sowie die deutlich geringere Anzahl der Frauen (n = 37) im Vergleich zu den untersuchten Männern (n = 60) zurückzuführen sein.

Im Vergleich zu den dem Alter der Patienten angepassten gesunden Kontrollen wiesen Patienten mit einer ws AD, Patienten mit diversen differenzialdiagnostisch bedeutsamen primären Demenzsyndromen wie FTD, DLB und VD sowie Probanden mit subjektiven bzw. leichten kognitiven Beeinträchtigungen keine signifikanten Unterschiede, weder in der PENK A₁₁₉₋₁₅₉- und PTA₁₋₃₇-IR noch in der PCT-Konzentration, im Blut auf. Demnach eignen sich die drei untersuchten Parameter nicht als Blut-Biomarker für die Diagnose von Demenzsyndromen im Allgemeinen und der AD im Besonderen.

6.2.2. Untersuchung der PENK A₁₁₉₋₁₅₉-, PTA₁₋₃₇- und PCT-Immunreaktivität im CSF

Die Detektion von Neuropeptiden bzw. Peptidhormonen in der Cerebrospinalflüssigkeit hat den Vorteil, dass diese in ständigem Austausch mit der extrazellulären Flüssigkeit des Gehirns und des Rückenmarks steht. Deshalb können Änderungen der Peptidkonzentrationen im CSF wahrscheinlich eher Vorgänge des ZNS reflektieren als Änderungen in der Zirkulation (Nyberg, 2004).

Kognitiv unbeeinträchtigte Personen zeigten im CSF eine mittlere PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Konzentration von 6.240 pmol/l, die unabhängig vom Alter und dem Geschlecht der Probanden war. Die Angaben in der Literatur zur Konzentration der reifen Enkephaline, wie Met-Enk, im CSF schwanken stark zwischen 12 und 1.900 pmol/l (Harajiri et al., 1992; Stachura et al., 1997). Demzufolge liegt die Konzentration des Fragments PENK A₁₁₉₋₁₅₉ hier um das 3- bis 500fache über der Konzentration des reifen Met-Enk. Dies lässt vermuten, dass die Prozessierung des PENK A-Vorläufermoleküls im CSF N-terminal der Asparaginsäure¹¹⁹ und C-terminal des Serins¹⁵⁹ unvollständig erfolgt und größere PENK A-Peptidfragmente, die die Sequenz der reifen Enkephalinpeptide enthalten, ebenfalls freigesetzt werden. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass partiell prozessierte PENK A-Peptide neben den freien Enkephalinen in höheren Konzentrationen im CSF vorhanden sind (Liu et al., 1990; Nyberg et al., 1986; Nyberg and Terenius, 1985).

Im CSF der hier untersuchten Kontrollprobanden war eine mittlere PTA₁₋₃₇-Konzentration von 490 pmol/l detektierbar, die, wie SP (Almay et al., 1988; Samuelsson et al., 1993), weder mit dem Alter noch mit dem Geschlecht der Probanden korreliert war. In der Literatur finden sich im Vergleich zur PTA₁₋₃₇-IR Konzentrationen des SP von 6,8 bis 98 pmol/l (Martinez et al., 1993; Matsuishi et al., 1999). Die Konzentration des reifen Peptids liegt demnach 5- bis 70fach unter der des gemessenen PTA-Fragments. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass auch PTA im CSF nicht komplett enzymatisch gespalten wird. Die Untersuchung der endogenen PTA-IR mittels Reversed-Phase-HPLC (siehe Abb. 21) und Antikörpern, die spezifisch gegen C-terminale Epitope der PTA-Sequenz gerichtet sind (siehe Abb. 18), deuten jedoch darauf hin, dass die Aminosäuresequenz Arginin³⁸ – Arginin³⁹ im CSF nahezu vollständig prozessiert wird. Des Weiteren wäre denkbar, dass es sich bei der gemessenen PTA₁₋₃₇-IR um N-terminal verlängerte SP-Moleküle handelt. Das Vorkommen dieser PTA-Fragmente im CSF konnte bereits gezeigt werden (Toresson et al., 1988; Toresson et al., 1993; Toresson et al., 1994). Wie bereits erwähnt, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Struktur des nativen N-terminalen PTA-Peptids eindeutig bestimmen zu können.

