



Universitätsklinikum Ulm

Poliklinik für Neurologie

Prof. Dr. M.Otto
Zentrum für klinische Forschung
Helmholtzstr. 8/1, 89081 Ulm

Tel. (07 31) 500- 6 31 20
Fax (07 31) 500- 4 61 11
e-mail: markus.otto@uni-ulm.de

Einführung

Die Neuropeptide Hypokretin/Orexin wurden 1998 unabhängig von zwei Arbeitsgruppen entdeckt (de Lecea et al., 1998, Sakurai et al., 1998).

Aus dieser Zeit resultiert die synonyme Verwendung von Hypokretin bzw. Orexin, wobei in der schlafmedizinischen Literatur vornehmlich die Bezeichnung Hypokretin verwendet wird. Beim Menschen kodiert das auf Chromosom 17q21 lokalisierte Präpro-Hypokretin-Gen ein Produkt aus 131 Aminosäuren (Präpro-Hypokretin). Aus Präpro-Hypokretin werden Hypokretin-1 (33 Aminosäuren) und Hypokretin-2 (28 Aminosäuren) gebildet (Sakurai et al. 1998). Hypokretin-bildende Neuronen sind exklusiv im lateralen Hypothalamus lokalisiert, von wo aus Projektionsbahnen zu allen relevanten und Vigilanz-assoziierten Kerngebieten bestehen (Peyron et al., 1998).

In den vergangenen Jahren ließ sich in einer Reihe von Untersuchungen die Bestimmung von Hypokretin-1 im Liquor als zusätzlicher Marker im Rahmen der Diagnostik bei Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen einer Narkolepsie etablieren. So finden sich spezifisch bei Patienten mit klassischer Narkolepsie einhergehend mit Kataplexien deutlich erniedrigte, bzw. nicht nachweisbare Hypokretin-1-Spiegel im Liquor (Nishino et al., 2000; Dauvilliers et al., 2003).

Hcrt-1-radioimmunoassay (RIA)

Die Messung von Hypokretin-1 im Liquor im Rahmen von wissenschaftlichen Projekten erfolgt mittels eines für den Forschungsgebrauch zugelassenen Radioimmunoassays (RK-003-30 Orexin A [Human, Rat, Mouse], Phoenix Pharmaceuticals 530 Harbor Boulevard Belmont, CA 94002 USA).

Der Assay basiert auf einer kompetitiven Bindung von radioaktiv markiertem (¹²⁵I-Hypokretin-1) und nativem Hypokretin-1 an eine begrenzte Menge von Hypokretin-1-Antikörpern im Probenansatz. In Abhängigkeit von der Menge an nativem Hypokretin-1 reduziert sich die Menge an ¹²⁵I-Hypokretin-1 die an den Antikörper bindet. Durch die Messung der Radioaktivität des gebundenen ¹²⁵I-Peptides kann anhand einer erstellten Standardkurve die Menge an Hypokretin-1 im Probenmaterial ermittelt werden.

Als unteres Detektionslimit wird hierbei in der Regel 2-8 pg/Probengefäß angenommen, wobei 100 µL Liquor eingesetzt werden. In Bezug auf die international verwendete Einheit pg/ml bedeutet dies, dass Werte zwischen 20–80 pg/ml unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Die Messungen werden regelhaft als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Grenzwerte / diagnostische Empfehlungen

Derzeit werden Hypokretin-1-Werte im Liquor unterhalb von 110 pg/ml als pathologisch und richtungsweisend für das Vorliegen einer Narkolepsie angesehen. Messwerte zwischen 110 – 200 pg/ml werden als „intermediärer Bereich“ bezeichnet und Werte größer als 200 pg/ml als normal erachtet (Ripley et al., 2001, Mignot et al., 2002). Die Bestimmung von Hypokretin-1 im Liquor dient ausschließlich der wissenschaftlichen Verwendung.

Lumbalpunktion / Probenbehandlung

Die Lumbalpunktion ist nach erfolgter Patientenaufklärung entsprechend der örtlichen Standards durchzuführen.

