

Technische Universität München

Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie

Klinikum rechts der Isar

Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. Förstl

**Lösliches Amyloidvorläuferprotein Beta als Biomarker
für die Alzheimer-Krankheit**

Lukas Benedikt Werle

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität

München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. R. G. Perneczky

2. Univ.-Prof. Dr. J. Förstl

Die Dissertation wurde am 18.09.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 15.04.2015 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	3
2	Einleitung.....	5
2.1	Grundlagen.....	5
2.1.1	Epidemiologie.....	5
2.1.2	Neuropathologie.....	6
2.1.3	Klinik.....	8
2.1.4	Diagnostik.....	9
2.1.5	Therapie.....	15
2.2	Lösliches Amyloidvorläuferprotein β als neuer Biomarker für die Alzheimer-Krankheit.....	17
2.2.1	Struktur.....	17
2.2.2	Eigenschaften.....	18
2.2.3	Eignung.....	19
2.2.4	Studienlage.....	20
2.3	Zielsetzung.....	22
2.3.1	Qualitätskontrollen.....	22
2.3.2	Lösliches Amyloidvorläuferprotein β im Liquor.....	22
2.3.3	Lösliches Amyloidvorläuferprotein β im Blut.....	22
3	Material und Methoden.....	23
3.1	Gesamtkollektiv.....	23
3.1.1	Patienten.....	23
3.1.2	Kontrollprobanden.....	24
3.2	Methoden.....	25
3.2.1	Klinische Testverfahren.....	25

3.2.2	Labordiagnostik.....	25
3.2.3	Statistische Datenanalyse	31
4	Ergebnisse	32
4.1	Qualitätskontrollen	32
4.1.1	Qualitätskontrollen im Liquor.....	32
4.1.2	Qualitätskontrollen im Blut.....	33
4.2	Lösliches Amyloidvorläuferprotein β im Liquor.....	34
4.3	Lösliches Amyloidvorläuferprotein β im Blut.....	40
5	Diskussion.....	44
5.1	Qualitätskontrollen und generelle Einschränkungen.....	44
5.1.1	Qualitätskontrollen im Liquor.....	44
5.1.2	Qualitätskontrollen im Blut.....	44
5.1.3	Generelle Einschränkungen.....	45
5.2	Lösliches Amyloidvorläuferprotein β im Liquor.....	45
5.3	Lösliches Amyloidvorläuferprotein β im Blut.....	47
6	Ausblick	50
7	Verzeichnis der Abkürzungen.....	51
8	Verzeichnis der Abbildungen	53
9	Literaturverzeichnis	54
10	Danksagung.....	63

1 Zusammenfassung

Die Alzheimer-Krankheit (AK) ist eine chronisch progrediente neurodegenerative Erkrankung, die sich klinisch durch eine Demenz äußert. Aufgrund des demographischen Wandels in Kombination mit der Altersabhängigkeit der AK wird die wirtschaftliche und medizinische Bedeutung dieser bereits jetzt sehr häufigen Erkrankung in den kommenden Jahren immens zunehmen. Die derzeit klinisch eingesetzten Biomarker – Liquorkonzentrationen der Proteine Amyloid β_{1-42} ($A\beta_{1-42}$), TAU-Protein (TAU) und phosphoryliertes TAU-Protein 181 (p-TAU), sowie strukturelle und funktionelle bildgebende Verfahren – sind entweder invasiv oder teuer zu bestimmen und spiegeln den pathophysiologischen Prozess der Erkrankung in einem Stadium wider, in dem die Neurodegeneration bereits irreversibel vorangeschritten ist. Voraussetzung für eine potentielle kausale Therapie der AK wäre deshalb ein diagnostisches Mittel, welches den Krankheitsprozess bereits vor dem symptomatischen Stadium mit irreversibler Neurodegeneration erkennt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit löslichem Amyloidvorläuferprotein Beta (engl. soluble amyloid precursor protein beta, sAPP β), welches ein Zwischenprodukt in der Amyloid β -Synthese darstellt und damit in der Amyloidkaskade oberhalb des neurotoxischen Endprodukts $A\beta_{1-42}$ entsteht. Konzentrationen von sAPP β bei kognitiv gesunden Probanden, Patienten mit einer leichten kognitiven Störung (engl. mild cognitive impairment, MCI) mit und ohne beginnender AK, sowie Patienten mit ausgeprägter Demenz bei AK, wurden in den Biomaterialien Liquor und Blutplasma miteinander verglichen.

Messungen der Konzentrationen von sAPP β im Liquor wurden erst in wenigen Studien durchgeführt, Messungen im Blut sind neu. Um die Validität der Ergebnisse zu sichern wurde die Messmethodik daher durch labortechnische Verfahren optimiert. Diese werden hier ebenfalls besprochen und dienen der kritischen Auseinandersetzung mit den Messergebnissen der vorliegenden Studie, wie auch mit Werten aus Laboruntersuchungen im Allgemeinen.

Die Ergebnisse der Messungen im Liquor zeigten, dass bereits sAPP β alleine eine gesunde Kontrollgruppe von einer Gruppe von MCI Patienten mit beginnender AK mit einer Sensitivität von 81 % und einer Spezifität von 85 % voneinander trennte, wobei die sAPP β -Konzentrationen in der MCI Gruppe signifikant erhöht waren. Innerhalb einer Gruppe von

Patienten mit MCI wurden die Kombinationen von je einem Biomarker der Amyloid-Pathologie ($A\beta_{1-42}$ bzw. sAPP β) mit einem der Neurodegeneration (TAU bzw. p-TAU) bezüglich der Prädiktion einer dementiellen Entwicklung miteinander verglichen. Unter Berücksichtigung des Patientenalters zeigte sich eine Verbesserung der Prädiktion der Entwicklung einer Demenz bei wahrscheinlicher AK durch die Kombination von sAPP β mit p-TAU gegenüber der Kombination von $A\beta_{1-42}$ mit TAU. Der Austausch des Amyloid-Markers $A\beta_{1-42}$ durch sAPP β trug mehr zur Verbesserung der Prädiktion bei, als der Austausch des Neurodegenerationsmarkers TAU durch p-TAU. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sAPP β den klinisch etablierten Liquor-Biomarkern in der AK-Früherkennung überlegen sein könnte.

Innerhalb einer Stichprobe aus kognitiv gesunden Kontrollprobanden konnte keine signifikante Korrelation der Konzentrationen von sAPP β im Blutplasma und im Liquor festgestellt werden.

Messungen von sAPP β im Blutplasma zeigten eine signifikante Reduktion der sAPP β -Konzentration bei Patienten mit Demenz bei wahrscheinlicher AK im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass sAPP β als blutbasierter AK-Biomarker dienen könnte, was weitreichende Folgen für die klinische Praxis der AK-Diagnostik hätte und aufgrund der minimal invasiven und kostengünstigen Blutuntersuchung AK-Screening-Programme ermöglichen würde.

Weiterführende unabhängige Studien werden benötigt, um die vorliegenden Ergebnisse in einen breiteren Kontext zu stellen.

2 Einleitung

2.1 Grundlagen

2.1.1 Epidemiologie

Die Delphi Consensus Studie von 2005 schätzte die weltweite Prävalenz der Demenz auf 24,3 Millionen Menschen mit einer Inzidenz von 4,6 Millionen Fällen pro Jahr und prognostizierte eine Verdopplung der Prävalenz über je 20 Jahre. Es wird erwartet, dass 2040 weltweit 81,1 Millionen Menschen an einer Demenz erkrankt sein werden (Ferri, Prince et al. 2005).

Der Hauptgrund für diesen Anstieg ist der demographische Wandel hin zu einer älteren Bevölkerung und betrifft die Entwicklungs- und Schwellenländer mit einer Anstiegsrate von über 300 % noch stärker als die Industrienationen mit 80-190 % (Hampel, Prvulovic et al. 2011). Die Prävalenz von Demenzerkrankungen steigt exponentiell mit einer Verdopplung alle vier bis fünf Jahre von 0,8 % bei 65- bis 69-jährigen auf fast 30 % bei über 90-jährigen Menschen (Lobo, Launer et al. 2000). Aufgrund ihrer höheren Lebenserwartung sind Frauen häufiger betroffen als Männer (Bickel 2000). Neuere Studien lassen jedoch vermuten, dass die Demenzprävalenz in Europa trotz der alternden Bevölkerung stabil bleibt. Als Gründe dafür werden die bessere Kontrolle wichtiger Risikofaktoren wie z.B. Bluthochdruck und Diabetes, sowie das ansteigende Bildungsniveau der europäischen Bevölkerung in Betracht gezogen (Matthews, Arthur et al. 2013, Qiu, von Strauss et al. 2013).

Im Jahr 2000 litten Schätzungen zufolge 900 000 Menschen in Deutschland an einer Demenz, bei ca. 200 000 Neuerkrankungen pro Jahr. Der Anteil von Demenz bei Alzheimer-Krankheit (AK) an diesen Fällen beträgt etwa 60 % (Bickel 2000).

Die ökonomischen Folgen sind enorm. Allein im Jahr 2008 wurden durch Demenzerkrankungen in Europa Kosten von etwa 160 Milliarden Euro verursacht bei 22 000 Euro Kosten pro Patient. Mit 56 % trägt der Anteil an informellen Pflegeleistungen – zum Beispiel durch Angehörige – am stärksten zu diesen Kosten bei. Hierbei werden neben den direkten auch indirekte Kosten, wie Verdienstaufschläge der Pflegenden mitberücksichtigt (Wimo, Jonsson et al. 2011). Die gesellschaftlichen und wirtschaftlichen Probleme, die durch diese „moderne Epidemie“ (Hampel, Prvulovic et al. 2011) auf uns zukommen, können kaum überschätzt werden.

2.1.2 Neuropathologie

2.1.2.1 Die Amyloid-Hypothese

Die Amyloid-Hypothese ist das aktuell am weitesten verbreitete Erklärungsmodell für die Pathogenese der AK. Sie basiert auf der Annahme, dass ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Abbau von Amyloid Beta ($A\beta$) den grundlegenden Prozess in der Pathogenese der AK darstellt (Blennow, Hampel et al. 2010). $A\beta$ ist der Hauptbestandteil der bereits 1907 von Alois Alzheimer beschriebenen senilen Plaques (Masters, Simms et al. 1985). Es entsteht durch enzymatische Spaltung aus einem Transmembranprotein, dem Amyloidvorläuferprotein (engl. amyloid precursor protein, APP) (Kang, Lemaire et al. 1987). Patienten mit AK bilden einen größeren Anteil an dem 42 Aminosäuren langem $A\beta$ ($A\beta_{1-42}$), welches stärker zu Ablagerungen im Gehirn neigt, als das von Gesunden vorwiegend gebildete 40 Aminosäuren lange $A\beta$ ($A\beta_{1-40}$) (Suzuki, Cheung et al. 1994). Mutationen in drei mit der AK assoziierten Genen – APP (Tanzi, Gusella et al. 1987), Präsenilin 1 (Sherrington, Rogaev et al. 1995) und Präsenilin 2 (Levy-Lahad, Wasco et al. 1995) – erhöhen die enzymatische Synthese von $A\beta_{1-42}$ aus APP (Scheuner, Eckman et al. 1996) und verursachen die sehr seltene familiäre Form der AK (Blennow, de Leon et al. 2006). Die Amyloid-Hypothese beruht auf diesen wenigen Mutationsträgern (s. 2.1.2.3), was für ihre Aussagekraft gleichzeitig eine wichtige Einschränkung darstellt.

Für die Entstehung der häufig auftretenden sporadischen Form der AK werden Faktoren des Alterungsprozesses in Kombination mit genetischen Risikofaktoren und Umwelteinflüssen als ursächlich angenommen. Diese führen ebenfalls zu erhöhter Bildung, veränderter Faltung und Ablagerung, sowie zu einer Störung des Abbaus und der Ausscheidung von $A\beta$ (Blennow, Hampel et al. 2010).

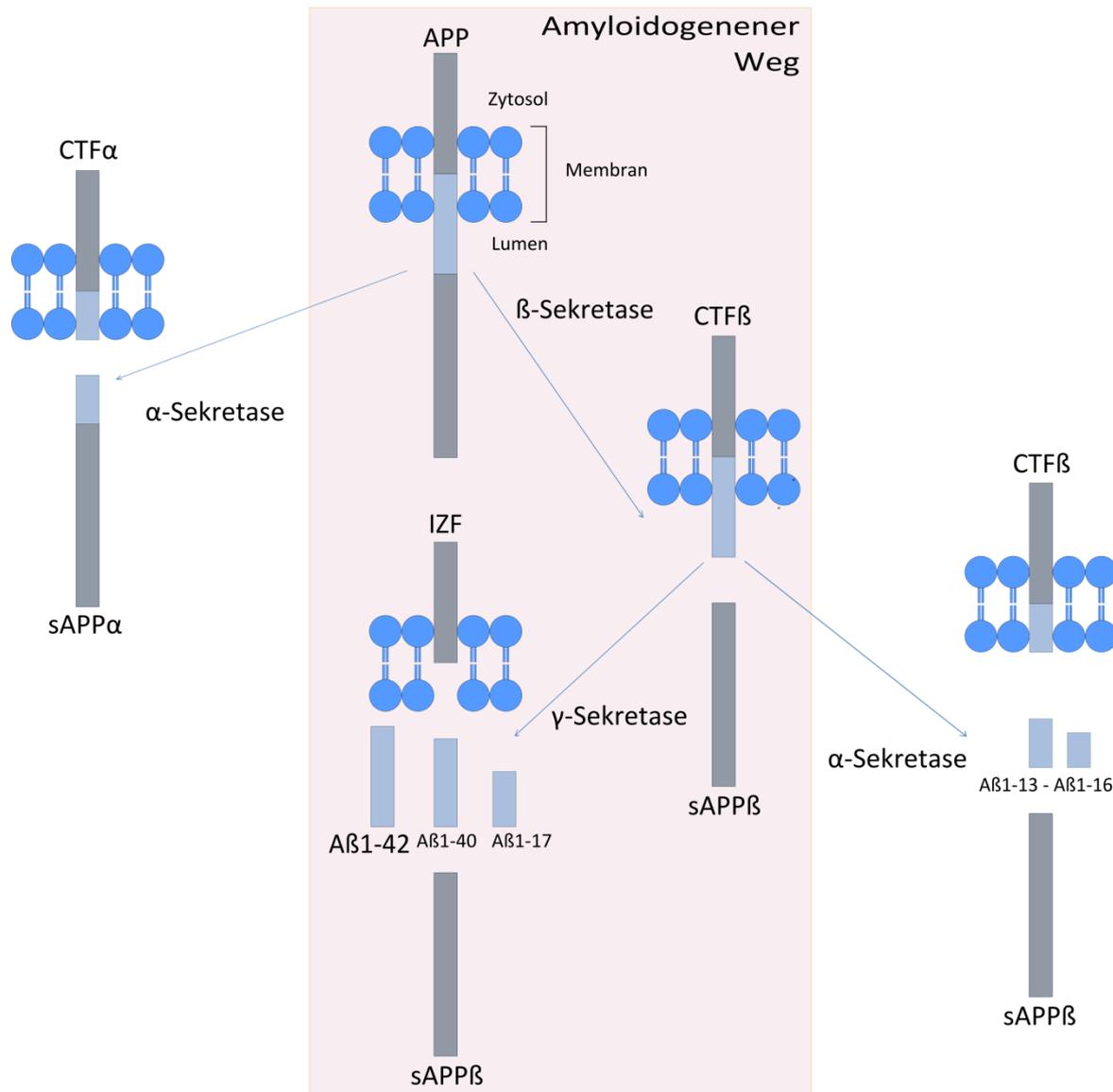
Gemäß der Amyloid-Hypothese führt die Neurotoxizität der abgelagerten $A\beta$ -Oligomere zu entzündlichen Prozessen, oxidativem Stress, sowie veränderter Kinase- und Phosphataseaktivität, aus der eine Hyperphosphorylierung des TAU-Proteins und die für die AK typischen Neurofibrillen resultieren. Über ähnliche Mechanismen scheinen auch lösliche ungebundene $A\beta$ -Oligomere zur Pathophysiologie der AK beizutragen. Diese Prozesse bewirken schließlich eine herabgesetzte Funktion der Neuronen und Synapsen, eine defizitäre Langzeitpotenzierung im Hippocampus und weitere Komponenten der Neurodegeneration.

Sich manifestierende Symptome wie kognitive Dysfunktion stellen den Endpunkt der Wirkungskette der Amyloid-Kaskade dar. (Walsh and Selkoe 2007, Blennow, Hampel et al. 2010, Klein 2013)

2.1.2.2 Die Prozessierung des Amyloidvorläuferproteins

Die enzymatische Prozessierung des APP ist in Abbildung 1 dargestellt.

Abbildung 1: Die enzymatische Prozessierung des Amyloidvorläuferproteins.