Die PCT-Konzentration im CSF der kognitiv unbeeinträchtigten Personen, gemessen mit dem Immunoassay PCTsensitiv, lag im Mittel bei 27,5 pg/ml und war signifikant positiv mit dem Alter der Testpersonen korreliert. Diese Messwerte lagen deutlich unter dem in einer Studie bestimmten Mittelwert von 120 pg/ml PCT von Kontrollprobanden (Han et al., 2002). Allerdings wurde für die Erhebung dieser Daten der Immunoassay LUMItest-PCT der Firma BRAHMS verwendet, der eine 10fach höhere analytische Assaysensitivität von 80 pg/ml im Vergleich zum hier eingesetzten Immunoassay PCTsensitiv mit einer analytischen Assaysensitivität von 7 pg/ml aufweist. Der älteste Kontrollproband der in dieser Arbeit untersuchten Gruppe wies mit 84 Jahren eine PCT-Konzentration von 450 pg/ml im CSF auf. Dieser wurde in die Auswertung mit einbezogen, konnte jedoch mit Hilfe des Grubb's-Tests als statistischer Ausreißer identifiziert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass dieser Proband eine nicht-diagnostizierte Erkrankung aufweist, die mit einer erhöhten PCT-Konzentration im CSF einhergeht. Das im Blut zirkulierende Molekül ist PCT₃₋₁₁₆ (Weglohner et al., 2001). Es ist nicht bekannt, ob es sich auch bei dem in CSF gemessenen PCT-Molekül um dieses Fragment handelt. Die primäre Struktur des Procalcitonin im CSF könnte durch eine Isolierung des Moleküls sowie eine anschließende massenspektrometrische Analyse und N-terminale Sequenzierung analog zur Untersuchung des PCT im Serum (Weglohner et al., 2001) überprüft werden.

In der Cerebrospinalflüssigkeit von Patienten mit primären Demenzerkrankungen konnte, im Unterschied zum Blut, eine signifikante Abnahme der gemessenen PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Konzentration im Vergleich zur kognitiv unbeeinträchtigten Kontrollgruppe nachgewiesen werden (siehe Abb. 35). Die einzelnen Demenzformen ließen sich jedoch nicht differenzialdiagnostisch voneinander unterscheiden, was durch die Vermessung eines größeren Probenkollektivs der verschiedenen Demenztypen im Weiteren überprüft werden könnte. Eine Untersuchung von Korshunova und Kollegen zeigte bereits eine signifikante Abnahme der Met-Enk-Konzentration im CSF von Patienten mit seniler Demenz (Korshunova et al., 1984). Des Weiteren zeigten Untersuchungen der endogenen Opioidpeptide β -Endorphin und Dynorphin A, die sich von den Vorläufermolekülen Proopiomelanocortin bzw. Prodynorphin ableiten, ebenfalls eine signifikante Reduktion im CSF von Patienten mit AD (Sulkava et al., 1985; Sunderland et al., 1991). Auch Patienten mit einer vaskulären Multiinfarkt-Demenz wiesen in einer Studie niedrigere β -Endorphinkonzentrationen im CSF auf (Sulkava et al., 1985). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Verringerung der endogenen Opioidpeptidkonzentration im CSF allgemein mit Demenzerkrankungen assoziiert sein könnte. Bei einem PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Schwellenwert von 4.900 pmol/l wird eine Spezifität von 80 % bei einer Sensitivität von 45 % erreicht. Die Wahr-

scheinlichkeit einer Demenzerkrankung ist bei einem PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Messwert im CSF von weniger als 4.900 pmol/l um das 3fache erhöht.