Um bei Bedarf eine Wiederholung der Messung vornehmen zu können, ist für die Hypokretinbestimmung die Abnahme von etwa 1-2 ml Liquor zu fordern. Nach der Entnahme sollte das Material möglichst rasch eingefroren werden. Hierbei ist bei vorhandener technischer Ausstattung eine Lagerungstemperatur von -80 °C zu empfehlen. Zur Vereinfachung der weiteren Schritte und zur Vermeidung von unnötigen Auftauvorgängen ist ein Aliquotieren des Probenmaterials von mindestens 2 mal 500 µl pro Eppendorf-Tubes wünschenswert.

Versand

Der Versand der Proben sollte nach vorheriger Absprache unter Aufrechterhaltung der Kühlkette auf Trockeneis erfolgen. Als Ansprechpartner steht das Labor der Neurologischen Klinik am Zentrum für klinische Forschung (AG Otto) der Universität ULM unter nachstehender Adresse zur Verfügung:

Kontaktadresse

Prof. M. Otto
Universität Ulm
Neurologisches Labor/Zentrum für biomedizinische Forschung
Helmholtzstr. 8/1
89081 Ulm

Ansprechpartner

Stephen Meier
Tel.: 0731-500 63120
e-Mail: stephen.meier @uni-ulm.de

Literatur

- Dauvilliers, Y., C. R. Baumann, B. Carlander, M. Bischof, T. Blatter, M. Lecendreau, F. Maly, A. Besset, J. Touchon, M. Billiard, M. Tafti and C. L. Bassetti (2003). "CSF hypocretin-1 levels in narcolepsy, Kleine-Levin syndrome, and other hypersomnias and neurological conditions." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74(12): 1667-73.
- de Lecea, L., T. S. Kilduff, C. Peyron, X. Gao, P. E. Foye, P. E. Danielson, C. Fukuhara, E. L. Battenberg, V. T. Gautvik, F. S. Bartlett, 2nd, W. N. Frankel, A. N. van den Pol, F. E. Bloom, K. M. Gautvik and J. G. Sutcliffe (1998). "The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(1): 322-7.
- Mignot, E., G. J. Lammers, B. Ripley, M. Okun, S. Nevsimalova, S. Overeem, J. Vankova, J. Black, J. Harsh, C. Bassetti, H. Schrader and S. Nishino (2002). The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol*. 59: 1553-62.
- Nishino, S., B. Ripley, S. Overeem, G. J. Lammers and E. Mignot (2000). "Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy." *Lancet* 355(9197): 39-40.
- Peyron, C., D. K. Tighe, A. N. van den Pol, L. de Lecea, H. C. Heller, J. G. Sutcliffe and T. S. Kilduff (1998). "Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems." *J Neurosci* 18(23): 9996-10015.
- Ripley, B., S. Overeem, N. Fujiki, S. Nevsimalova, M. Uchino, J. Yesavage, D. Di Monte, K. Dohi, A. Melberg, G. J. Lammers, Y. Nishida, F. W. Roelandse, M. Hungs, E. Mignot and S. Nishino (2001). "CSF hypocretin/orexin levels in narcolepsy and other neurological conditions." *Neurology* 57(12): 2253-8.
- Sakurai, T., A. Amemiya, M. Ishii, I. Matsuzaki, R. M. Chemelli, H. Tanaka, S. C. Williams, J. A. Richardson, G. P. Kozlowski, S. Wilson, J. R. Arch, R. E. Buckingham, A. C. Haynes, S. A. Carr, R. S. Annan, D. E. McNulty, W. S. Liu, J. A. Terrett, N. A. Elshourbagy, D. J. Bergsma and M. Yanagisawa (1998). "Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior." *Cell* 92(4): 573-85.

Zusammenfassung / Hypokretin-1-Bestimmung im Liquor

- **Lumbalpunktion entsprechend den örtlichen Standards**
- **Aliquotierung von mindestens 2 x 500 µl Liquor**
- **Wenn möglich Plasma mitschicken**
- **rasches Einfrieren und Lagerung nach Möglichkeit bei -80 °C**
- **Versand unter Aufrechterhaltung der Kühlkette (Trockeneis) an**

Prof. M. Otto

Universität Ulm

Neurologisches Labor/Zentrum für biomedizinische Forschung

Helmholtzstr. 8/1

89081 Ulm

Bei Fragen zum Versand

E-Mail an stephen.meier@uni-ulm.de,

Telefon 0731/ 500-63120