Auf dem amyloidogenen Weg wird APP durch die β-Sekretase geschnitten, wodurch sAPPβ freigesetzt wird. Die γ-Sekretase schneidet das in der Zellwand verbliebene carboxy-terminale Fragment. Als Spaltprodukte entstehen Aβ₁₋₄₂ sowie weitere Amyloid-Isoformen. Bei der Prozessierung von APP durch die α-Sekretase entsteht sAPPα, sowie nach einem weiteren Schnitt mit der γ-Sekretase das p3 Fragment (nicht gezeigt). Schneidet die α-Sekretase CTFβ, entstehen kürzere Aβ-Isoformen (Vassar, Bennett et al. 1999, Behr, Wrigley et al. 2002, Blennow, Hampel et al. 2010, Portelius, Price et al. 2011, Chasseigneaux and Allinquant 2012).

Abkürzungen: APP=Amyloidvorläuferprotein; CTF=carboxy-terminales Fragment; IZF=intrazelluläres Fragment; Aβ=Amyloid Beta; sAPP=lösliches Amyloidvorläuferprotein.

2.1.2.3 Genetische Einflüsse

Die familiäre Form der AK wird autosomal dominant vererbt, ist durch einen Beginn der dementiellen Symptomatik vor dem 65. Lebensjahr gekennzeichnet und mit einer Prävalenz von unter 0,1 % nur für sehr wenige AK-Fälle ursächlich (Harvey, Skelton-Robinson et al. 2003, Blennow, de Leon et al. 2006). Ihr liegen Mutationen in den Genen APP, Präsenilin 1 und Präsenilin 2 zugrunde. Mutationen von APP auf Chromosom 21 begünstigen die Amyloidogenese, indem sie APP zum bevorzugten Substrat der β - bzw. γ -Sekretase machen und die Bildung von A β -Fibrillen verstärken. Mutationen auf den Präsenilingenen ändern die Aktivität der γ -Sekretase und führen so zu einer gesteigerten Produktion von A β_{1-42} (Sisodia and St George-Hyslop 2002).

Für die sporadische Form der AK wurde eine Vielzahl genetischer Risikofaktoren identifiziert, wobei eindeutige Zusammenhänge mit dem Auftreten sporadischer AK aktuell für 10 dieser Gene nachgewiesen werden konnten (Hampel, Prvulovic et al. 2011). Der am besten untersuchte genetische Risikofaktor für sporadische AK ist der Genotyp für Apolipoprotein E (ApoE). Das Vorliegen eines ApoE $\epsilon 4$ -Allels erhöht das Erkrankungsrisiko für die AK um das 3-fache bei hetero- und um das 15-fache bei homozygoten Trägern (Farrer, Cupples et al. 1997). Das mittlere Erkrankungsalter sinkt pro ApoE $\epsilon 4$ -Allel um etwa 8 Jahre (Corder, Saunders et al. 1993). Damit ist der ApoE-Genotyp der mit Abstand stärkste genetische Risikofaktor für die sporadische Form der AK und der Effekt ist auf Bevölkerungsebene wesentlich stärker als der, der kausativen Mutationen. Die funktionellen Zusammenhänge sind noch nicht vollständig geklärt. ApoE hat eine wichtige Transportfunktion im Fettstoffwechsel des Gehirns. Das Vorliegen des ApoE $\epsilon 4$ -Allels scheint einerseits die Neuroplastizität, die synaptische Funktion und den Amyloidabbau zu beeinträchtigen und andererseits die Bildung von A β -Fibrillen zu begünstigen (Schellenberg and Montine 2012).

2.1.3 Klinik

Die dementielle Symptomatik der AK zeichnet sich durch einen schleichenden Beginn und langsame Progression aus. Neben dem Verlust des episodischen Gedächtnisses treten neuropsychologische Symptome wie Aphasie, Agnosie und Apraxie auf, sowie Einschränkungen der Alltagskompetenz wie zum Beispiel Urteilsfähigkeit, Orientierung und Entscheidungsfindung (Blennow, de Leon et al. 2006). Eine häufige Begleitsymptomatik ist

in frühen Stadien die Depression, während im späteren Krankheitsverlauf psychotische Symptome, Agitation und Aggression auftreten können (Lopez, Becker et al. 2003). Erreicht die Erkrankung ihr Endstadium, sind die Patienten meist vollpflegebedürftig und versterben schließlich an unspezifischen Ursachen, wie Herz-Kreislauf- oder Infektionskrankheiten (Kukull, Brenner et al. 1994).

Die Überlebenszeit nach der Diagnosestellung variiert stark und ist von Faktoren wie Zeitpunkt der Diagnose, Alter, Komorbiditäten etc. abhängig. Im Mittel beträgt sie vier bis sechs Jahre und ist bei Männern geringer als bei Frauen (Larson, Shadlen et al. 2004).

Schätzungen zufolge beginnt der neuropathologische Prozess der AK bereits 20 bis 30 Jahre vor dem Auftreten erster Symptome (Davies, Wolska et al. 1988). In der symptomatischen Phase ist der pathophysiologische Prozess somit schon weit vorangeschritten und zu großen Teilen irreversibel. Der Erkennung der AK-Pathologie in der präklinischen Phase kommt daher für die Entwicklung einer kausalen AK-Therapie eine entscheidende Bedeutung zu.

2.1.4 Diagnostik

Die definitive Diagnose der AK kann derzeit nur post mortem, nach einer histopathologischen Untersuchung des Gehirns, gestellt werden.

Die 1984 von der „National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke and the Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association“ (NINCDS-ADRDA) vorgeschlagenen Kriterien zur Diagnosestellung beschränken sich neben Erfassung der klinischen Symptomatik hauptsächlich auf den Ausschluss von Differentialdiagnosen und unterscheiden die unwahrscheinliche, die mögliche und die wahrscheinliche AK (McKhann, Drachman et al. 1984). Diese Kriterien sind zwar heute noch gebräuchlich, bedürfen aber aufgrund der biotechnologischen Entwicklungen der vergangenen 20 Jahre einer Aktualisierung. Der Versuch einer solchen Revision wurde 2011 von einer Arbeitsgruppe des „National Institute on Aging and the Alzheimer’s Association“ veröffentlicht. Die hier neu vorgeschlagenen Kriterien beziehen sowohl die klinische Symptomatik als auch diagnostische Hinweise auf eine Amyloid-Pathologie und Neurodegeneration mit ein, welche durch Liquor-Biomarker und bildgebende Verfahren gewonnen werden (McKhann, Knopman et al. 2011).

Aufgrund der neuropathologischen Erkenntnisse der letzte Jahrzehnte werden aktuell zwei Vorstufen der voll ausgeprägten Demenz bei AK unterschieden: Die präklinische Phase, in der die neuropathologischen Prozesse bereits begonnen haben, aber noch keine Symptomatik auftritt, sowie die Prodromalphase, welche sich symptomatisch in einer leichten kognitiven Störung (engl. mild cognitive impairment, MCI) äußert. MCI zeichnet sich durch eine gering ausgeprägte kognitive Symptomatik aus, welche die Unabhängigkeit und Alltagskompetenz nicht relevant beeinträchtigt und kann verschiedene Ursachen haben. Sowohl in der präklinischen Phase als auch in der Phase der MCI können mit den modernen diagnostischen Mitteln Aussagen über die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Demenz bei AK getroffen werden. Kriterien zur Klassifizierung dieser Wahrscheinlichkeiten wurden vom „National Institute on Aging and the Alzheimer’s Association“ 2011 vorgeschlagen (Albert, DeKosky et al. 2011, Sperling, Aisen et al. 2011).

Inwieweit sich diese neuen Kriterien klinisch etablieren werden, bleibt abzuwarten. Insgesamt zeichnet sich die Tendenz zu einer Positivdiagnose der „Demenz mit AK-pathophysiologischem Prozess“ ab.

Trotz der genannten Fortschritte eignen sich die derzeitig eingesetzten diagnostischen Mittel nur eingeschränkt zur Diagnose der AK im prädementiellen Stadium und gar nicht zur Diagnose der präklinischen AK. Die Früherkennung des AK-pathophysiologischen Prozesses in der präklinischen oder MCI-Phase bleibt somit nach wie vor eine wissenschaftliche Herausforderung.

2.1.4.1 Klinische Testverfahren

Grundlage der Diagnostik von Demenzerkrankungen sind neuropsychologische Testungen. Gängige Demenz-Testungen sind zum Beispiel der Fragebogen des „Consortium to Establish a Registry for Alzheimer’s Disease“ – CERAD (Morris, Mohs et al. 1988), das „Clinical Dementia Rating“ – CDR (Hughes, Berg et al. 1982) und der Uhrentest nach Shulman (Shulman 2000). Diese Tests bewerten objektiv sowohl kognitive Komponenten wie Merkfähigkeit, Orientierung, Wortflüssigkeit, Visuokonstruktion etc. (CERAD) als auch Aspekte der Alltagskompetenz wie Körperpflege, Urteilsfähigkeit, soziale Interaktion etc. (CDR).

2.1.4.2 Bildgebende Verfahren

Bildgebende Verfahren sind ein weiterer wichtiger Bestandteil der Demenz-Diagnostik. Sie dienen zum einen dem Ausschluss wichtiger Differentialdiagnosen (z.B. Apoplex, Hirntumor) als auch der strukturellen und funktionellen Einordnung der Neurodegeneration.

Mittels struktureller Magnetresonanztomographie (MRT) können Substanzverluste der grauen und weißen Substanz des Gehirns, wie Hippocampusatrophie oder Temporallappendegeneration beurteilt werden. Funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT) zeigt über die Messung des Blutsauerstofflevels Veränderungen der Gehirnaktivität während der Durchführung kognitiver Aufgaben an. Axonale Degeneration kann mit diffusionsgewichteter MRT dargestellt werden. Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ermöglicht mit [¹⁸F]-Fluorodesoxyglucose als Radiopharmakon die Beurteilung des Glucosemetabolismus (FDG-PET) oder mit dem Radiopharmakon [¹¹C]-Pittsburgh compound B (PiB-PET) die Darstellung von Amyloidablagerungen im Gehirn (Ewers, Sperling et al. 2011). Klinisch eingesetzt werden an spezialisierten Zentren derzeit strukturelle MRT, sowie PET-Verfahren.

2.1.4.3 Biomarker im Liquor

Mit den Proteinen A β ₁₋₄₂, Gesamt-TAU-Protein (TAU) und phosphoryliertes TAU-Protein 181 (p-TAU) sind derzeit 3 Liquor-Biomarker im klinischen Gebrauch.

A β ₁₋₄₂ spiegelt den pathologischen Amyloidmetabolismus wider und ist bei Patienten mit Demenz bei AK im Liquor signifikant erniedrigt. Dies wird darauf zurückgeführt, dass durch die Aggregation von A β in zerebralen Plaques der Anteil an A β , welcher in den Liquor diffundiert, verringert wird (Blennow, Hampel et al. 2010). Studien zeigen einen inversen Zusammenhang zwischen A β ₁₋₄₂-Konzentrationen im Liquor und der Menge an zerebralen amyloiden Plaques bzw. fibrillärem A β , welche durch PiB-PET oder bei der Autopsie bestimmt wurden (Fagan, Mintun et al. 2006, Tapiola, Alafuzoff et al. 2009). Die Verringerung der A β ₁₋₄₂-Konzentrationen geht der Erhöhung der TAU-Konzentrationen zeitlich voran und wurde schon bei älteren, kognitiv gesunden Menschen beobachtet, welche in der nachfolgenden Zeit eine Demenz bei AK entwickelten (Skoog, Davidsson et al. 2003, Gustafson, Skoog et al. 2007).

TAU ist ein axonales Protein, welches an Mikrotubuli bindet und deren Stabilität und Formation beeinflusst. Erhöhte Konzentrationen von TAU im Liquor zeigen krankheitsunspezifisch die Degeneration von Neuronen im Gehirn an. So finden sich erhöhte TAU Konzentrationen nicht nur bei AK-Patienten, sondern auch vorübergehend nach Schlaganfällen oder besonders ausgeprägt bei Patienten mit stark neurodegenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (CJD) (Otto, Wiltfang et al. 1997, Hesse, Rosengren et al. 2001, Blennow, Hampel et al. 2010).

Im Gegensatz dazu korreliert die Konzentration von p-TAU – an Position Thr181 oder Thr231 phosphoryliertes TAU-Protein – im Liquor AK-spezifisch sowohl mit der Menge an neokortikalen Neurofibrillen als auch mit der Stärke der Hippocampusatrophie (Hampel, Burger et al. 2005, Buerger, Ewers et al. 2006). Die Kombination aus erhöhtem TAU und p-TAU im Liquor spricht differentialdiagnostisch für das Vorliegen einer AK und gegen eine Demenz anderer Ursache (Blennow, Hampel et al. 2010).

Symptomatische AK-Patienten von kognitiv gesunden älteren Menschen zu unterscheiden ist durch jeden dieser drei Biomarker mit einer Sensitivität und Spezifität von 80-90% möglich. Eine Kombination dieser Biomarker ermöglicht die Abgrenzung der AK gegenüber Differentialdiagnosen wie Morbus Parkinson und Depression, sowie – wenn auch noch unzureichend genau – gegenüber Demenzen anderer Ursache wie frontotemporale, Lewy-Körperchen- oder vaskuläre Demenz (Hampel, Buerger et al. 2004, Blennow, Hampel et al. 2010). Auch die Identifizierung von Fällen prodromaler AK unter Patienten mit MCI wird mit dieser Biomarker-Kombination versucht. Eine individuelle Voraussage über die Entwicklung einer Demenz bei AK bei kognitiv gesunden älteren Menschen ist mit den genannten Biomarkern jedoch ungenau (Blennow, Hampel et al. 2010).

Eine Vielzahl von weiteren Liquor-Biomarkern für die AK wurde in den letzten Jahren vorgeschlagen, jedoch häufig mit nicht reproduzierbaren Ergebnissen. Mögliche neue Liquor-Biomarker sind unter anderem β -Sekretase-Aktivität, kürzere A β -Isoformen, A β -Oligomere, APP, endogene A β -Autoantikörper, neuronale und synaptische Marker (z.B. Visinin-like Protein 1), F2-Isoprostane und lösliches Amyloidvorläuferprotein α und β (engl: soluble amyloid precursor protein, sAPP α/β) (Blennow, Hampel et al. 2010). Die Vorteile von sAPP β

gegenüber anderen Biomarkern und die aktuelle Studienlage zu sAPP β als Biomarker für die AK werden separat besprochen (s. 2.2).

2.1.4.4 Biomarker im Blut

In den vergangenen Jahren wurden einige Stoffe auf ihre Eignung als blutbasierte Biomarker für die AK hin getestet – mit mäßigem Erfolg.

Der am besten untersuchte Plasma-Biomarker für die AK ist A β (Blennow, Hampel et al. 2010). So fanden einige Studien Zusammenhänge der Konzentrationen von A β_{1-42} , bzw. A β_{1-40} im Plasma oder deren Verhältnis zueinander mit dem Vorliegen oder der Vorhersage einer Demenz bei AK (Mayeux, Honig et al. 2003, Pomara, Willoughby et al. 2005, van Oijen, Hofman et al. 2006, Graff-Radford, Crook et al. 2007). Andere Studien konnten diese Zusammenhänge jedoch nicht bestätigen (Irizarry 2004). Die Inkonsistenz dieser Ergebnisse könnte darin begründet sein, dass A β auch außerhalb des Gehirns produziert wird (Mehta, Pirttila et al. 2000) und außerdem als lipophiles Molekül an Plasmaproteine bindet (Koudinov, Berezov et al. 1998, Kuo, Emmerling et al. 1999), wodurch maskierende Effekte bei der Messung mit Immuno-Assays auftreten.

In einer weiteren Studie wurden 18 Signalproteine im Plasma identifiziert, mit denen gesunde Kontrollprobanden von Patienten mit einer Demenz bei AK mit 90%iger Sicherheit unterschieden werden konnten und mit deren Hilfe eine Progression von MCI zu Demenz bei AK vorhergesagt werden konnte. Diese 18 Proteine wurden aus insgesamt 120 getesteten Proteinen herausgefiltert und erfüllen unterschiedlichste Funktionen für die Signaltransduktion, Immunantwort und Hämatopoese (Ray, Britschgi et al. 2007).

Erste Hinweise auf eine potentiell mögliche Erkennung der Alzheimer-Krankheit im präklinischen Stadium durch eine Blutuntersuchung lieferte eine Studie mit einem lipidomischen Ansatz (Mapstone, Cheema et al. 2014). Eine Reproduktion der Ergebnisse der proteomischen bzw. lipidomischen Studien steht noch aus.

Weitere auf ihre Verwertbarkeit als AK-Biomarker untersuchte Plasma-Moleküle sind unter anderem Komplementfaktor H und α_2 -Makroglobulin (Hye, Lynham et al. 2006), das Verhältnis der Mikrozirkulationsmarker mittelregionales pro-atriales natriuretisches Peptid

(MR-proANP) und C-terminales Endothelin-1 (Buerger, Ernst et al. 2009), sowie Homozystein und C-reaktives Protein (Lepara, Alajbegovic et al. 2009).