Im CSF der Patienten mit primärem Demenzsyndrom fand sich im Gegensatz zur Zirkulation ebenfalls eine signifikante Verminderung der PTA₁₋₃₇-IR im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abb. 37). Auch die Quantifizierung der PTA₁₋₃₇-IR ließ, wie die Bestimmung der PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Konzentration, keine differenzialdiagnostische Unterscheidung der verschiedenen Demenzsyndrome zu, was auch hier durch eine Aufstockung der Probenanzahl geprüft werden könnte. Wie für das PTA-Fragment konnten auch für SP signifikant erniedrigte Konzentrationen im CSF von Patienten mit ws AD gemessen werden (Cramer et al., 1985; Martinez et al., 1993), was die Resultate der vorliegenden Arbeit unterstützt. Die diagnostische Wertigkeit der PTA₁₋₃₇-Messung im CSF von Patienten mit primär neurodegenerativen Erkrankungen entspricht der PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Bestimmung. Bei einem PTA₁₋₃₇-Schwellenwert von 450 pmol/l wird eine Spezifität von 80 % bei einer Sensitivität von 50 % erreicht. Die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Demenzerkrankung ist bei einem PTA₁₋₃₇-Messwert von unter 450 pmol/l etwa um das 4fache erhöht.

CSF-Peptidkonzentrationen könnten als Marker für die funktionelle Aktivität im zentralen Nervensystem dienen. Eine veränderte Aktivität von neuronalen neuropeptid-synthetisierenden Zellen könnte somit Modifikationen der Neuropeptidkonzentration im CSF hervorrufen (Nyberg, 2004). Diese Hypothese wird durch Untersuchungsergebnisse unterstützt, die zeigen, dass z.B. eine Stimulation der Nerven zu einem Anstieg der SP- und Met-Enk-RF-Immunreaktivität im CSF führt (Almay et al., 1985; Han et al., 1991). Möglicherweise zeigt also eine verminderte Konzentration der PENK A₁₁₉₋₁₅₉- und PTA₁₋₃₇-IR im CSF eine reduzierte Aktivität der PENK A- und PTA-synthetisierenden Nervenzellen im ZNS an. Die untersuchten primären Demenzsyndrome gehen jedoch mit einer irreversiblen Degeneration von Nervengewebe einher. Es ist daher anzunehmen, dass die Abnahme der Peptide im CSF bei diesen Erkrankungen primär auf das Absterben der PENK A- und PTA-synthetisierenden Nervenzellen zurückzuführen ist.

Bei Patienten mit einer akuten Inflammation des ZNS, wie z.B. einer Meningitis oder Enzephalitis, konnte ebenfalls eine deutliche Abnahme der Proneuropeptide PENK A₁₁₉₋₁₅₉ sowie PTA₁₋₃₇ in der Cerebrospinalflüssigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden (siehe Abb. 35 und 37). Die Reduktion dieser Moleküle im CSF ist demnach nicht spezifisch für neurodegenerative Erkrankungen. Akute neuroinflammatorische Erkrankungen sind nicht primär mit einem Untergang von Nervenzellen verbunden, weshalb hier die Ursache der verminderten Proneuropeptid-Konzentrationen in einer potenziell reversiblen reduzierten Aktivität der Neuronen

vermutet werden kann. Entgegen der hier gezeigten Reduktion der Proneuropeptid-Fragmente PENK A₁₁₉₋₁₅₉ und PTA₁₋₃₇ im CSF von Patienten mit Meningitis bzw. Enzephalitis konnte keine Veränderung des reifen Met-Enk (Ciesla et al., 2005) bzw. eine Erhöhung der SP-Konzentration bei diesen Erkrankungen gefunden werden (Qureshi et al., 2000).

Es ist nicht genau bekannt welche Rolle Enkephalin- und Tachykinin A-Peptide bei Gedächtnis- und Lernprozessen spielen. Für SP und auch für die Enkephaline konnte jedoch ein gedächtnisfördernder Effekt nachgewiesen werden (Hasenohrl et al., 2000; Schulteis and Martinez, 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Abnahme der PENK A- und PTA-Propeptidfragmente im CSF der Demenzpatienten detektiert, die allerdings nicht mit einer Verminderung des MMS-Score, einem Maß für die kognitiven Fähigkeiten eines Menschen (Folstein et al., 1975), einherging.

Sowohl in der Zirkulation als auch im CSF korrelieren die PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Konzentrationen signifikant positiv mit der entsprechenden PTA₁₋₃₇-IR der Kontrollprobanden und Patienten. In einer Untersuchung konnte, wie in der vorliegenden Arbeit für die Proneuropeptid-Fragmente, eine positive Abhängigkeit der reifen Neuropeptide Met-Enk und SP im CSF nachgewiesen werden (Samuelsson et al., 1993). Des Weiteren wurde eine Korrelation der SP- und Met-Enk-Konzentration in humanem Zahnmarkgewebe gefunden (Parris et al., 1989), wohingegen keine Aussage über eine Beziehung dieser Peptide im Blut in der Literatur zu finden war. Die Korrelation zwischen SP und Enkephalin bzw. deren Vorläufermolekülen könnte auf ihre funktionellen Zusammenhänge sowohl in der Peripherie als auch im ZNS zurück zu führen sein. Im Nervensystem üben SP und die Enkephaline gegenteilige Effekte aus. SP ist hier, neben anderen Neurotransmittern, verantwortlich für die Weiterleitung von Schmerzsignalen mittels sensorischer Nervenfasern vom peripheren zum zentralen Nervensystem (Zubrzycka and Janecka, 2000). Die ankommenden Schmerzreize werden durch verstärkende (exzitatorische) bzw. abschwächende (inhibitorische) Interneurone moduliert. So setzen inhibitorische Interneurone u.a. Enkephaline frei, die durch Bindung an Rezeptoren auf der Oberfläche der sensorischen Nervenfasern die Freisetzung von SP und somit das SP-vermittelte Schmerzsignal inhibieren (Aimone and Yaksh, 1989). Des Weiteren spielen sowohl SP als auch die Enkephaline in der Peripherie eine immunmodulatorische Rolle (Harrison and Geppetti, 2001; Plotnikoff et al., 1997; Salzet and Tasiemski, 2001) und besitzen darüber hinaus beide antibakterielle Eigenschaften (Goumon et al., 1996; Kowalska et al., 2002).

Patienten mit einer primären Demenzerkrankung hatten im Vergleich zu kognitiv uneinträchtigen Probanden in der cerebrospinalen Flüssigkeit signifikant erhöhte PCT-

Konzentrationen (siehe Abb. 39), die sich jedoch zwischen den verschiedenen Demenzsyndromen ebenfalls nicht unterschieden, was auf die geringen Fallzahlen der Patienten in den einzelnen Demenzgruppen zurückzuführen sein kann. Wie für PENK A₁₁₉₋₁₅₉ und PTA₁₋₃₇ sollten deshalb größere Probenkollektive vermessen werden, um eine differenzialdiagnostische Relevanz des PCT im CSF zu überprüfen. Die Patienten mit subjektiven kognitiven Störungen wiesen ebenfalls einen Anstieg der mittleren PCT-Konzentration im CSF auf, der jedoch nicht signifikant war. Dies ist wahrscheinlich auf die geringe Fallzahl und die breite Streuung der PCT-Messwerte bei dieser Patientengruppe zurückzuführen. Die Demenzpatienten können bei Festlegung des PCT-Schwellenwertes auf 57 pg/ml mit einer Spezifität von 80 % und einer Sensitivität von 75 % von den nicht-dementen Kontrollprobanden unterschieden werden. Die Wahrscheinlichkeit einer Demenzerkrankung ist bei einem PCT-Messwert von über 57 pg/ml um das 12fache erhöht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus zwei Studien (Jereb et al., 2001; Kepa et al., 2005) konnten auch in der vorliegenden Arbeit erhöhte PCT-Konzentrationen im CSF einiger Patienten mit akuter Neuroinflammation gefunden werden. Das zentrale Nervensystem stellt eine potenzielle Quelle für die PCT-Synthese, sowohl bei systemischen Inflammationen wie Sepsis (Morgenthaler et al., 2003; Muller et al., 2001), als auch bei neuroinflammatorischen Erkrankungen wie Meningitis und Enzephalitis, dar. Allerdings scheinen inflammatorische Prozesse auch bei primär neurodegenerativen Erkrankungen einschließlich der AD (Akiyama et al., 2000), der FTD (Rentzos et al., 2006; Sjogren et al., 2004), der VD (Jia et al., 2005; Wada-Isoe et al., 2004) sowie der DLB (Katsuse et al., 2003; Mackenzie, 2000) eine Rolle zu spielen. Die signifikante Erhöhung der PCT-Konzentration im CSF deutet darauf hin, dass eine verstärkte PCT-Expression im ZNS bei neurodegenerativen Erkrankungen durch subakute chronische Entzündungsprozesse ausgelöst wird (Akiyama et al., 2000; Minghetti, 2005). Die PCT-Konzentration der Demenzpatienten ist signifikant negativ mit dem entsprechenden MMS-Score korreliert. Demzufolge könnte die Bestimmung von PCT im CSF für die Kontrolle des Krankheitsverlaufs hilfreich sein. Im Gegensatz zum PCT scheinen PENK A und PTA nicht primär in inflammatorische Prozesse im Gehirn involviert zu sein, da weder die PENK A₁₁₉₋₁₅₉- noch die PTA₁₋₃₇-IR mit dem MMS-Score korrelieren und signifikant niedrigere statt höhere PENK A₁₁₉₋₁₅₉- und PTA₁₋₃₇-Konzentrationen im CSF messbar waren.