Bis auf das hydrophobe und auch peripher produzierte A β fehlt all diesen Biomarkern der unmittelbare Bezug zur Pathogenese der AK unter Voraussetzung der Amyloid-Hypothese. Ein Biomarker, dessen Position in der Amyloidkaskade klar definiert ist, der im Blut gelöst vorliegt und der einen Zwischenschritt und nicht den Endpunkt der Pathogenese repräsentiert, ist sAPP β .

2.1.4.5 Wertigkeit der diagnostischen Verfahren

In einer Analyse der Datenbank der „Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative“ (ADNI) wurde 2011 die prognostische Wertigkeit von individuellen Risikofaktoren, klinischen Testverfahren, von Substanzverlusten im MRT und der Biomarker TAU und A β ₁₋₄₂ im Liquor miteinander verglichen. In einer Stichprobe von Patienten mit MCI zeigte sich eine Überlegenheit der klinischen kognitiven Testverfahren gegenüber den meisten MRT- und Liquorbiomarkern für die Prognose einer Progression zur AK in einem Follow-up-Zeitraum von 2 Jahren (Gomar, Bobes-Bascaran et al. 2011). Neue bildgebende Verfahren wie FDG-PET bzw. PiB-PET oder Biomarker wie p-TAU oder sAPP β wurden in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt. Im Hinblick auf das langfristige Ziel – die AK bereits im präklinischen Stadium zu erkennen – sind kognitive Tests jedoch nicht geeignet und daher ist die Forschung an Pathophysiologie und Biomarkern der AK weiterhin von entscheidender Bedeutung.

Die Unsicherheit der Diagnose in der Früherkennung erfordert einen verantwortungsvollen Umgang mit der Information, die durch die Bestimmung von Biomarkern gewonnen wird. In Anbetracht der Tatsache, dass bisher noch keine langfristig wirksame Therapie der AK existiert (s. 2.1.5) sind die psychischen und sozialen Konsequenzen einer Frühdiagnose zu bedenken. Mögliche Folgen wie Depression, Suizidalität, Veränderung sozialer Beziehungen und die Unsicherheit der beruflichen Zukunft können die Lebensqualität deutlich herabsetzen. Die Beobachtung des Verlaufs einer dementiellen Erkrankung durch klinische Tests und Biomarker-Bestimmungen ist sowohl aus differentialdiagnostischen wie auch aus wissenschaftlichen Gründen dennoch angezeigt. Dabei ist zu beachten, dass eine Diagnose nie ohne Berücksichtigung der klinischen Symptome gestellt werden sollte. Die Patienten sollten mit der Information nicht alleine gelassen, sondern begleitet werden. Spezielle Programme,

welche biologische, psychische und soziale Aspekte der Erkrankung mitberücksichtigen müssen dringend entwickelt werden, um Patienten mit demenziellen Erkrankungen und deren Angehörigen suffiziente Hilfestellung anbieten zu können. (Perneczky and Kurz 2012)

2.1.5 Therapie

Die derzeit zugelassenen Behandlungsoptionen für Demenz bei AK beschränken sich auf wenige symptomatisch wirkende Medikamente in Kombination mit nicht-medikamentösen Therapieansätzen. Diese beinhalten sowohl Gedächtnistraining als auch Hilfestellungen zum Umgang mit der Krankheit für Patienten und Angehörige.

Basierend auf der „cholinergen Hypothese“, welche einen Mangel an Acetylcholin im erkrankten Gehirn als wichtige ursächliche Komponente der kognitiven Symptomatik ansieht, werden Acetylcholinesterase-Inhibitoren zur Stabilisierung der Gedächtnisleistung eingesetzt. Der Effekt dieser Medikamente hält jedoch nur für maximal 12 bis 24 Monate an und verlangsamt nicht den Nervenzelluntergang (Giacobini 2000, Haas 2012).

Als weiterer Faktor der Neurodegeneration bei AK wurde eine neuronale Überstimulation durch Glutamat an NMDA-Rezeptoren festgestellt (Lau and Tymianski 2010), weshalb der NMDA-Rezeptorantagonist Memantin zur medikamentösen AK-Therapie eingesetzt wird. Die neuroprotektive Wirkung von Memantin ist jedoch ebenfalls nicht von langer Dauer (Haas 2012).

Zusätzlich sind einige Nootropika wie Ginko Biloba zur Behandlung der AK zugelassen, deren Wirksamkeit jedoch umstritten ist (Birks and Grimley Evans 2009).

Ziel der derzeitigen pharmakologischen Forschung ist die Entwicklung von Pharmaka, welche direkt den pathophysiologischen Prozess der AK gemäß der Amyloid-Hypothese beeinflussen. In klinischen Tests befinden sich daher aktuell eine Vielzahl von β - und γ -Sekretaseinhibitoren, α -Sekretase-stimulierende Medikamente, sowie Inhibitoren der A β -Aggregation. Ein weiterer Ansatz in diese Richtung ist die antikörperbasierte A β -Immunotherapie (Haas 2012).

Gerade im Hinblick auf neue therapeutische Ansätze, welche den AK-pathophysiologischen Prozess beeinflussen sollen, ist die Erkennung dieses Prozesses bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome entscheidend.

Fazit:

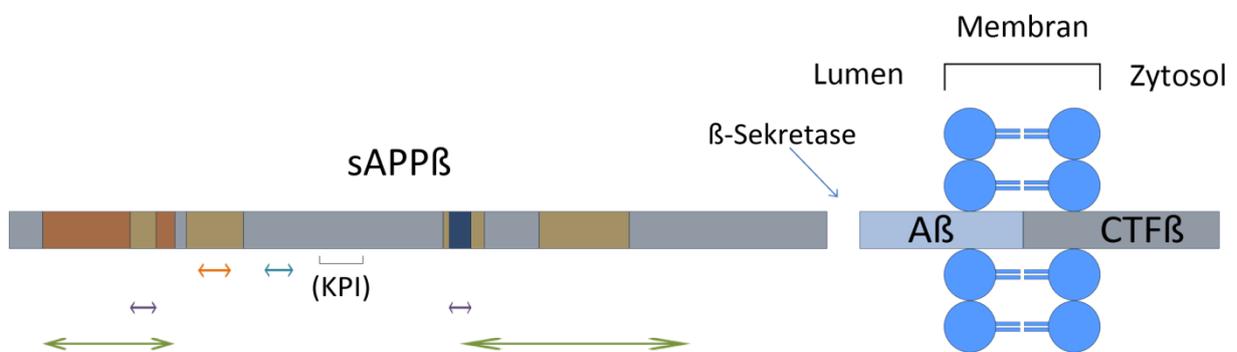
Den neurodegenerativen Prozess der AK rechtzeitig zu erkennen und noch vor dem Auftreten der demenziellen Symptomatik zu stoppen oder maßgeblich zu verzögern ist die Vision der aktuellen Demenzforschung.

2.2 Lösliches Amyloidvorläuferprotein β als neuer Biomarker für die Alzheimer-Krankheit

2.2.1 Struktur

sAPP β ist ein 654 Aminosäuren langes Protein und entsteht bei der enzymatischen Prozessierung von APP durch die β -Sekretase (s. Abb. 1, Abb. 2). Von APP existieren 3 Isoformen von je 770, 751 und 695 Aminosäuren Länge, wobei letztere ausschließlich in Neuronen exprimiert wird (Rohan de Silva, Jen et al. 1997). Die funktionellen Einheiten des sAPP β Moleküls sind in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Abbildung 2: Schematische Darstellung der funktionellen Struktur von sAPP β .



■ Heparin-Bindungsstellen (96-110, 131-166, 316-346, 382-447)

■ GFLD Domäne (28-123)

■ RERMS Sequenz (319-335)

↔ Kupfer-bindende Domäne (135-155)

↔ Zink-bindende Domäne (181-200)

↔ Neurotrophe Domänen

↔ Neuroprotektive Domänen

Das sAPP β -Molekül enthält sowohl neurotrophe als auch neuroprotektive Domänen. Die Heparin-Bindungsstellen (HBS) an Position 316-346 und die der GFLD (96-110), sowie die RERMS Sequenz fördern das Neuritenwachstum. GFLD und eine weitere HBS (382-447) haben neuroprotektive Eigenschaften. Die KPI Sequenz findet sich nur in nicht-neuronalen sAPP-Isoformen.

Abkürzungen: sAPP β =lösliches Amyloidvorläuferprotein Beta; A β =Amyloid Beta, CTF=carboxy-terminales Fragment; KPI=Kunitz-Protease-Inhibitor; GFLD=growth factor like domain; RERMS=Einbuchstabencode der fünf Aminosäuren (AS) dieser Sequenz; die Zahlen beziehen sich auf die Position der AS in der 695 AS langen APP-Isoform.

Grafik und Text modifiziert nach Chasseigneaux und Allinquant (Chasseigneaux and Allinquant 2012). Abbildung in abgeänderter Form publiziert (Perneckzy, Alexopoulos et al. 2014).

2013 wurden zwei C-terminale Varianten von sAPP β bestimmt: sAPP β -M671, sowie sAPP β -Y681. Die Positionsangaben beziehen sich hierbei auf die das 770 Aminosäuren lange APP (Brinkmalm, Brinkmalm et al. 2013).

2.2.2 Eigenschaften

Es wurden einige funktionelle Einheiten von sAPP β beschrieben, welche alle auch Teil von APP und sAPP α sind, da diese Proteine die sAPP β -Sequenz jeweils komplett beinhalten. Die Funktionen der gemeinsamen Einheiten scheinen in allen drei Molekülen identisch zu sein, sodass die funktionellen Unterschiede auf die jeweils zusätzlichen carboxyterminalen Fragmente von APP und sAPP α zurückzuführen sind (Chasseigneaux and Allinquant 2012).

Einige Domänen von sAPP β (HBS, GFLD, RERMS, s. Abb. 2) scheinen neurotrophe Funktionen zu besitzen (Chasseigneaux and Allinquant 2012). In vitro zeigten neuronale Zellkulturen durch die Zugabe von sAPP α oder sAPP β verringerte Zelladhäsion und verstärktes axonales Wachstum (Chasseigneaux, Dinc et al. 2011). Die neuronale Differenzierung von menschlichen embryonalen Stammzellen wird von sAPP β stärker induziert als von sAPP α (Freude, Penjwini et al. 2011).

In Studien mit Knockout-Mäusen wies sAPP β verschiedene neuroprotektive Effekte auf. So zeigte eine Studie aus dem Jahr 2010, dass die Funktion der neuroprotektiven Substanzen Transthyretin und Klotho sAPP β -abhängig, jedoch APP- und APP-like protein 2 (APLP2)-unabhängig ist (Li, Wang et al. 2010). Auch gegen Glukoseentzug, Excitotoxizität, und A β -Toxizität scheint sAPP β neuroprotektiv zu wirken (Barger and Harmon 1997, Chasseigneaux and Allinquant 2012). Insgesamt scheint der neuroprotektive Effekt von sAPP β jedoch deutlich geringer zu sein als der von sAPP α , was auf die fehlenden 16 C-terminalen Aminosäuren zurückgeführt wird, welche sAPP β von sAPP α strukturell unterscheiden (Chasseigneaux and Allinquant 2012).

Auch einige neurotoxische Effekte von sAPP β sind beschrieben. So hat sAPP β einen stimulierenden Effekt auf Mikrogliazellen, welche inflammatorische Prozesse im Gehirn auslösen (Barger and Harmon 1997). Eine weitere Studie zeigte, dass sAPP β eine Rolle bei der Apoptose peripherer Neuronen spielt, die künstlich durch den Entzug von Wachstumsfaktoren ausgelöst wurde. Dies erfolgte über die Bindung von sAPP β an den

neuronalen DR6-Rezeptor. Dieser Vorgang könnte auch zur zentralen Neurodegeneration der AK beitragen (Nikolaev, McLaughlin et al. 2009).

Weiterhin scheint sAPP β im Gegensatz zu sAPP α keine Rolle bei der Langzeitpotenzierung zu spielen (Chasseigneaux and Allinquant 2012).

Die Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die APP-Prozessierung auf dem amyloidogenen Weg nicht ausschließlich schädliche Effekte hat. Ein möglicher therapeutischer Ansatz sollte die A β -Produktion daher wohl eher modulieren als inhibieren (Chasseigneaux and Allinquant 2012).

2.2.3 Eignung

1998 veröffentlichten das “Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association” und die “National Institute on Aging Working Group” Kriterien dafür, welche Eigenschaften ein idealer Biomarker für die AK aufzuweisen hat. Demnach sollte der Biomarker (1) ein grundlegendes Merkmal des AK-pathophysiologischen Prozesses erkennen, (2) in seiner Genauigkeit durch neuropathologische Untersuchungen bestätigt sein, (3) präzise sein und eine hohe differentialdiagnostische Genauigkeit auch im Frühstadium besitzen, (4) eine hohe Reliabilität haben, (5) nicht invasiv, (6) technisch leicht zu bestimmen und (7) diese Bestimmung kostengünstig sein (Assoc 1998).

Die Punkte (6) und (7) schränken die klinische Anwendung der bildgebenden Verfahren MRT, fMRT, sowie FDG-PET und PiB-PET auf eine breite Masse von Patienten maßgeblich ein. Vor allem fMRT und PET-Untersuchungen sind teuer, zeit- und materialaufwändig und nur an spezialisierten Zentren durchführbar. Außerdem sollte die Strahlenbelastung und damit Invasivität einer PET-Untersuchung nicht außer Acht gelassen werden (5).

Die derzeit gebräuchlichen Liquor-Biomarker erfüllen alle geforderten Kriterien bis auf (5) und (6). Die Gewinnung von Liquor durch eine Lumbalpunktion ist eine für Patienten unangenehme invasive Maßnahme und nicht bei jedem Patienten durchführbar. Kontraindikationen für eine Lumbalpunktion sind unter anderem Blutgerinnungsstörungen, lokale Infektionen und erhöhter intrakranieller Druck. Als Komplikationen können Infektionen, Blutungen und in 9-26% der Fälle (je nach Beschaffenheit der verwendeten Nadel) postspinaler Kopfschmerz auftreten (Wright, Lai et al. 2012).

Neuropsychologische Tests sind zwar keine Biomarker, können aber dennoch als diagnostisches Mittel der AK mit den oben genannten Kriterien validiert werden. So erfüllen sie einige der genannten Kriterien wie (5) und (7), können die Erkrankung jedoch erst erkennen, wenn sie bereits symptomatisch geworden ist. In der Frühphase der MCI-Symptome ist die Abgrenzung der AK von wichtigen Differentialdiagnosen (3) wie der frontotemporalen Demenz allein auf der Basis neuropsychologischer Tests schwierig (Storey, Slavin et al. 2002).

Ein blutbasierter Biomarker, der eine direkte Rolle in der Amyloidkaskade hat, AK-spezifische Veränderungen zeigt und mit einer gängigen Labormethode zu bestimmen ist, würde alle geforderten Voraussetzungen erfüllen. Eine Blutentnahme ist kaum invasiv, kostengünstig, komplikationsarm und meist einfach durchzuführen.

SAPPβ im Liquor hat gegenüber den derzeit gebräuchlichen Liquor-Biomarkern den Vorteil, dass es ein Zwischen- und nicht das Endprodukt auf dem Weg zur Amyloidpathologie darstellt. Veränderungen der Aβ₁₋₄₂-Konzentration spiegeln bereits neurotoxische Amyloidablagerungen wider, TAU und p-TAU schon irreversibel zerstörte Nervenzellen. Konzentrationsänderungen von sAPPβ im Liquor könnten somit Hinweise auf frühere Stadien im AK-pathophysiologischen Prozess liefern, was für eine potentielle ursächliche Behandlung entscheidende Vorteile bringen würde. Was bleibt sind die Nachteile einer Lumbalpunktion.

SAPPβ im Blut erfüllt die Voraussetzungen bezüglich AK-Pathophysiologie (1), Invasivität (5), Durchführbarkeit (6) und Kosten (7) und wäre bei ausreichender diagnostischer Genauigkeit ein annähernd idealer Biomarker zur Früherkennung der AK.

2.2.4 Studienlage

Konzentrationen von sAPPβ im Liquor wurden bereits mehrfach auf ihre Verwertbarkeit als Biomarker für die AK getestet. Die Ergebnisse sind divergent.

So fanden schwedische Studien keine Unterschiede der sAPPβ-Konzentrationen im Liquor von Patienten mit Demenz bei AK, MCI und kognitiv gesunden Kontrollen (Zetterberg, Andreasson et al. 2008, Johansson, Mattsson et al. 2011, Rosen, Andreasson et al. 2012).

Folgende Studien aus Deutschland widersprechen diesen Ergebnissen: Lewczuk et al. stellten signifikant erhöhte Konzentrationen von sAPPβ im Liquor bei Patienten mit Demenz bei AK

im Vergleich zu gesunden Kontrollen fest (Lewczuk, Popp et al. 2012). Die Ergebnisse einer Follow-up Studie von Pernecky et al. sprechen für sAPP β als Biomarker zur Früherkennung der AK. Die Konzentrationen von sAPP β im Liquor waren innerhalb einer Gruppe von Patienten mit MCI bei denjenigen Patienten signifikant erhöht, bei denen die kognitiven Symptome Ausdruck einer prodromalen AK waren, im Gegensatz zu den Patienten, welche in der Folgezeit keine Demenz bei AK entwickelten (Pernecky, Tsolakidou et al. 2011).