6.2.3. Konzentrationsgradienten der PENK A₁₁₉₋₁₅₉, PTA₁₋₃₇- und PCT-Peptide zwischen CSF und Blut

Der Hauptteil der Proteine in der Cerebrospinalflüssigkeit stammt, wie beispielsweise Albumin, das 35 bis 80 % des CSF-Proteins ausmacht, aus dem Blut (Reiber and Peter, 2001). 20 % der CSF-Proteine werden im Gehirn synthetisiert, sind jedoch nicht ausschließlich hirnspezifisch (Thompson, 1988). Das grundlegende Merkmal eines hauptsächlich aus dem Gehirn stammenden Proteins ist dessen höhere Konzentration im CSF im Vergleich zur Zirkulation (Reiber, 2003a). Beispiele für primär zerebral synthetisierte Proteine sind das β -trace-Protein, auch bekannt als Prostaglandin D-Synthase, die neuronenspezifische Enolase (NSE) sowie das Cystatin C (Reiber, 2003a). Das β -trace-Protein weist den größten bisher bekannten Konzentrationsgradienten von 34:1 zwischen CSF und Blut auf (Reiber et al., 2003c; Tumani et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwischen parallel entnommenen CSF- und Plasmaproben von gesunden Kontrollprobanden Konzentrationsgradienten von 140:1 für PENK A₁₁₉₋₁₅₉ bzw. 72:1 für PTA₁₋₃₇ detektiert. Die Gradienten dieser beiden Moleküle lagen somit deutlich über dem des für das β -trace-Protein bestimmten Wertes. Der Gradient der PCT-Konzentration lag dagegen mit 2,3:1 wesentlich niedriger. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zumindest PENK A und PTA bei Gesunden primär hirnspezifische Proteine darstellen, die jedoch nicht ausschließlich im ZNS exprimiert, sondern in geringeren Konzentrationen auch von verschiedenen peripheren Zellen in die Blutbahn abgegeben werden (siehe Kapitel 1.2.1. und 1.2.2.).

Der mittlere PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Konzentrationsgradient zwischen CSF und Plasma war im Vergleich zu den kognitiv unbeeinträchtigten Kontrollprobanden sowohl bei den Demenzpatienten als auch bei den Personen mit SKS erniedrigt (siehe Abb. 44). Eine signifikante Abnahme ließ sich hier jedoch nur für die Gruppe der ws AD-Patienten zeigen. Der optimale Schwellenwert lag bei einem PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Konzentrationsgradienten von 96,7, bei dem eine Sensitivität von 68 % für die ws AD-Patienten bei einer Spezifität von 82 % erreicht wurde. Die Sensitivität lag dagegen bei gleichbleibender Spezifität und Betrachtung der PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Konzentrationen allein im CSF bei nur 37 %. Fasst man die Daten der PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Konzentrationsgradienten der Patienten mit FTD, DLB und VD zu einer Gruppe zusammen, so ergibt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme (Dunn's Post Test $P < 0,05$). Ein signifikanter Unterschied zur Gruppe der Alzheimerpatienten wurde aber nicht gefunden. Auch der PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Konzentrationsgradient kann demzufolge Patienten mit einer ws AD

nicht differenzialdiagnostisch von Patienten mit anderen primären Demenzsyndromen, wie den hier untersuchten, unterscheiden.

Der mittlere PTA₁₋₃₇-Konzentrationsgradient unterschied sich nicht zwischen der Kontroll- und der gesamten Demenzpatientengruppe. Der PTA₁₋₃₇-Konzentrationsgradient war sowohl bei den ws AD- als auch bei den SKS-Patienten deutlich, aber nicht statistisch signifikant, niedriger (siehe Abb. 46). Dies kann auf die starke Streuung der Gradientenwerte in den Kontrollen zurück zu führen sein. Im Gegensatz dazu lagen die PTA₁₋₃₇-Konzentrationsgradienten der FTD-, DLB und VD-Patienten im Bereich der Kontrollen. Weitere Messungen mit einer größeren Anzahl von Proben müssten durchgeführt werden, um eine mögliche signifikante Abweichung des PTA₁₋₃₇-Konzentrationsgradienten zwischen Patienten ohne kognitive Störungen und Patienten mit ws AD sowie zwischen Patienten mit ws AD und Menschen mit weiteren primären Demenzerkrankungen zeigen zu können.

Die PCT-Konzentration lag im Plasma von mehr als 95 % der Kontroll- und Demenzpatienten im Normalbereich (unter 50 pg/ml). Der entsprechende PCT-Messwert war im CSF bei den Patienten mit Demenz, jedoch nicht bei den Kontrollen, erhöht, woraus sich ein im Vergleich zu den Gesunden erhöhter mittlerer PCT-Konzentrationsgradient von 6:1 für die Demenzpatienten ergab. Eine differenzialdiagnostische Unterscheidung der Patienten mit verschiedenen primären Demenzsyndromen ist auch mit Hilfe der Kalkulation des PCT-Konzentrationsgradienten nicht möglich. Für die Patienten mit akuter Neuroinflammation ergab sich ein Verhältnis zwischen PCT in CSF und Serum von 1:1, das sich signifikant von den einzelnen Demenzpatientengruppen sowie den Patienten mit SKS jedoch nicht von den Kontrollen unterschied.

Eine Kombination der Messergebnisse der einzelnen Biomarker-Kandidaten führt weder zu einer Verbesserung der Spezifitäts- und Sensitivitätswerte noch zu einer differenzialdiagnostischen Trennung der einzelnen Demenzgruppen.

Die Bestimmung der Proneuropeptidfragmente PENK A₁₁₉₋₁₅₉ und PTA₁₋₃₇ sowie des Prohormons PCT in der cerebrospinalen Flüssigkeit liefert einen Beitrag zur Diagnose von primären demenziellen Syndromen wie der AD, der FTD, der DLB sowie der VD. Die Erhöhung bzw. Erniedrigung dieser Biomarkerkandidaten ist jedoch nicht spezifisch für Morbus Alzheimer, weshalb eines der wesentlichen Kriterien eines idealen Biomarkers zur Diagnose der AD, die Detektion eines grundlegenden neuropathologischen Vorgangs dieser Erkrankung (Consensus Report, 1998), nicht erfüllt wird. Die berechneten Sensitivitäten und Spezifitäten von 75 und 80 % für PCT im CSF zur Unterscheidung von Gesunden und Demenzpatienten bzw. von

68 und 82 % für den PENK A₁₁₉₋₁₅₉-Konzentrationsgradienten zur Unterscheidung von Kontrollen und von AD-Patienten, kommen den Spezifitäts- und Sensitivitätsanforderungen der Konsensuskonferenz aus dem Jahr 1998 von jeweils 80 % sehr nahe (Consensus Report, 1998).

Der Konzentrationsgradient zwischen CSF und Blut wird durch die Funktion der Blut-CSF-Schranke aufrechterhalten. Diese stellt eine physiologische Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem CSF-System des Gehirns dar und wird durch das Kapillarendothel der Blutgefäße, die Basalmembran und das Plexusepithel des Plexus Choroideus gebildet. Sogenannte Tight Junctions zwischen den Endothelzellen bilden eine Diffusionsbarriere, die den Einstrom der meisten Substanzen, mit Ausnahme von Kohlendioxid, Sauerstoff und Wasser, vom Blut ins CSF erschweren (Reiber, 2003a). Eine Vielzahl neurologischer Erkrankungen gehen mit Permeabilitätsstörungen der Blut-CSF-Schranke einher. Dazu gehören entzündliche Prozesse, wie eine akute Meningitis oder Enzephalitis sowie Tumorerkrankungen und Ischämie (Reiber, 2005). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass eine Dysfunktion der Blut-CSF-Schranke auch bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie der AD und der VD, eine Rolle spielt (Hampel et al., 1995).