Weiterführende Untersuchungen ergaben sowohl eine starke Korrelation der Liquor-Konzentrationen von sAPP β und sAPP α bei Patienten mit Demenz bei AK bzw. MCI, sowie bei gesunden Kontrollprobanden, als auch erniedrigte Konzentrationen von sAPP α/β im Liquor von Patienten mit Demenz bei AK im Vergleich zu Patienten mit MCI. Letzteres Ergebnis wird auf ein Überwiegen potentieller neuroinflammatorischer und zerebrovaskulärer Prozesse in der späten Phase der Erkrankung im Gegensatz zum Überwiegen der Amyloidpathologie im MCI-Stadium zurückgeführt und bestärkt das Potential von sAPP zur Früherkennung der AK. Weitere Ergebnisse waren höhere Liquorkonzentrationen von sAPP α und sAPP β bei weiblichen im Vergleich zu männlichen AK-Patienten, sowie ein fehlender Einfluss des ApoE ϵ 4 Allels auf die Konzentrationen von sAPP α/β (Alexopoulos, Tsolakidou et al. 2012). Zusätzlich konnten Zusammenhänge zwischen der Amyloid- und der TAU-Pathologie des AK-pathophysiologischen Prozesses über Konzentrationen von sAPP β , TAU und löslichem „Sortilin-related Rezeptor“ (SORL1) im Liquor in Korrelations- bzw. Regressionsmodellen gezeigt werden (Alexopoulos, Guo et al. 2012). Eine positive Korrelation der Liquor-Konzentrationen von sAPP β und der Aktivität der β -Sekretase bei Patienten mit Demenz bei wahrscheinlicher AK wurde ebenfalls nachgewiesen und kann durch den Vorgang der enzymatischen APP-Prozessierung (s. 2.1.2) erklärt werden (Tsolakidou, Alexopoulos et al. 2013).

Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit der weiteren Forschung an sAPP β im Liquor als Biomarker für die AK.

Zur Verwendung von sAPP β als blutbasiertem Biomarker für die AK lagen noch keine Daten vor. Lediglich in einer Studie zu schwerem Autismus wurde neben einer Erhöhung der sAPP α - eine verminderte sAPP β -Konzentration im Plasma der Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden gemessen (Ray, Long et al. 2011).

2.3 Zielsetzung

Die Erkennung der AK-Pathologie im frühestmöglichen Stadium ist für die AK-Forschung von entscheidender Bedeutung. Studien zeigen, dass der Biomarker sAPP β den aktuell klinisch eingesetzten Biomarkern A β ₁₋₄₂, TAU und p-TAU in der Früherkennung überlegen sein könnte.

Vor diesem Hintergrund sollten die Möglichkeiten von sAPP β als Biomarker für die AK durch neue Messergebnisse von verschiedenen Seiten beleuchtet werden. Hierzu dienen die Biomaterialien Liquor und Blut.

2.3.1 Qualitätskontrollen

Die Etablierung eines neuen Biomarkers erfordert eine Kontrolle der Qualität der Messungen durch labortechnische Methoden. Die Aussagekraft der Messergebnisse von sAPP β in den verschiedenen Biomaterialien sollte durch diese Methoden bewertet werden.

2.3.2 Lösliches Amyloidvorläuferprotein β im Liquor

Die Ergebnisse aus einer Vorgängerstudie zu löslichem Amyloidvorläuferprotein im Liquor (Pernecky, Tsolakidou et al. 2011) sollten durch die Einbeziehung einer neu rekrutierten, kognitiv gesunden Kontrollgruppe in einen breiteren Kontext gestellt werden. Ermöglicht durch die Nachbestimmung des Biomarkers p-TAU, sollten Kombinationen aus allen derzeit klinisch eingesetzten Liquor-Biomarkern für die AK in Kombination mit sAPP β auf ihre Vorhersagekraft für die Entwicklung einer Demenz bei AK bei vorliegender MCI getestet werden.

2.3.3 Lösliches Amyloidvorläuferprotein β im Blut

Durch den Vergleich von Patienten mit Demenz bei AK mit einer kognitiv gesunden Kontrollgruppe sollte die Eignung von sAPP β als blutbasierter Biomarker bewertet werden. Außerdem sollte gezeigt werden, ob ein Zusammenhang der Konzentrationen von sAPP β im Blut und Liquor besteht.

3 Material und Methoden

3.1 Gesamtkollektiv

Das Gesamtkollektiv setzte sich aus 56 Patienten mit MCI, 31 Patienten mit Demenz bei AK und 30 gesunden Kontrollprobanden zusammen. Für die vorliegende Studie wurden die Patienten und Probanden je nach Diagnose, sowie Verfügbarkeit von Biomaterial und Messergebnissen zum Zeitpunkt 5/2012 in verschiedene Untergruppen aufgeteilt. Die Studie wurde gemäß den Richtlinien der „Deklaration von Helsinki zu ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen“ durchgeführt.

3.1.1 Patienten

Die Gruppe der Patienten mit Demenz bei AK bestand aus 16 Männern und 15 Frauen, die im Zeitraum vom 1.9.2010 bis 16.12.2011 in der psychiatrischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München (MRI) von den behandelnden Ärzten auf kognitive Erkrankungen hin untersucht wurden. Die Rekrutierung der Gruppe von MCI-Patienten (29 Männer und 27 Frauen), deren Selektion nach Ein- und Ausschlusskriterien, Erhebung von Follow-up-Daten und Gruppenzuordnung nach Verlauf sind nicht Teil dieser Arbeit, sondern Gegenstand einer Vorgängerstudie (Perneckzy, Tsolakidou et al. 2011).

Die Diagnosestellung nach ICD 10 einer Demenz bei AK (F00.-*) oder einer leichten kognitiven Störung (F06.7) erfolgte nach Anamnese, körperlicher Untersuchung, psychometrischer Testung, sowie bildgebenden Verfahren und Blutuntersuchung im Labor. Die Blutuntersuchung beinhaltete sowohl Tests auf Differentialdiagnosen, wie zum Beispiel metabolische (z.B. Hypothyreose) oder infektiologische (z.B. Neuroborreliose) Ursachen, als auch eine Bestimmung des ApoE-Genotyps. Bei einem Teil der Patienten wurde zusätzlich eine Lumbalpunktion mit anschließender Liquoruntersuchung auf die AK-Biomarker $A\beta_{1-42}$, TAU und p-TAU durchgeführt.

Alle Patienten unterzeichneten die „Einverständniserklärung zur Aufbewahrung und Analyse entnommener Blut- und Gewebeproben sowie von Datenmaterial aus bildgebenden Untersuchungen des Gehirns zum Zwecke der Diagnostik, der Wissenschaft und der Lehre“.

3.1.2 Kontrollprobanden

Die Gruppe der kognitiv gesunden Kontrollprobanden setzte sich aus Patienten zusammen, die sich am MRI im Zeitraum vom 17.05.2011 bis 12.01.2012 einem chirurgischen Eingriff unterzogen, der in Spinalanästhesie durchgeführt wurde. Die Operationen betrafen orthopädische Erkrankungen der unteren Extremität (z.B. Hallux valgus), sowie urologische Erkrankungen (z.B. transurethrale Resektionen bei Blasentumoren bzw. benigner Prostatahyperplasie).

Hierfür wurden die Patienten vor der Operation über das Wesen und die Bedeutung der Studie sowie über die Freiwilligkeit der Teilnahme ausführlich aufgeklärt. Die Einwilligung zur Anamnese und psychometrischen Testung, zur Entnahme von Blut und Liquor, sowie der Nutzung von Biomaterial für Forschungszwecke erfolgte schriftlich. Die Patienten wurden mittels einer internistischen, neurologischen und psychiatrischen Anamnese, Erhebung demographischer Angaben, sowie psychometrischer Testungen auf die Ein- und Ausschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie getestet.

Einschlusskriterien bei der Rekrutierung waren ein Mindestalter von 50 Jahren sowie internistisch gesunde oder nur leicht in ihrer Leistungsfähigkeit eingeschränkte Patienten gemäß der Klassifikation der American Society of Anesthesiologists (ASA) – Status 1 bis 2 – bei einem elektiven Eingriff.

Ausschlusskriterien waren neurologische oder psychiatrische Begleiterkrankungen, eine transfusionspflichtige Anämie, eine herabgesetzte kognitive Leistungsfähigkeit und eine affektive Begleiterkrankung, sowie ein ASA-Status größer 2.

Die Entnahme von jeweils vier Milliliter Liquor erfolgte nach Punktion des Spinalkanals und unmittelbar vor der Injektion des Anästhetikums zur Spinalanästhesie (Carbostesin 0,5 % isobar), sodass keine zusätzliche Lumbalpunktion nötig war. Die Blutentnahmen erfolgten aus der peripher-venösen Verweilkanüle, welche den Patienten im Rahmen der Narkoseeinleitung gelegt wurde.

3.2 Methoden

3.2.1 Klinische Testverfahren

Kognitive Einschränkungen der Patientengruppe wurden durch die betreuenden Ärzte psychometrisch mittels des Fragebogens des Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease – CERAD (Morris, Mohs et al. 1988), des „Clinical Dementia Rating“ Fragebogens (Hughes, Berg et al. 1982) und des Uhrentests nach Shulman (Shulman 2000) objektiviert.

Der kognitive Status der Kontrollprobanden wurde mit einem Fragebogen zur subjektiven kognitiven Leistungsfähigkeit, Subjective Memory Complaints (Geerlings, Jonker et al. 1999), sowie mit dem Mini-Mental-Status Test – MMST (Folstein, Folstein et al. 1975) beurteilt. Eine relevante affektive Begleiterkrankung wurde mit der Durchführung des „Montgomery-Asberg Depression Rating Scale“ Fragebogens – MADRS (Montgomery and Asberg 1979) ausgeschlossen.

3.2.2 Labordiagnostik

Die Blut- und Liquorproben wurden unmittelbar nach der Entnahme verarbeitet. Je 80 % des entnommenen Liquors wurden zehn Minuten bei 3148 x g zentrifugiert, aliquotiert, zunächst bei -20 °C und zur langfristigen Lagerung bei -80 °C eingefroren. Die restlichen 20 % wurden zur neurologischen Basis-Liquordiagnostik (Zellzahl, Glucose-, Lactat-, Gesamtprotein-, Albumin- und Immunglobulinkonzentrationen) in das Liquorlabor der Neurologischen Klinik und Poliklinik des MRI weitergeleitet. Die Serum- und EDTA-Monovetten wurden je 15 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert und das so gewonnene Serum und Plasma ebenfalls aliquotiert und bei -20 °C bzw. -80 °C eingefroren.

3.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von löslichem Amyloidvorläuferprotein β durch Immunoassay-Verfahren

3.2.2.1.1 Prinzip und Durchführung der Immunoassays

Zur Konzentrationsbestimmung von sAPP β im Liquor und im Plasma wurden die Immunoassays der Firma „Immuno-Biological Laboratories“ (IBL), „Human sAPP β -w (highly sensitive)“ - Assay IP 27732 und „Human sAPP β -w (Wild Type Assay)“ - Assay IP 27722, verwendet.

Hierbei handelt es sich um „sandwich – enzyme linked immunosorbent assays“ (Sandwich-ELISAs). Bei dieser Art der Protein-Konzentrationsbestimmung binden zwei verschiedene Antikörper an unterschiedliche Epitope des zu bestimmenden Proteins. Der erste Antikörper (Capture-Antikörper) fixiert das Protein auf einer Mikrotiterplatte. An den zweiten Antikörper (Detektions-Antikörper) ist ein Enzym gekoppelt. Dieses Enzym bewirkt nach Zugabe eines Chromogens einen Farbumschlag. Mittels Photometrie wird die Absorption von Licht einer definierten Wellenlänge durch den Reaktionsansatz gemessen, aus der die Konzentration des zu bestimmenden Proteins mit Hilfe einer Standardkurve errechnet werden kann.

Der in der vorliegenden Studie verwendete Assay besteht aus folgenden Komponenten:

- Eine 96-Well Mikrotiterplatte, die mit „Anti-Human sAPP β -wild Type Rabbit IgG“ als Capture-Antikörper beschichtet ist
- Der Detektionsantikörper „Anti Human APP (R101A4 bzw. 10D1) Mouse IgG“, an den das Enzym Meerrettichperoxidase (engl: horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt ist
- Der Standard – rekombinantes humanes sAPP β -Wildtyp Protein
- Eine Pufferlösung (EIA Puffer) aus 1 % bovinem serumalbumin (BSA) und 0,05 % Polysorbat 20 (Tween20) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS)
- Tetramethylbenzidin- (TMB) Lösung als Chromogen
- H₂SO₄ Lösung zum Stoppen der Farbreaktion
- Eine Waschlösung (40X) aus 0,05 % Tween20 in Phosphat-Puffer

Zunächst wurde durch serielle Verdünnung des Standards mit EIA-Puffer eine Standardreihe mit den Konzentrationen 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,13 ng/ml, 1,56 ng/ml und 0,78 ng/ml, sowie ein „Test Sample Blank“ aus reinem EIA-Puffer hergestellt. Die zu testenden Plasma- bzw. Liquorproben wurden auf Raumtemperatur gebracht und ebenfalls mit EIA-Puffer verdünnt. Die passende Verdünnung ist von der Art des Biomaterials und dem Messbereich des verwendeten Assays abhängig (s. 4.3.2; 5.3.2). Es wurden je 100 μ l der Standardreihe, des Test Sample Blanks und des verdünnten Biomaterials in die Wells der mit dem Capture-Antikörper beschichteten Mikrotiterplatten pipettiert. Die Platten wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach mehrfachem Waschen wurden je 100 μ l des mit EIA-Puffer verdünnten Detektionsantikörpers in die Wells pipettiert und 30 Minuten bei 4 °C inkubiert.

Die Platten wurden nun wieder gewaschen, worauf die Wells mit je 100 µl des Chromogens TMB versetzt wurden. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit der H₂SO₄ Lösung gestoppt. Alle Inkubationsschritte fanden lichtdicht statt.

Die photometrische Messung bei 450 nm erfolgte mit dem Photometer „FLUOstar Omega, BMG Labtech“; die Berechnung der blank-korrigierten Konzentrationen mit der zugehörigen Software „MARS Data Analysis Software“, Version 2.40.

Alle Arbeitsschritte erfolgten nach Protokoll des Herstellers.

3.2.2.1.2 Wahl des Biomaterials und der passenden Verdünnung

Liquor wurde bereits in einigen Studien als Biomaterial zur Messung von sAPPβ-Konzentrationen verwendet (Pernecky, Tsolakidou et al. 2011).

Für die Messung von sAPPβ im Blut standen Serum und Plasma als mögliche Biomaterialien zur Verfügung. Zur Auswahl des geeigneten Materials wurden von 8 Patienten je Serum- und Plasmakonzentrationen von sAPPβ gemessen, die Ergebnisse analysiert und eine Studienrecherche zu diesem Thema durchgeführt.

Zur Wahl der passenden Verdünnung wurden 8 Proben in unterschiedlich starken Verdünnungen gemessen. Die Ergebnisse der Messungen dieser Proben mit den Verdünnungsfaktoren 0, 2, 4, 5, 8, 10 und 15 wurden miteinander verglichen.

3.2.2.1.3 Qualitätskontrollen

Die Messung von sAPPβ im Liquor mittels Immunoassay war noch wenig etabliert, die Messung im Plasma war neu (5/2012). Zur Kontrolle der Zuverlässigkeit der Messergebnisse wurden daher folgende Qualitätskontrollen zusätzlich zu den vom Hersteller vorgesehenen Kontrollen (Blank und Reinheitskontrolle) durchgeführt:

Die Messung der in der Studie verwendeten Konzentrationen erfolgte in Duplikaten. Zur Sicherung der Reliabilität innerhalb einer Reaktionsplatte wurden auf einer Platte 4 Plasmaproben 7- bzw. 8-fach jeweils mit und ohne Spike aus rekombinantem Protein gemessen.

Zwei Pools aus mehreren Plasma-, bzw. Liquorproben wurden hergestellt und auf jeder Platte gemessen, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von unterschiedlichen Platten zu gewährleisten.

Spikeproben aus rekombinantem Protein mit unterschiedlich hohen, definierten Konzentrationen von sAPP β wurden zu einem Teil der Proben hinzugefügt. Eine ausreichende Wiederfindung dieser Spikes in der Konzentrationsmessung war eine Voraussetzung für die Verwertung der Daten.

Um die Vergleichbarkeit der Immunoassays „Human sAPP β -w (highly sensitive)“ und „Human sAPP β -w (Wild Type Assay)“ zu testen, wurden 5 Liquorproben mit beiden Assays gemessen und die Abweichungen bestimmt.

Die Bedeutung der Präanalytik wurde durch Altern des Biomaterials bei Raumtemperatur über mehrere Tage, sowie durch mehrere Gefrier-Tau-Zyklen des Plasma- bzw. Liquorpools beurteilt.