In der CSF-Diagnostik stellt der CSF-Serum-Konzentrationsgradient von Albumin ein allgemein akzeptiertes quantitatives Maß für die Blut-CSF-Schrankenfunktion dar. Da Albumin, wie bereits erwähnt, ausschließlich außerhalb des Gehirns synthetisiert wird, charakterisiert es mögliche Einflüsse für die Passage des Proteins vom Blut ins CSF (Reiber et al., 2003b). Aber auch eine Veränderung des Konzentrationsgradienten von primär hirnspezifischen Proteinen zwischen CSF und Blut könnte eine Rolle bei einer Schrankenfunktionsstörung spielen. So konnte gezeigt werden, dass bei neuroinflammatorischen Erkrankungen, wie der bakteriellen Meningitis, der β -trace-Protein-Konzentrationsgradient zwischen CSF und Serum aufgrund einer signifikanten Reduktion der β -trace-Protein-Konzentration im CSF abnimmt (Tumani et al., 1998). Die signifikante Abnahme der PENK A₁₁₉₋₁₅₉- und PTA₁₋₃₇-IR bei akuten neuroinflammatorischen Erkrankungen lässt vermuten, dass auch der Konzentrationsgradient dieser beiden Parameter im Vergleich zu Gesunden deutlich niedriger ist, wenngleich die Messwerte aus dem Blut nicht vorliegen. Um diese Annahme zu bestätigen, könnten in weiterführenden Untersuchungen Messungen dieser Proneuropeptidfragmente in parallel abgenommenen CSF- und EDTA-Plasmaproben erfolgen. Ähnlich wie für das β -trace-Protein bei bakterieller Meningitis konnte im Rahmen dieser Arbeit auch für PENK A₁₁₉₋₁₅₉ eine Verringerung des Konzentrationsgradienten zwischen CSF und Blut bei Patienten mit primären Demenzerkrankungen festgestellt werden. Eine Veränderung des Konzentrationsgradienten deutet jedoch nicht in jedem Fall auf eine Dys-

funktion der Blut-CSF-Schranke hin. So steigt der Konzentrationsgradient des β -trace-Proteins bei schwangeren Frauen aufgrund verringerter Konzentrationen des Proteins im Serum sowie erhöhter Konzentrationen im CSF von 34:1 auf 76:1 an (McArthur et al., 2005). Das β -trace-Protein ist bisher das einzige Protein von dem bekannt ist, dass seine Konzentration im CSF bei einer bakteriellen Meningitis deutlich erniedrigt ist (Tumani et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass auch die PENK A₁₁₉₋₁₅₉- und PTA₁₋₃₇-Immunreaktivitäten bei akuter Meningitis und Enzephalitis im Vergleich zu den Kontrollen niedriger waren.

6.3. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Propeptidfragmente Proenkephalin A₁₁₉₋₁₅₉ sowie Protachykinin A₁₋₃₇ in der Cerebrospinalflüssigkeit von Patienten mit primären neurodegenerativen Erkrankungen signifikant erniedrigt und die Konzentration des Prohormons Procalcitonin signifikant erhöht ist. Im Blut konnte dagegen für keinen der drei Markerkandidaten eine Konzentrationsveränderung, weder bei Demenzpatienten noch bei Patienten mit subjektiven oder leichten kognitiven Beeinträchtigungen, im Vergleich zu gesunden Personen nachgewiesen werden. Für die Bestimmung der Propeptide im CSF standen keine Proben von Patienten mit leichten kognitiven Beeinträchtigungen zur Verfügung. Die Betrachtung dieser Patientengruppe wäre hinsichtlich der Demenz-Frühd Diagnose von besonderem Interesse, da etwa 10 % der Patienten mit LKB innerhalb eines Jahres eine Demenz entwickeln (Bruscoli and Lovestone, 2004), von denen bei 90 % eine AD diagnostiziert wird (Visser et al., 2006). Darüber hinaus wäre die Untersuchung von Patienten mit LKB über einen Zeitraum von mehreren Jahren hinsichtlich möglicher Veränderungen der Propeptidkonzentrationen im CSF in Kombination mit psychopathologischen und, nach dem Ableben des Patienten, mit histopathologischen Befunden, denkbar, um die Anwendbarkeit der Propeptidmarker für die Frühd Diagnose zu überprüfen. Die im CSF von Patienten mit primären Demenzerkrankungen erhöhten PCT-Konzentrationen sind vermutlich auf chronisch entzündliche Prozesse im Gehirn zurückzuführen. Hier könnte der Therapieerfolg bei Behandlung der Patienten mit entzündungshemmenden Medikamenten, so genannten nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Präparaten (NSAID), wie Acetylsalicylsäure und Ibuprofen, durch fortlaufende Bestimmung der PCT-Konzentration im CSF verfolgt werden.

Des Weiteren wäre die Untersuchung der PENK A₁₁₉₋₁₅₉- und PTA₁₋₃₇-IR im CSF von einem größeren Kollektiv von Patienten mit akuten neuroinflammatorischen Erkrankungen, wie Meningitis und Enzephalitis, vorstellbar, um die hier mit wenigen Patienten gewonnenen Erkenntnisse zu überprüfen. Es könnte zusätzlich eine mögliche differenzialdiagnostische Unterscheidung zwischen bakterieller, viraler und aseptischer Inflammationsursache mit Hilfe der drei hier betrachteten Propeptidmarker untersucht werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten sensitiven Immunoassaysysteme zur Detektion der PENK A₁₁₉₋₁₅₉- und PTA₁₋₃₇-IR stellen ein stabiles Werkzeug für die Quantifizierung der Enkephalin- und SP-Freisetzung ins Blut bzw. ins CSF dar. Mit Hilfe dieser Immunoassays könnte die Rolle von Enkephalinen und Tachykinin A-Peptiden bei weiteren neurologischen Erkrankungen erforscht werden. Hinweise für Veränderungen der biologisch aktiven Peptide Enkephalin und SP im Gehirn, dem CSF oder im Blut finden sich bei Multipler Sklerose (MS) (Barker and Larner, 1992; Bourgoin et al., 1999), amyotropher Lateralsklerose (Matsuiishi et al., 1999), Depression (Bondy et al., 2003), Morbus Parkinson (Pezzoli et al., 1984), Chorea Huntington (Iadarola and Mouradian, 1989; Richfield et al., 2002), zerebraler Ischämie (Bruno et al., 2003; Kobari et al., 1988), Schizophrenie (Wen et al., 1983) oder Migräne (Langemark et al., 1995). Des Weiteren könnten die Konzentrationsgradienten der Proneuropeptide zwischen CSF und Blut hinsichtlich einer möglichen Blut-CSF-Schrankenstörung bei diesen neurologischen Erkrankungen untersucht werden.

Es wäre außerdem denkbar, Blut- und gegebenenfalls CSF-Proben von Patienten mit diversen nicht-neurologischen Indikationen auf ihre PENK A₁₁₉₋₁₅₉- und PTA₁₋₃₇-IR zu vermessen. So wurden in unterschiedlichen Studien Modifikationen der SP-Konzentration im Blut von Patienten mit Sepsis (Beer et al., 2002), rheumatoider Arthritis (Anichini et al., 1997), carcinoiden Tumoren (Calhoun et al., 2003; Turner et al., 2006) und Schmerzsyndromen wie der Fibromyalgie (Russell, 1998) gezeigt. Ebenso konnten Veränderungen der Enkephalinkonzentrationen bei Tumorerkrankungen (Vindrola et al., 1998; Zhu et al., 1995), Infektionen (Behar et al., 1994; Chadzinska et al., 2001) und Herz-Kreislauf-Störungen (Mateo et al., 1995) nachgewiesen werden.

Weitere Arbeiten könnten die Untersuchung der Propeptidfragmente in Körperflüssigkeiten wie Urin einschließen, da auch hier das Vorhandensein der reifen Peptide sowie mögliche Veränderungen ihrer Konzentration bei verschiedenen pathologischen Zuständen dokumentiert wurden (Bergstrom et al., 1995).