3.2.2.2 Bestimmung des ApoE-Genotyps mittels Genamplifikation und Gelelektrophorese

Die Genotypisierung setzte sich aus den Teilschritten DNA-Extraktion aus Vollblut, Genamplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR), Restriktionsanalyse des PCR-Produkts, sowie Zuordnung der Bandenmuster zum Genotyp zusammen.

3.2.2.2.1 DNA-Extraktion aus Vollblut

Zum Lysieren der Erythrozyten wurde das EDTA-Blut mit Erythrozyten-Lyse-Puffer (RBC Lysis Solution) versetzt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die im Präzipitat abgesetzten Leukozyten über Nacht in einem Zell-Lyse-Puffer (eng. cell lysis solution, CLS, Qiagen) aufgelöst. CLS lysiert Zellen und RNA und stabilisiert gleichzeitig die vorhandene DNA. Zur Erhöhung der Reinheit der ausgefallenen DNA folgte eine Proteinpräzipitation mit Ammoniumacetat, Ausfällung der DNA in Isopropanol und ein Waschschrift der DNA mit 70 % Ethanol. Zur Aufbewahrung wurde die DNA in „DNA Hydration Solution“ (Qiagen) rekonstituiert.

3.2.2.2 Genamplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR ermöglicht es definierte DNA-Fragmente zu amplifizieren und wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt.

Die Doppelhelix der DNA wird hierfür durch thermische Denaturierung bei 94 °C in ihre 2 Einzelstränge aufgetrennt. Nach Abkühlung auf 55 °C können 2 zuvor hinzugefügte Primer an die Einzelstränge binden. Primer sind Oligonukleotide, die komplementär an einen vorher definierten Abschnitt jeweils eines der DNA-Einzelstränge binden (annealing). Ausgehend von den gebundenen Primern synthetisiert eine thermostabile (Taq-) DNA-Polymerase bei 72 °C die komplementären DNA-Stränge mit den ebenfalls vorher hinzugefügten Desoxyribonukleosid-Triphosphaten in 5'-3' Richtung. Nach erneuter Denaturierung können die Primer an den jeweils neu synthetisierten Gegenstrang binden, der nun ebenfalls von der Taq-Polymerase in 5'-3' Richtung verlängert wird, wodurch DNA-Fragmente in definierter Länge entstehen. Diese werden durch mehrfache Wiederholung des Vorgangs exponentiell vervielfältigt.

Bei der in der Studie durchgeführten Genamplifikation von ApoE wurden Primer aus individueller Kundensynthese (InvitrogenTM), sowie kommerzielle Enzyme und Pufferlösungen (Epicentre® Biotechnologies) verwendet. Die Durchführung der PCR-Reaktionsschritte fand in 96-Well-Platten in einem Thermocycler (Applied biosystemsTM) statt. In 35 Reaktionszyklen wurden die 218 Basenpaare langen PCR-Produkte amplifiziert.

3.2.2.3 Restriktionsanalyse des PCR-Produkts

Das PCR-Produkt wurde im folgenden Schritt mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Diese Enzyme schneiden DNA an jeweils einer genau definierten Stelle. So entstehen bei unterschiedlichen Genotypen durch das Schneiden des betreffenden Genabschnitts mit den gleichen Restriktionsenzymen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Markiert man diese DNA Fragmente mit einem DNA-interkallierenden Farbstoff und lässt sie im Gel durch ein elektrisches Feld wandern, entstehen durch die unterschiedlichen Längen, Molekulargewichte und Ladungseigenschaften der Fragmente Genotyp-spezifische Bandenmuster.

Die Restriktion des ApoE-PCR-Produkts erfolgte nach der Methode von Chapman et al. (Chapman, Estupinan et al. 1996). Es wurden die Restriktionsenzyme Afl III und Hae II (New

England BioLabs® Inc.) verwendet. Für jedes der Enzyme wurde ein separater Reaktionsansatz mit den Komponenten Aqua ad injektibile, BSA, NEB-Puffer (New England BioLabs® Inc.), dem jeweiligen Restriktionsenzym und dem PCR-Produkt angesetzt (Mengen nach Protokoll). Die Restriktionsreaktion erfolgte über Nacht in einem Thermocycler (MWG-Biotech AG) bei 37 °C.

Die so entstandenen DNA-Fragmente wurden im zuvor gegossenen 4 % Mosiv 500 Agarosegel bei 110 Volt im elektrischen Feld über 1,5 Stunden aufgetrennt. Anschließend wurden die mit Ethidiumbromid markierten DNA-Banden auf einem Transilluminator mit UV-Lichtquelle abfotografiert.

3.2.2.2.4 Zuordnung der Bandenmuster zum Genotyp

Das 218 Basenpaare lange PCR-Produkt wurde von den Restriktionsenzymen in unterschiedlich lange Fragmente geschnitten, die nach der Gelelektrophorese spezifischen Banden entsprechen. Auf dem Agarosegel wurden die durch Afl III und Hae II geschnittenen Fragmente einer Person jeweils nebeneinander aufgetragen. So kann aus der Kombination von 2 nebeneinanderliegenden Bandenmustern der Genotyp einer Person bestimmt werden. Bei 2 Allelen pro Person mit je 3 möglichen Polymorphismen ergeben sich 6 mögliche Genotypen. Die Zuordnung der Restriktionsfragmente zu den ApoE-Genotypen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Zuordnung der Restriktionsfragmente zu den ApoE-Genotypen.

ApoE - Genotyp	Afl III	Hae II
$\epsilon 2 / \epsilon 2$	168 + 50	218
$\epsilon 3 / \epsilon 3$	168 + 50	195 (+23)
$\epsilon 4 / \epsilon 4$	218	195 (+23)
$\epsilon 2 / \epsilon 3$	168 + 50	218 + 195 (+23)
$\epsilon 2 / \epsilon 4$	218 + 168 + 50	218 + 195 (+23)
$\epsilon 3 / \epsilon 4$	218 + 168 + 50	195 (+23)

Angegeben ist die Anzahl der Basenpaare der jeweiligen Fragmente.

Abkürzungen: ApoE=Apolipoprotein E; Afl III/ Hae II=Namen der Restriktionsenzyme.

3.2.3 Statistische Datenanalyse

Die statistischen Tests wurden mit der Software PASW® Statistics 18 durchgeführt. P-Werte von $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

Die demographischen und biologischen Variablen der Patienten- und Kontrollgruppen wurden je nach Skalenniveau mit Hilfe eines exakten Tests nach Fischer, eines χ^2 -Tests nach Pearson, eines T-Tests für unabhängige Stichproben bzw. einer Varianzanalyse (ANOVA) miteinander verglichen.

Das genetische Merkmal ApoE-Genotyp wurde für die statistische Auswertung in die beiden Kategorien ApoE $\epsilon 4$ -Allelträger ja bzw. nein dichotomisiert.

Die Prüfung auf Normalverteilung der Variablen innerhalb der einzelnen Gruppen erfolgte mittels Kolmogorov-Smirnov-Test.

Der Vergleich der Konzentrationen von sAPP β im Plasma erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests bei unabhängigen Stichproben, da die Konzentrationen in der Patientengruppe nicht normalverteilt waren.

Einflüsse von Kovariablen auf die Biomarker-Konzentrationen wurden mittels linearer Regression bewertet.

Eine logistische Regression mit den Biomarkern als unabhängige und der Diagnose als abhängige Variable diente der Kombination verschiedener Marker in den Prädiktionsmodellen (s. Tabelle 4). Multikollinearität wurde über die Bestimmung der Varianzinflationsfaktoren (VIF) ausgeschlossen. Die Bestimmung der diagnostischen Maßzahlen erfolgte nach anschließender Receiver Operating Characteristic Analyse (ROC-Analyse) mit den vorhergesagten Wahrscheinlichkeiten als Testvariable und der Diagnose als Zustandsvariable.

4 Ergebnisse

4.1 Qualitätskontrollen

4.1.1 Qualitätskontrollen im Liquor

4.1.1.1 Vergleich der beiden verwendeten Immunoassays

Der Vergleich der Messergebnisse von 5 Liquorproben, von denen sAPP β -Konzentrationen mit beiden verwendeten Assays der Firma IBL gemessen wurden, ist in Tabelle 2 dargestellt. Der neuere Assay, „Human sAPP β -w (highly sensitive)“ maß bei diesen Proben konstant höhere Werte als der Vorgänger, „Human sAPP β -w (Wild Type Assay)“. Die Ergebnisse der beiden Assays wiesen eine hochsignifikante zweiseitige Korrelation nach Pearson auf ($r = 0,97$; $p = 0,006$).

Tabelle 2: Vergleich der Liquor-Messergebnisse der beiden sAPP β -Immunoassays: „Human sAPP β -w (highly sensitive)“ und „Human sAPP β -w (Wild Type Assay)“.

Probe	Immunoassay		Abweichung
	Human sAPP β -w (highly sensitive) sAPP β [ng/ml]	Human sAPP β -w (Wild Type Assay) sAPP β [ng/ml]	
1	1975	1474	- 25,4 %
2	1707	1607	- 5,9 %
3	1717	1590	- 7,4 %
4	426	302	- 29,1 %
5	602	270	- 55,1 %
			Mittlere Abweichung
			- 24,6 ($\pm 20,0$) %

Abkürzungen: sAPP β =lösliches Amyloidvorläuferprotein Beta.

Für die Messungen von sAPP β im Plasma wurde ausschließlich der Assay „Human sAPP β -w (highly sensitive)“ eingesetzt.

4.1.1.2 Altern und Gefrier-Tau-Zyklen von Liquorproben

Sowohl das Altern des Liquorpools über 7 Tage bei Raumtemperatur als auch das fünfmalige Einfrieren der Probe auf -20 °C und Wiederauftauen hatten keinen relevanten Einfluss auf das Messergebnis im Vergleich zur präanalytisch korrekt behandelten Probe desselben Pools. Die Abweichungen lagen hier unter 10 % des erwarteten Wertes, sowohl mit als auch ohne Zugabe eines Spikes von 10 ng/ml rekombinatem Protein.

4.1.1.3 Verdünnung des Liquors

Es wurden 56 Liquorproben in der Verdünnung 1:60 und 20 Proben in der Verdünnung 1:15 gemessen. Die Spikewiederfindung von 10 ng/ml rekombinatem sAPP β lag in jeder verwendeten Verdünnung bei über 85 %. Die mittleren Konzentrationen von sAPP β im Liquor lagen deutlich höher als im Plasma, sodass darauf zu achten war, dass die gemessenen Werte innerhalb der Kalibrationskurve und nicht darüber lagen. Dies war bei der Verdünnung 1:60 bei allen Proben der Fall. Bei der Verdünnung 1:15 lagen 3 der gemessenen Proben oberhalb des Messbereichs. Für diese Proben wurde der höchste Wert, den die Auswertungssoftware extrapolierte als Näherungswert angenommen.

4.1.2 Qualitätskontrollen im Blut

4.1.2.1 Vergleich von Serum und Plasma

Der Vergleich von Serum- und Plasmaproben von jeweils 8 Patienten ergab deutlich abweichende Werte in allen Verdünnungen mit einer mittleren Korrelation nach Pearson, $R = 0,584$ ($p < 0,01$). Die Wiederfindung eines jeder Probe hinzugefügten Spikes von 10 ng/ml rekombinatem sAPP β war im Plasma im Mittel um 56 % besser als im Serum. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Studienrecherche zu diesem Thema wurde Plasma als geeigneteres Biomaterial für die Messung von sAPP β im Blut ausgewählt (s. 5.1.2).

4.1.2.2 Altern und Gefrier-Tau-Zyklen von Plasmaproben

Das Altern des Plasmapools über 7 Tage bei Raumtemperatur hatte eine Erhöhung des Messergebnisses um 43 %, fünf Gefrier-Tau-Zyklen eine Erhöhung des Messergebnisses um 14 % gegenüber der präanalytisch korrekt behandelten Probe desselben Pools zur Folge.

In einem weiteren Alterungsversuch wurde eine EDTA-Monovette mit Vollblut vor dem Zentrifugieren 5 Tage lang bei Raumtemperatur aufbewahrt, während eine andere Monovette

desselben Patienten direkt nach der Blutentnahme zentrifugiert und das Plasma aliquotiert und eingefroren wurde. Das Altern des Vollbluts erhöhte das Messergebnis des anschließend gewonnenen Plasmas im Vergleich zur präanalytisch korrekt behandelten Probe um den Faktor 7. Aufgrund dieser Ergebnisse gingen in die vorliegende Studie nur Plasma-Messergebnisse von Blutproben ein, deren Zentrifugation, Aliquotierung und Einfrieren innerhalb weniger Stunden nach der Blutentnahme erfolgt war.

4.1.2.3 Verdünnung des Plasmas

Bei der Wahl der Verdünnung der Plasmaproben waren zwei limitierende Faktoren zu berücksichtigen: Bei zu starker Verdünnung (Verdünnungsfaktor 15) fiel die Konzentration von sAPP β in einem großen Teil der Proben unter den Messbereich des Assays. Bei zu schwacher Verdünnung (Verdünnungsfaktoren 0, 2, 4, 5, 8) war die Wiederfindung der dem Plasma hinzugefügten Spikeproben aus rekombinantem Protein bei der Messung unzureichend.

Eine 10-fache Verdünnung des Plasmas erwies sich als der bestmöglich zu erzielende Mittelweg zwischen zu niedriger sAPP β -Konzentration und zu geringer Spike-Wiederfindung.

4.1.2.4 Mehrfachmessungen

Innerhalb eines Assays wurden die sAPP β -Konzentrationen von 4 Plasmaproben 7- bzw. 8-fach in der gleichen Verdünnung, jeweils mit und ohne 10 ng/ml rekombinantem sAPP β als Spike gemessen. Die Standardabweichung innerhalb dieser 8 Messreihen betrug in 6 Fällen unter 8% des Mittelwertes der jeweiligen Messreihe, einmal 23 % und einmal 43 %.

4.2 Lösliches Amyloidvorläuferprotein β im Liquor

Drei Gruppen wurden bezüglich ihrer Konzentrationen von sAPP β im Liquor miteinander verglichen: Eine Gruppe setzte sich aus kognitiv gesunden Kontrollprobanden zusammen (NL). Die Vergleichsgruppen von MCI-Patienten mit Follow-up wurden von einer Vorgängerstudie übernommen. Diese Studie zeigte unter anderem eine signifikant geringere Konzentration von sAPP β und TAU im Liquor bei Patienten mit einer leichten kognitiven Störung ohne Progression zu einer Demenz in der Nachuntersuchung (MCI-NAK) im Vergleich zu MCI-Patienten mit Progression zu Demenz bei wahrscheinlicher AK im Follow-up Zeitraum (MCI-AK) (Perneckzy, Tsolakidou et al. 2011). Tabelle 3 zeigt eine Erweiterung

dieser Studie um die Kontrollgruppe und um den AK-Biomarker p-TAU in allen Gruppen. Die 3 Gruppen wurden bezüglich der Merkmale Alter, Geschlecht, Bildungsjahre, ApoE-Genotyp, Follow-up-Zeitraum sowie der Konzentrationen von Amyloid β_{1-42} , TAU, p-TAU und sAPP β im Liquor miteinander verglichen.

Tabelle 3: Merkmalsverteilungen der Gruppen mit Konzentrationsbestimmung von sAPP β im Liquor.

	NL (n = 20)	MCI-NAK (n = 35)	MCI-AK (n = 21)
Alter, Jahre, MW (SD)	63,65 (9,22)	61,91 (7,79)	67,95 (8,81)
Geschlecht, m:w	11:9	20:15	9:12
Bildungsjahre MW (SD)*	15,02 (4,50)	12,46 (3,04)	11,72 (4,32)
ApoE ϵ 4 Träger, ja:nein	5:10 (n=15)	10:18 (n=28)	11:8 (n=19)
Follow-up-Zeitraum, Monate (SD)	-	33,57 (19,55)	33,10 (21,87)
Amyloid β_{1-42} , ng/L, MW (SD)***	1073,80 (211,24)	789,91 (383,12)	622,95 (275,66)
TAU, ng /L, MW (SD)***	193,60 (56,88)	340,2 (203,77)	542,10 (276,66)
p-TAU, ng/L, MW (SD)**	42,10 (14,25)	57,39 (25,96)	84,87 (28,55)
sAPP β , ng/ml, MW (SD)***	623,55 (169,43)	931,88 (399,44)	1200,29 (452,42)

Neu erhobene Daten sind blau hinterlegt. Die weiteren Daten wurden bereits in der Vorgängerstudie erhoben (Perneckzy, Tsolakidou et al. 2011).

Abkürzungen: NL=Kontrollgruppe; MCI-NAK=leichte kognitive Störung ohne Progression zu einer Demenz; MCI-AK=leichte kognitive Störung mit Progression zu einer Demenz bei wahrscheinlicher Alzheimer-Krankheit; p-TAU=an Position 181 phosphoryliertes TAU-Protein; sAPP β =lösliches Amyloidvorläuferprotein Beta.

* Signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der MCI-AK-Gruppe ($p < 0,05$).

** Signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der MCI-NAK-Gruppe ($p < 0,05$) und zwischen der Kontrollgruppe und der MCI-AK-Gruppe ($p < 0,01$).

*** Signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und beiden MCI-Gruppen ($p < 0,01$).

Der Vergleich der Kontrollgruppe mit den beiden MCI-Gruppen ergab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Geschlechterverteilungen (NL/MCI-NAK: $\chi^2 = 0,024$, $p = 0,877$, NL/MCI-AK: $\chi^2 = 0,605$, $p = 0,437$), des Vorliegens eines ApoE ϵ 4-Allels (NL/MCI-NAK: χ^2

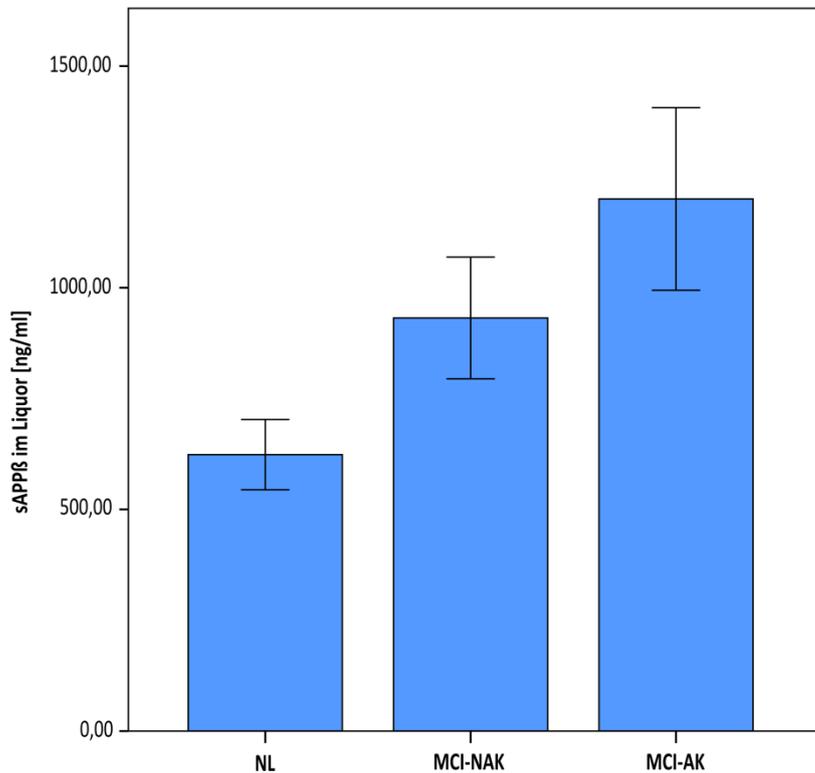
= 0,024, $p = 0,876$, NL/MCI-AK: $\chi^2 = 2,030$, $p = 0,154$) und des mittleren Alters (NL/MCI-NAK: $p = 1,000$, NL/MCI-AK: $p = 0,324$). Die Kontrollgruppe hatte mehr Bildungsjahre als die beiden MCI-Gruppen, wobei dieser Unterschied lediglich für die MCI-AK-Gruppe signifikant wurde (NL/MCI-NAK: $p = 0,094$, NL/MCI-AK: $p = 0,035$).

Die Konzentrationen der herkömmlichen AK-Biomarker lagen in der Kontrollgruppe in den erwarteten Bereichen für $A\beta_{1-42}$ und TAU (Hulstaert, Blennow et al. 1999), sowie für p-TAU (Koopman, Le Bastard et al. 2009).

Die mittleren Konzentrationen von sAPP β , TAU und p-TAU im Liquor waren in der Kontrollgruppe signifikant niedriger als in der MCI-NAK-Gruppe (sAPP β : $p < 0,01$, TAU: $p < 0,01$, p-TAU: $p < 0,05$), und hochsignifikant niedriger als in der MCI-AK-Gruppe (sAPP β , TAU, p-TAU: $p < 0,001$). Die Konzentrationen von $A\beta_{1-42}$ waren in der Kontrollgruppe höher als in den MCI-Gruppen (NL/MCI-NAK: $p < 0,01$, NL/MCI-AK: $p < 0,001$).

Die Verteilungen von sAPP β im Liquor in den 3 Gruppen sind in Abbildung 3 dargestellt.

Abbildung 3: Säulendiagramm der sAPP β -Konzentrationen im Liquor.



MCI-NAK und MCI-AK wurden bereits in der Vorgängerstudie erhoben (Pernecky, Tsolakidou et al. 2011). Dargestellt sind die Mittelwerte und 95 % Konfidenzintervalle.

Abkürzungen: NL=Kontrollgruppe, MCI-NAK=leichte kognitive Störung ohne Progression zu einer Demenz; MCI-AK=leichte kognitive Störung mit Progression zu einer Demenz bei wahrscheinlicher Alzheimer-Krankheit; sAPP β =lösliches Amyloidvorläuferprotein Beta.

Ein signifikanter Einfluss der Variablen Alter, Geschlecht, Bildungsjahre und ApoE-Genotyp auf die Konzentrationen von sAPP β im Liquor in der Kontrollgruppe sowie auf p-TAU in allen Gruppen konnte mittels linearer Regression ausgeschlossen werden.

Mit Hilfe einer logistischen Regression (Einschlussmethode) und anschließender ROC-Analyse wurden zwei verschiedene Biomarker-Kombinationen auf ihre Vorhersagewahrscheinlichkeiten bezüglich der Progression von vorliegender MCI zu Demenz bei wahrscheinlicher AK miteinander verglichen. Beide Gruppen beinhalteten die Variable Alter, sowie jeweils einen Marker der Amyloid-Pathologie und des neurodegenerativen

Prozesses. Das konventionelle Modell beinhaltete $A\beta_{1-42}$ für Amyloid-Pathologie und TAU für Neurodegeneration. Zum Vergleich wurde eine neue Biomarker-Kombination mit sAPP β für Amyloid-Pathologie und p-TAU für Neurodegeneration vorgeschlagen. Die diagnostischen Maßzahlen sind in Tabelle 4 dargestellt. Kombinationen von TAU- mit p-TAU-Konzentrationen innerhalb eines Modells wurden aufgrund von Multikollinearität (VIF > 4) ausgeschlossen.

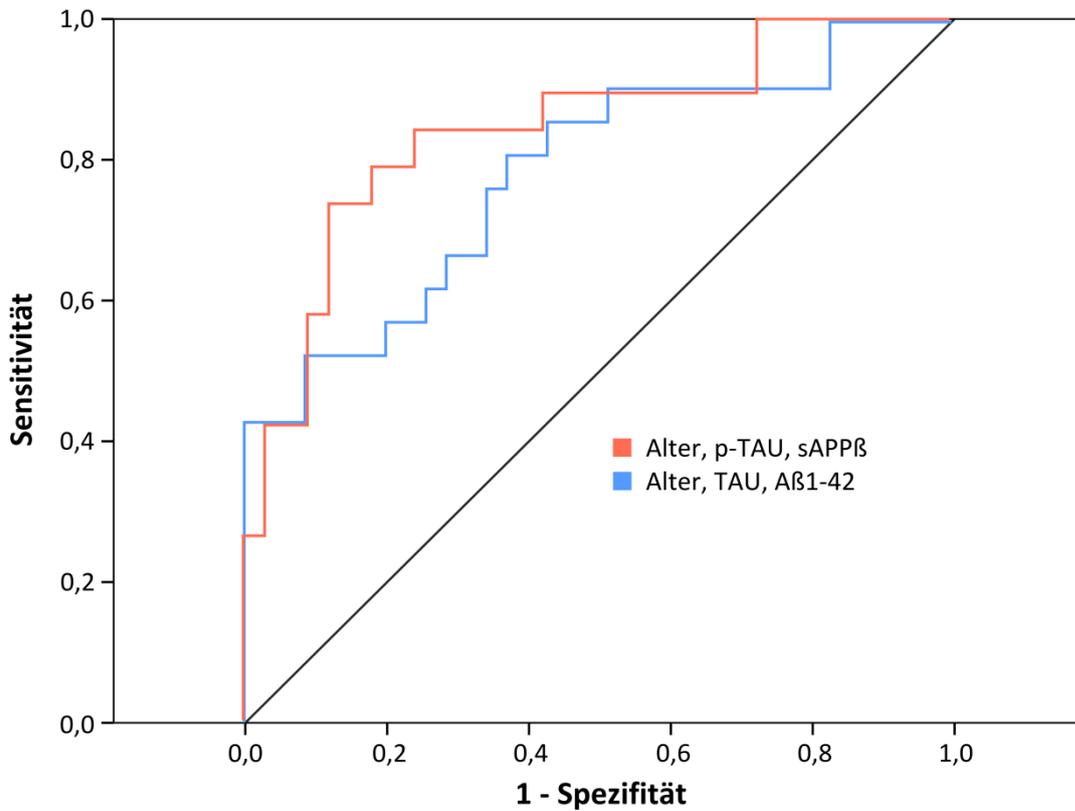
Tabelle 4: Diagnostische Maßzahlen der Biomarker-Kombinationen bezüglich der Prädiktion von Progredienz einer leichten kognitiven Störung zu Demenz bei wahrscheinlicher Alzheimer-Krankheit unter Berücksichtigung des Alters der Patienten.

	Alter, $A\beta_{1-42}$, TAU	Alter, sAPP β , p-TAU
ROC AUC	0,782	0,841
Genauigkeit [%]	69,6	78,9
Sensitivität [%]	76,2	84,2
Spezifität [%]	65,7	75,8
Positiver Vorhersagewert [%]	57,1	66,7
Negativer Vorhersagewert [%]	82,1	89,3

Abkürzungen: $A\beta_{1-42}$ =Amyloid β_{1-42} ; p-TAU=an Position 181 phosphoryliertes TAU-Protein; sAPP β =lösliches Amyloidvorläuferprotein Beta; ROC AUC=Fläche unter der Receiver Operating Characteristic-Kurve.

Die neue Kombination von Alter, p-TAU und sAPP β zeigte eine Verbesserung aller diagnostischer Maßzahlen im Vergleich zum konventionellen Modell. Der Austausch des Amyloid-Markers $A\beta_{1-42}$ durch sAPP β trug mehr zur Verbesserung der Prädiktion bei, als der Austausch des Neurodegenerationsmarkers TAU durch p-TAU (nicht gezeigt). Abbildung 4 zeigt die ROC-Kurven der beiden Prädiktionsmodelle.

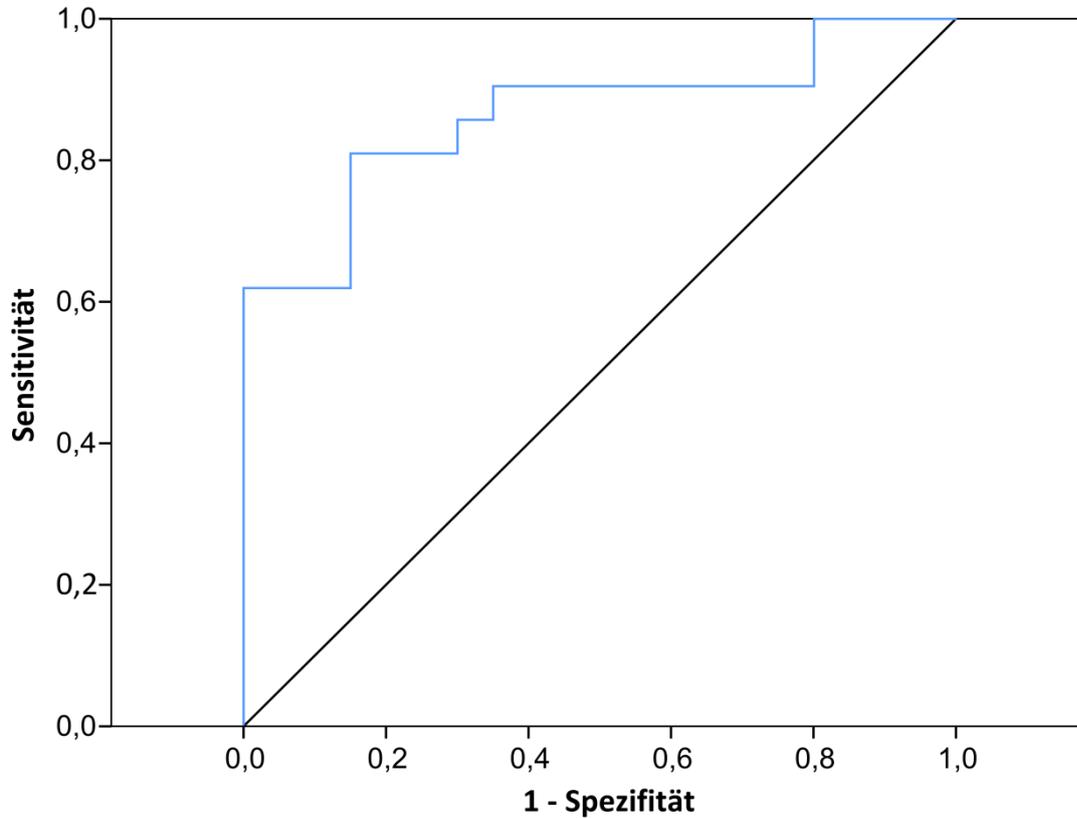
Abbildung 4: ROC-Kurven der Biomarker-Kombinationen bezüglich der Prädiktion von Progredienz einer leichten kognitiven Störung zu Demenz bei wahrscheinlicher Alzheimer-Krankheit unter Berücksichtigung des Alters der Patienten.



Abkürzungen: $A\beta_{1-42}$ = Amyloid β_{1-42} ; sAPP β = lösliches Amyloidvorläuferprotein Beta; p-TAU = an Position 181 phosphoryliertes TAU-Protein

Des Weiteren war eine deutliche Differenzierung der gesunden Kontrollgruppe von der MCI-AK-Gruppe durch sAPP β möglich, mit einer Sensitivität von 81 % und eine Spezifität von 85 %. Abbildung 5 zeigt die dazugehörige ROC-Kurve.

Abbildung 5: ROC-Kurve der Differenzierung der kognitiv gesunden Kontrollgruppe von der Gruppe mit einer leichten kognitiven Störung mit Progression zu Demenz bei wahrscheinlicher Alzheimer-Krankheit durch lösliches Amyloidvorläuferprotein Beta im Liquor als Testvariable.



4.3 Lösliches Amyloidvorläuferprotein β im Blut

Es wurden zwei Gruppen bezüglich ihrer Konzentrationen von sAPP β im Blutplasma miteinander verglichen – eine Gruppe mit klinisch diagnostizierter Demenz bei wahrscheinlicher AK und eine kognitiv gesunde Kontrollgruppe. Die Ausprägungen der Merkmale Alter, Geschlecht, Bildungsjahre, ApoE-Genotyp und Konzentrationen von sAPP β im Plasma innerhalb der Gruppen sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Merkmalsverteilungen der Gruppen mit Konzentrationsbestimmung von sAPP β im Plasma.

	NL (n = 30)	AK (n = 31)
Alter, Jahre (SD)*	65,30 (9,25)	70,39 (9,61)
Geschlecht, m:w	19:11	16:15
Bildungsjahre (SD)	14,68 (4,30)	12,60 (3,45)
ApoE ϵ 4 Träger, ja:nein	9:12 (n = 21)	8:9 (n = 17)
Plasma-sAPP β , ng/ml, Median (IQR)*	4,04 (5,35)	1,77 (4,59)

Abkürzungen: NL=Kontrollgruppe; AK=Demenz bei wahrscheinlicher Alzheimer-Krankheit; sAPP β =lösliches Amyloidvorläuferprotein Beta; IQR=Interquartilsabstand.

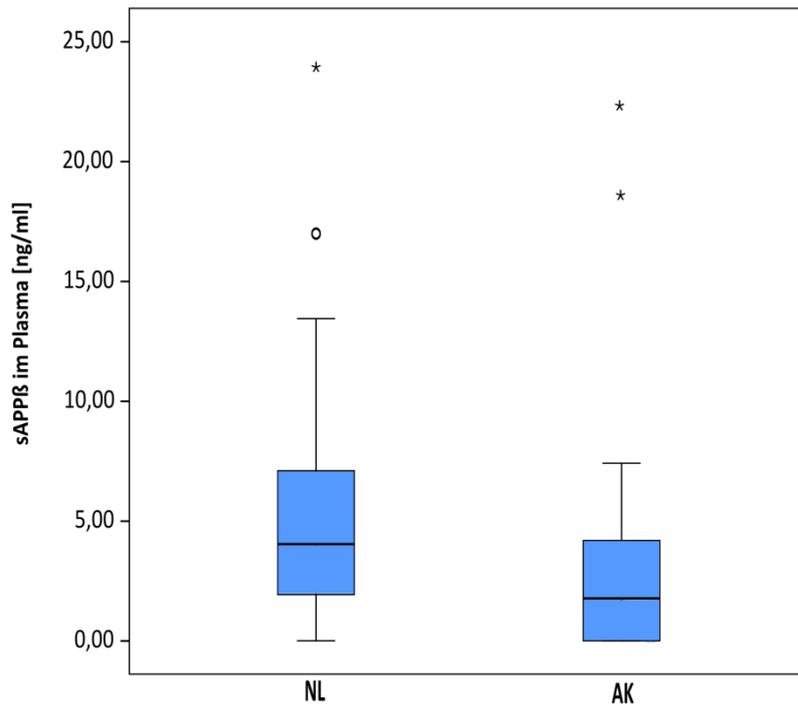
* Signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der AK Gruppe ($p < 0,05$).

Der Vergleich der Kontrollgruppe mit der AK-Gruppe ergab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Geschlechterverteilung ($\chi^2 = 0,856$, $p = 0,355$), der Bildungsjahre ($p = 0,056$) und des Vorliegens eines ApoE ϵ 4-Allels ($\chi^2 = 0,067$ $p = 0,796$). Die Kontrollgruppe war jünger als die AK-Gruppe ($p = 0,040$).

Die mittlere Konzentration von sAPP β im Plasma war in der AK-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt ($p < 0,05$).

Die Verteilungen der Konzentrationen von sAPP β im Plasma sind in Abbildung 6 dargestellt.

Abbildung 6: Boxplots der sAPP β -Konzentrationen im Plasma.

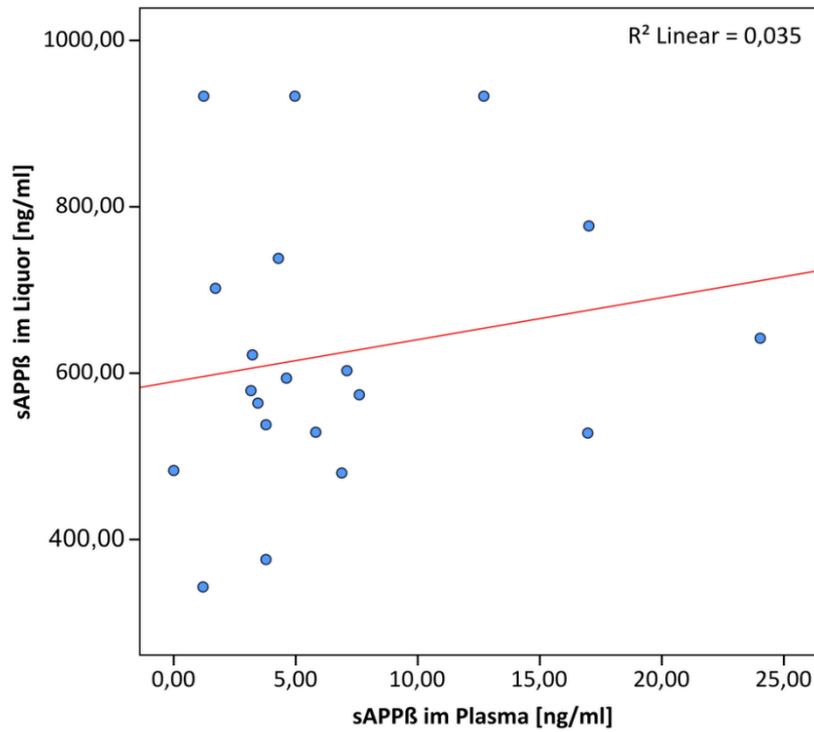


Abkürzungen: NL=Kontrollgruppe; AK=Demenz bei wahrscheinlicher Alzheimer-Krankheit; sAPP β =lösliches Amyloidvorläuferprotein Beta.

Ein signifikanter Einfluss der Variablen Alter, Geschlecht, Bildungsjahre und ApoE-Genotyp auf die Konzentrationen von sAPP β im Plasma in beiden Gruppen konnte mittels linearer Regression ausgeschlossen werden.

Bei 20 kognitiv gesunden Probanden wurden die Konzentrationen von sAPP β sowohl im Liquor als auch im Plasma gemessen. Eine Korrelation der Konzentrationen nach Pearson ergab kein signifikantes Ergebnis ($R = 0,187$, $p = 0,431$). Die Liquor- und Plasmakonzentrationen sind in Abbildung 7 gegeneinander aufgetragen.

Abbildung 7: Streudiagramm der Konzentrationen von sAPP β im Liquor und Plasma von 20 kognitiv gesunden Probanden.



Abkürzungen: sAPP β =lösliches Amyloidvorläuferprotein Beta; R²=Bestimmtheitsmaß der Korrelation.

5 Diskussion

5.1 Qualitätskontrollen und generelle Einschränkungen

Messungen von sAPP β im Liquor und Blutplasma sind wenig etablierte Verfahren, weshalb die Aussagekraft der Ergebnisse durch labortechnische Qualitätskontrollen bewertet wurde.

5.1.1 Qualitätskontrollen im Liquor

Der Vergleich der beiden verwendeten Immunoassays ergab geringere gemessene Konzentrationen von sAPP β im Liquor durch den älteren Immunoassay „Human sAPP β -w (Wild Type Assay)“ im Vergleich zu dem neueren Assay „Human sAPP β -w (highly sensitive)“, bei einer signifikanten Korrelation zwischen den beiden Assays. Da lediglich die sAPP β -Liquorkonzentrationen der Kontrollgruppe mit dem neueren Assay gemessen wurden und diese dennoch signifikant geringer sind als die der MCI-Gruppe, könnte der tatsächliche Unterschied der Konzentrationen noch deutlicher sein, als es die Ergebnisse der vorliegenden Studie implizieren.

Der nicht vorhandene Einfluss von Altern und Gefrier-Tau-Zyklen auf die gemessene Konzentration von sAPP β im Liquor unterstreicht die Wertigkeit und Stabilität dieses Biomaterials für die Messung von sAPP β , was die Präanalytik erleichtert und damit Vorteile für den klinischen Alltag mit sich bringt.

In allen verwendeten Verdünnungen wurde die Qualität der Messergebnisse durch Zusatzkontrollen mit Spikes aus rekombinantem Protein bestätigt.

5.1.2 Qualitätskontrollen im Blut

Da sAPP β -Konzentrationen im Blut bisher noch kaum bestimmt wurden, war ein Vergleich von Serum und Plasma bezüglich der Eignung zur sAPP β -Konzentrationsbestimmung mit Immunoassays notwendig.

Enzymaktivitäten vieler Enzyme sind im Serum im Vergleich zum Plasma erhöht, was durch Freisetzung der Enzyme aus Blutzellen bei der Gerinnung bedingt ist (Solbach, Englhardt et al. 1962). Die geringere Spike-Wiederfindung im Serum im Vergleich zum Plasma ist daher möglicherweise auf einen verstärkten enzymatischen Abbau von sAPP β im Serum zurückzuführen. Des Weiteren werden bei der Koagulation des Blutes in der Serum-Monovette A β und sAPP β aus Thrombozyten freigesetzt (Li, Whyte et al. 1998). Diese

Erkenntnisse sprechen dafür, dass die Konzentrationen von sAPP β im Plasma eher der Situation *in vivo* entsprechen als die im Serum, weshalb Plasma und nicht Serum für die Blutuntersuchungen verwendet wurde.

Sowohl Altern von Plasma und Vollblut als auch Gefrier-Tau-Zyklen von Plasma führten zu erhöhten Messergebnissen im Vergleich zur präanalytisch korrekt behandelten Probe. Diese Abweichung war für das 5 Tage lang bei Raumtemperatur bis zur eintretenden Hämolyse gealterte EDTA Blut mit einem 7-fach erhöhten Messwert besonders auffällig. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint es unbedingt notwendig nur präanalytisch saubere und vergleichbare Proben für die Messung von sAPP β im Plasma zu verwenden (s. 3.2.2).

Bei der Wahl der Verdünnung sollte ein Mittelweg zwischen Konzentrationen unterhalb des Messbereichs des Immunoassays bei zu starker - und einer zu geringen Spike-Wiederfindung bei zu schwacher Verdünnung gewählt werden. Die mangelhafte Wiederfindung des Spikes einer definierten Konzentration aus rekombinantem sAPP β bei zu schwacher Verdünnung (s. 4.1.2.1) ist vermutlich auf plasmaspezifische Störfaktoren wie zum Beispiel Fibrinogen und andere maskierende Substanzen zurückzuführen.

5.1.3 Generelle Einschränkungen

Generelle Einschränkungen der Studie beinhalten die Rekrutierung der Patienten und Probanden an einem Universitätsklinikum, eine limitierte Stichprobenzahl, sowie eine fehlende histopathologische Verifizierung des AK-Befundes in der Patientengruppe.

5.2 Lösliches Amyloidvorläuferprotein β im Liquor

Die Vergleiche der Liquorkonzentrationen von sAPP β in den Patienten- und Kontrollgruppen ergaben eine deutliche Differenzierung der kognitiv gesunden Kontrollprobanden von Patienten mit prodromaler AK durch sAPP β . Eine Verbesserung der Vorhersage einer dementiellen Entwicklung in einer MCI Gruppe konnte durch den Einsatz der Biomarker p-TAU und sAPP β im Vergleich zu TAU und A β_{1-42} erreicht werden.

Diese Daten unterstützen die Annahme, dass sAPP β im Liquor als Biomarker zur Früherkennung der AK geeignet ist.

Damit sind die Resultate in einer Reihe mit den bisherigen Ergebnissen deutscher Forschungsgruppen zu diesem Thema (Pernecky, Tsolakidou et al. 2011, Lewczuk, Popp et

al. 2012) und widersprüchlich gegenüber den Ergebnissen aus Schweden (Zetterberg, Andreasson et al. 2008, Johansson, Mattsson et al. 2011, Rosen, Andreasson et al. 2012). Direkte Vergleiche mit letzteren Studien sind jedoch aufgrund von unterschiedlicher Messmethodik (z.B. ELISA vs. Multiplex Assay) nur eingeschränkt aussagekräftig.

Bereits sAPP β alleine trennte gesunde Kontrollprobanden von MCI-Patienten mit prodromaler AK mit einer Sensitivität und Spezifität von über 80 % und erfüllte damit die geforderte diagnostische Genauigkeit der Biomarker-Kriterien von 1998 (Assoc 1998).

Die Genauigkeit aller diagnostischen Maßzahlen wurde durch die Kombination von Alter, sAPP β und p-TAU im Vergleich zur Kombination aus Alter, A β_{1-42} und TAU in Bezug auf die AK-Prädiktion bei vorliegender MCI erhöht. Im Vergleich zu der 2011 veröffentlichten Kombination aus Alter, A β_{1-42} , sAPP β und TAU erreichte das Modell mit sAPP β und p-TAU eine höhere Sensitivität (84,2 % vs. 81 %) bei geringerer Spezifität (75,8 % vs. 80 %) (Pernecky, Tsolakidou et al. 2011).

Im Gegensatz zu sAPP β waren Konzentrationen von A β_{1-42} bei Patienten mit AK im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden nicht erhöht, sondern erniedrigt. Als Erklärung hierfür wird eine verstärkte Ablagerung von A β_{1-42} im erkrankten Gehirn und damit eine geringere Ausscheidung in den Liquor angenommen (Blennow, Hampel et al. 2010). Die signifikant höheren Konzentrationen von sAPP β im Liquor bei MCI-Patienten mit prodromaler AK im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden erscheinen dennoch unter der Annahme einer verstärkten Amyloidogenese als initialem Schritt des AK-pathophysiologischen Prozesses plausibel, da es als lösliches Protein frei in den Liquor diffundieren kann. Verringerte Konzentrationen von sAPP β in post mortem untersuchten AK-Cortices im Vergleich zu denen gesunder Kontrollprobanden sprechen gegen die Aggregation von sAPP β im Gehirn und für eine freie Ausscheidung des Proteins in den Liquor (Wu, Sankaranarayanan et al. 2011).

Im Vergleich der Biomarker-Kombinationen trug der Austausch von A β_{1-42} durch sAPP β stärker zur Verbesserung des Modells bei, als der Austausch von TAU durch p-TAU. Der entscheidende Vorteil von sAPP β gegenüber anderen Liquor-Biomarkern liegt in der frühen Position des Proteins in der Amyloidkaskade (s. Abb. 1). Im Gegensatz zu deren neurotoxischem Endprodukt A β_{1-42} sowie den Neurodegenerationsmarkern TAU und p-TAU,

spiegelt sAPP β ein Stadium der Pathologie der AK wider, das zeitlich vor dem Nervenzelluntergang einzuordnen ist. Diese Tatsachen legen die Vermutung nahe, dass Veränderungen der Konzentrationen von sAPP β im Liquor bereits zu einem Zeitpunkt nachzuweisen sind, an dem eine potentiell ursächliche Therapie ansetzen und die AK-Neurodegeneration verlangsamen oder sogar aufhalten könnte.

5.3 Lösliches Amyloidvorläuferprotein β im Blut

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten geben erste Hinweise auf eine mögliche Verwertbarkeit von sAPP β als blutbasiertem Biomarker zur Diagnostik der AK. Es sind die ersten vorliegenden Ergebnisse zu sAPP β als blutbasiertem Biomarker für die AK (Datenauswertung 5/2012).

Anders als im Liquor fanden sich im Plasma von Patienten mit Demenz bei wahrscheinlicher AK im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden signifikant geringere sAPP β -Konzentrationen.

Das Wissen über die Transportvorgänge von sAPP β über die Blut-Hirn Schranke spielt für das Verständnis dieses Ergebnisses eine wichtige Rolle. Aktuell wird diskutiert, dass eine gestörte Amyloidausscheidung über die Blut-Hirn-Schranke eine wichtige Komponente der Akkumulation von A β in AK-erkrankten Gehirnen darstellen könnte (Mawuenyega, Sigurdson et al. 2010). Ebenso könnten pathologisch veränderte Transportmechanismen der Blut-Hirn-Schranke eine Verringerung der Plasma-sAPP β -Konzentrationen der AK-Patienten erklären. Welche Kanäle oder Transporter die Ausscheidung von sAPP β aus dem Gehirn über die Blut-Hirn-Schranke ermöglichen ist jedoch bisher noch unklar, und sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

Weitere mögliche Ursachen für die erniedrigte Plasma-sAPP β -Konzentration in der Patientengruppe sind geringere Expression von APP, verringerte enzymatische Spaltung von sAPP β aus APP, oder ein verstärkter sAPP β -Abbau. Diese Möglichkeiten erscheinen jedoch mit der Annahme der Amyloid-Hypothese weniger gut vereinbar, als eine veränderte Ausscheidung über die Blut-Hirn-Schranke.

Der hier berichteten Verringerung der sAPP β -Konzentration im Blut bei AK-Patienten steht das Resultat einer Studie entgegen, in der eine um 17 % erhöhte Aktivität der β -Sekretase in

Membranen lysierter Thrombozyten bei AK-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen festgestellt wurde (Johnston, Liu et al. 2008). Dieses Ergebnis ließe als Konsequenz eine erhöhte statt erniedrigte sAPP β -Konzentration im Blut der Patientengruppe vermuten. Allerdings enthält Blutplasma keine Thrombozyten, da diese bei der Gewinnung des Plasmas zusammen mit anderen zellulären Blutbestandteilen ohne das Auftreten von Hämolyse abzentrifugiert werden. Ein Rückschluss von der Aktivität thrombozytärer β -Sekretase auf sAPP β -Konzentrationen im Plasma ist daher nur eingeschränkt möglich.

Unklarheiten liegen außerdem in der Größe der Fraktion des an Plasmaproteine gebundenem sAPP β und der Unterscheidung von neuronalen und nicht-neuronalen sAPP β -Isoformen. Die letztere Fragestellung könnte mit Hilfe eines labortechnischen Verfahrens angegangen werden, welches die Kunitz-Protease-Inhibitor Sequenz (s. Abb. 2) auf dem sAPP Molekül erkennt, da sich diese ausschließlich auf nicht-neuronalem sAPP befindet (Chasseigneaux and Allinquant 2012).

Bei der Interpretation des Ergebnisses von sAPP β im Blut sollte außerdem das geringere Alter der gesunden Kontrollgruppe im Vergleich zur Patientengruppe beachtet werden. Allerdings ergab die durchgeführte Regression keinen Einfluss der Variable Alter auf die Plasmakonzentration von sAPP β .

Ebenso keinen Einfluss auf die Plasma- und Liquorkonzentrationen von sAPP β hatte in allen Gruppen der ApoE-Genotyp. Dieses Ergebnis deckt sich mit früheren Befunden und lässt vermuten, dass der Einfluss von ApoE ϵ 4 auf die AK-Pathologie nicht über eine Modifizierung der sAPP-Proteolyse, sondern über alternative Mechanismen erfolgt (Alexopoulos, Tsolakidou et al. 2012).

Über die Ursachen der nicht vorhandenen Korrelation der Plasma- und Liquor-sAPP β -Konzentrationen bei kognitiv gesunden Probanden kann nur spekuliert werden. Für das tiefere Verständnis dieses Ergebnisses werden ebenfalls genauere Erkenntnisse über die Sekretionsmechanismen von sAPP β sowohl in den Liquor als auch über die Blut-Hirn-Schranke, sowie über die Plasmaproteinbindung von sAPP β durch weiterführende Studien benötigt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die vorliegenden Ergebnisse trotz vieler offener Fragen deutlich darauf hinweisen, dass sAPP β im Plasma als Biomarker zur Erkennung der AK geeignet sein könnte. Aufgrund der im Vergleich zur Lumbalpunktion einfachen und komplikationsarmen Blutentnahme, sowie der im Vergleich zu bildgebenden Verfahren Zeit und Kosten sparenden Laboruntersuchung mittels ELISA Technik würde sich eine solche Untersuchung als potentiell Screening-Verfahren anbieten.

6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise darauf, dass sAPP β in Liquor und Blut als Biomarker der AK geeignet sein könnte. Um diese Annahme zu bestätigen ist es notwendig, die Replizierbarkeit der Ergebnisse in weiteren Stichproben zu testen. Weiterführende Studien sollten deshalb die Messung von sAPP β in Plasma und Liquor bei kognitiv gesunden älteren Menschen, MCI-Patienten, AK-Patienten sowie aus anderen Ursachen dementiell Erkrankten mit Follow-up der Laborchemie und Klinik in möglichst großen multizentrischen Stichproben beinhalten. Zirkadiane Konzentrationsunterschiede von sAPP β , die Korrelation von sAPP β -Konzentrationen mit nicht-laborchemischen diagnostischen Mitteln wie MRT, FDG-PET, kognitiven Tests etc., sowie Änderungen der Konzentrationen im klinischen Verlauf der AK müssten ebenfalls untersucht werden. Durch die Kombination dieser Untersuchungsergebnisse sollte gezeigt werden, inwieweit sich die diagnostischen Verfahren gegenseitig ergänzen oder gegebenenfalls widersprechen. Bei entsprechenden Ergebnissen könnte schließlich die Wertigkeit von sAPP β als Marker für klinische Arzneimittelprüfungen getestet und Implikationen für kausale Therapieansätze abgeleitet werden.

Für weitere Messungen von sAPP β im Blut sollte der hierfür eingesetzte ELISA bezüglich seines Messbereichs, sowie der Trennung von neuronalem und nichtneuronalem sAPP β optimiert werden. Hierfür ist eine Zusammenarbeit mit den jeweiligen Biotechnologiefirmen notwendig.

Sollte die Überlegenheit von sAPP β , oder einer Kombination von sAPP β mit anderen diagnostischen Mitteln gegenüber den aktuellen Verfahren in den oben genannten Untersuchungen bestätigt werden, wäre die internationale Etablierung und Vermarktung des Testverfahrens der nächste Schritt. Im Idealfall einer ausreichenden Genauigkeit als AK-Prädiktor in der präklinischen Phase und dem Vorhandensein einer kausalen Therapie könnten mit dem entsprechenden Test erste AK-Screening-Verfahren durchgeführt werden.

7 Verzeichnis der Abkürzungen

A β	Amyloid Beta
AK	Alzheimer-Krankheit
AFL III	Restriktionsenzym für ApoE Genotypisierung
ANOVA	Varianzanalyse
APLP2	APP-like Protein 2
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloidvorläuferprotein (engl. amyloid precursor protein)
ASA	American Society of Anesthesiologists
BSA	Bovines Serumalbumin
CDR	Demenz-Testung: Clinical Dementia Rating
CERAD	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung
CLS	Zell-Lyse-Puffer (engl. cell lysis solution)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
fMRT	Funktionelle Magnetresonanztomographie
Hae II	Restriktionsenzym für ApoE Genotypisierung
HRP	Meerrettichperoxidase (engl: horseradish peroxidase)
IBL	Immuno-Biological Laboratories
ICD 10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Version
MADRS	Montgomery-Asberg Depression Rating Scale
MCI	Leichte kognitive Störung (engl. mild cognitive impairment)
MCI-AK	Leichte kognitive Störung mit Progression zu Demenz bei wahrscheinlicher Alzheimer-Krankheit im Follow-up Zeitraum.
MCI-NAK	Leichte kognitive Störung ohne Progression zu einer Demenz im Follow-up Zeitraum.
MMST	Mini-Mental-Status Test
MRI	Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
MR-proANP	Mittelregionales pro-atriales natriuretisches Peptid
MRT	Magnetresonanztomographie

NINCDS-ADRDA	National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
NL	Kognitiv gesunde Kontrollprobanden
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PBS	Phosphatgepufferter Salzlösung
p-TAU	An Position Thr181 phosphoryliertes TAU-Protein
PET/ FDG-PET/ PiB-PET	Positronen-Emissions-Tomographie/ mit Radiopharmakon [¹⁸ F]-Fluordesoxyglucose/ bzw. [¹¹ C]-Pittsburgh compound B
ROC Analyse	Receiver Operating Characteristic Analyse
ROC AUC	Fläche unter der Receiver Operating Characteristic Kurve
sAPP α/β	Lösliches Amyloidvorläuferprotein alpha/beta (engl. soluble amyloid precursor protein alpha/beta)
SORL1	Sortilin-related Rezeptor 1
TMB	Tetramethylbenzidin
TAU	Gesamt-TAU-Protein
VIF	Varianzinflationsfaktor

8 Verzeichnis der Abbildungen

- Abbildung 1 Die enzymatische Prozessierung des Amyloidvorläuferproteins.
- Abbildung 2 Schematische Darstellung der funktionellen Struktur von sAPP β .
- Abbildung 3 Säulendiagramm der sAPP β -Konzentrationen im Liquor.
- Abbildung 4 ROC-Kurven der Biomarker-Kombinationen bezüglich der Prädiktion von Progredienz einer leichten kognitiven Störung zu Demenz bei wahrscheinlicher Alzheimer-Krankheit unter Berücksichtigung des Alters der Patienten.
- Abbildung 5 ROC-Kurve der Differenzierung der kognitiv gesunden Kontrollgruppe von der Gruppe mit einer leichten kognitiven Störung mit Progression zu Demenz bei wahrscheinlicher Alzheimer-Krankheit durch lösliches Amyloidvorläuferprotein Beta im Liquor als Testvariable.
- Abbildung 6 Boxplots der sAPP β -Konzentrationen im Plasma.
- Abbildung 7 Streudiagramm der Konzentrationen von sAPP β im Liquor und Plasma von 20 kognitiv gesunden Probanden.

9 Literaturverzeichnis

- Albert, M. S., S. T. DeKosky, D. Dickson, B. Dubois, H. H. Feldman, N. C. Fox, A. Gamst, D. M. Holtzman, W. J. Jagust, R. C. Petersen, P. J. Snyder, M. C. Carrillo, B. Thies and C. H. Phelps (2011). "The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **7**(3): 270-279.
- Alexopoulos, P., L. H. Guo, A. Tsolakidou, M. Kratzer, T. Grimmer, C. Westerteicher, M. Jiang, H. Bujo, J. Diehl-Schmid, A. Kurz and R. Perneczky (2012). "Interrelations between CSF soluble AbetaPPbeta, amyloid-beta 1-42, SORL1, and tau levels in Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **28**(3): 543-552.
- Alexopoulos, P., A. Tsolakidou, F. Roselli, A. Arnold, T. Grimmer, C. Westerteicher, M. R. Leante, H. Forstl, P. Livrea, A. Kurz and R. Perneczky (2012). "Clinical and neurobiological correlates of soluble amyloid precursor proteins in the cerebrospinal fluid." Alzheimers Dement **8**(4): 304-311.
- Assoc, A. (1998). "Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease"." Neurobiol Aging **19**(2): 109-116.
- Barger, S. W. and A. D. Harmon (1997). "Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E." Nature **388**(6645): 878-881.
- Behr, D., J. D. Wrigley, A. P. Owens and M. S. Shearman (2002). "Generation of C-terminally truncated amyloid-beta peptides is dependent on gamma-secretase activity." J Neurochem **82**(3): 563-575.
- Bickel, H. (2000). "[Dementia syndrome and Alzheimer disease: an assessment of morbidity and annual incidence in Germany]." Gesundheitswesen **62**(4): 211-218.
- Birks, J. and J. Grimley Evans (2009). "Ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia." Cochrane Database Syst Rev(1): CD003120.
- Blennow, K., M. J. de Leon and H. Zetterberg (2006). "Alzheimer's disease." Lancet **368**(9533): 387-403.
- Blennow, K., H. Hampel, M. Weiner and H. Zetterberg (2010). "Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease." Nat Rev Neurol **6**(3): 131-144.
- Brinkmalm, G., A. Brinkmalm, P. Bourgeois, R. Persson, O. Hansson, E. Portelius, M. Mercken, U. Andreasson, S. Parent, F. Lipari, A. Ohrfelt, M. Bjerke, L. Minthon, H. Zetterberg, K. Blennow and M. Nutu (2013). "Soluble amyloid precursor protein alpha and beta in CSF in Alzheimer's disease." Brain Res **1513**: 117-126.
- Buerger, K., A. Ernst, M. Ewers, O. Uspenskaya, M. Omerovic, N. G. Morgenthaler, K. Knauer, A. Bergmann and H. Hampel (2009). "Blood-based microcirculation markers in Alzheimer's disease-diagnostic value of midregional pro-atrial natriuretic peptide/C-terminal endothelin-1 precursor fragment ratio." Biol Psychiatry **65**(11): 979-984.

Buerger, K., M. Ewers, T. Pirttila, R. Zinkowski, I. Alafuzoff, S. J. Teipel, J. DeBernardis, D. Kerkman, C. McCulloch, H. Soininen and H. Hampel (2006). "CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease." *Brain* **129**(Pt 11): 3035-3041.

Chapman, J., J. Estupinan, A. Asherov and L. G. Goldfarb (1996). "A simple and efficient method for apolipoprotein E genotype determination." *Neurology* **46**(5): 1484-1485.

Chasseigneaux, S. and B. Allinquant (2012). "Functions of Abeta, sAPPalpha and sAPPbeta : similarities and differences." *J Neurochem* **120 Suppl 1**: 99-108.

Chasseigneaux, S., L. Dinc, C. Rose, C. Chabret, F. Couplier, P. Topilko, G. Mauger and B. Allinquant (2011). "Secreted amyloid precursor protein beta and secreted amyloid precursor protein alpha induce axon outgrowth in vitro through Egr1 signaling pathway." *PLoS One* **6**(1): e16301.

Corder, E. H., A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines and M. A. Pericak-Vance (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." *Science* **261**(5123): 921-923.

Davies, L., B. Wolska, C. Hilbich, G. Multhaup, R. Martins, G. Simms, K. Beyreuther and C. L. Masters (1988). "A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques." *Neurology* **38**(11): 1688-1693.

Ewers, M., R. A. Sperling, W. E. Klunk, M. W. Weiner and H. Hampel (2011). "Neuroimaging markers for the prediction and early diagnosis of Alzheimer's disease dementia." *Trends Neurosci* **34**(8): 430-442.

Fagan, A. M., M. A. Mintun, R. H. Mach, S. Y. Lee, C. S. Dence, A. R. Shah, G. N. LaRossa, M. L. Spinner, W. E. Klunk, C. A. Mathis, S. T. DeKosky, J. C. Morris and D. M. Holtzman (2006). "Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans." *Ann Neurol* **59**(3): 512-519.

Farrer, L. A., L. A. Cupples, J. L. Haines, B. Hyman, W. A. Kukull, R. Mayeux, R. H. Myers, M. A. Pericak-Vance, N. Risch and C. M. van Duijn (1997). "Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium." *JAMA* **278**(16): 1349-1356.

Ferri, C. P., M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P. R. Menezes, E. Rimmer, M. Scazufca and I. Alzheimer's Disease (2005). "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study." *Lancet* **366**(9503): 2112-2117.

Folstein, M. F., S. E. Folstein and P. R. McHugh (1975). ""Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician." *J Psychiatr Res* **12**(3): 189-198.

Freude, K. K., M. Penjwini, J. L. Davis, F. M. LaFerla and M. Blurton-Jones (2011). "Soluble amyloid precursor protein induces rapid neural differentiation of human embryonic stem cells." *J Biol Chem* **286**(27): 24264-24274.

Geerlings, M. I., C. Jonker, L. M. Bouter, H. J. Ader and B. Schmand (1999). "Association between memory complaints and incident Alzheimer's disease in elderly people with normal baseline cognition." Am J Psychiatry **156**(4): 531-537.

Giacobini, E. (2000). "Cholinesterase inhibitors stabilize Alzheimer's disease." Ann N Y Acad Sci **920**: 321-327.

Gomar, J. J., M. T. Bobes-Bascaran, C. Conejero-Goldberg, P. Davies, T. E. Goldberg and I. Alzheimer's Disease Neuroimaging (2011). "Utility of combinations of biomarkers, cognitive markers, and risk factors to predict conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer disease in patients in the Alzheimer's disease neuroimaging initiative." Arch Gen Psychiatry **68**(9): 961-969.

Graff-Radford, N. R., J. E. Crook, J. Lucas, B. F. Boeve, D. S. Knopman, R. J. Ivnik, G. E. Smith, L. H. Younkin, R. C. Petersen and S. G. Younkin (2007). "Association of low plasma A beta 42/A beta 40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease." Arch Neurol **64**(3): 354-362.

Gustafson, D. R., I. Skoog, L. Rosengren, H. Zetterberg and K. Blennow (2007). "Cerebrospinal fluid beta-amyloid 1-42 concentration may predict cognitive decline in older women." J Neurol Neurosurg Psychiatry **78**(5): 461-464.

Haas, C. (2012). "Strategies, development, and pitfalls of therapeutic options for Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **28**(2): 241-281.

Hempel, H., K. Buerger, R. Zinkowski, S. J. Teipel, A. Goernitz, N. Andreasen, M. Sjoegren, J. DeBernardis, D. Kerkman, K. Ishiguro, H. Ohno, E. Vanmechelen, H. Vanderstichele, C. McCulloch, H. J. Moller, P. Davies and K. Blennow (2004). "Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study." Arch Gen Psychiatry **61**(1): 95-102.

Hempel, H., K. Burger, J. C. Pruessner, R. Zinkowski, J. DeBernardis, D. Kerkman, G. Leinsinger, A. C. Evans, P. Davies, H. J. Moller and S. J. Teipel (2005). "Correlation of cerebrospinal fluid levels of tau protein phosphorylated at threonine 231 with rates of hippocampal atrophy in Alzheimer disease." Arch Neurol **62**(5): 770-773.

Hempel, H., D. Prvulovic, S. Teipel, F. Jessen, C. Luckhaus, L. Frolich, M. W. Riepe, R. Dodel, T. Leyhe, L. Bertram, W. Hoffmann, F. Faltraco and D. German Task Force on Alzheimer's (2011). "The future of Alzheimer's disease: the next 10 years." Prog Neurobiol **95**(4): 718-728.

Harvey, R. J., M. Skelton-Robinson and M. N. Rossor (2003). "The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years." J Neurol Neurosurg Psychiatry **74**(9): 1206-1209.

Hesse, C., L. Rosengren, N. Andreasen, P. Davidsson, H. Vanderstichele, E. Vanmechelen and K. Blennow (2001). "Transient increase in total tau but not phospho-tau in human cerebrospinal fluid after acute stroke." Neurosci Lett **297**(3): 187-190.

Hughes, C. P., L. Berg, W. L. Danziger, L. A. Coben and R. L. Martin (1982). "A new clinical scale for the staging of dementia." Br J Psychiatry **140**: 566-572.

Hulstaert, F., K. Blennow, A. Ivanoiu, H. C. Schoonderwaldt, M. Riemenschneider, P. P. De Deyn, C. Bancher, P. Cras, J. Wiltfang, P. D. Mehta, K. Iqbal, H. Pottel, E. Vanmechelen and H. Vanderstichele (1999). "Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF." Neurology **52**(8): 1555-1562.

Hye, A., S. Lynham, M. Thambisetty, M. Causevic, J. Campbell, H. L. Byers, C. Hooper, F. Rijdsdijk, S. J. Tabrizi, S. Banner, C. E. Shaw, C. Foy, M. Poppe, N. Archer, G. Hamilton, J. Powell, R. G. Brown, P. Sham, M. Ward and S. Lovestone (2006). "Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease." Brain **129**(Pt 11): 3042-3050.

Irizarry, M. C. (2004). "Biomarkers of Alzheimer disease in plasma." NeuroRx **1**(2): 226-234.

Johansson, P., N. Mattsson, O. Hansson, A. Wallin, J. O. Johansson, U. Andreasson, H. Zetterberg, K. Blennow and J. Svensson (2011). "Cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease: diagnostic performance in a homogeneous mono-center population." J Alzheimers Dis **24**(3): 537-546.

Johnston, J. A., W. W. Liu, D. T. Coulson, S. Todd, S. Murphy, S. Brennan, C. J. Foy, D. Craig, G. B. Irvine and A. P. Passmore (2008). "Platelet beta-secretase activity is increased in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **29**(5): 661-668.

Kang, J., H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther and B. Muller-Hill (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." Nature **325**(6106): 733-736.

Klein, W. L. (2013). "Synaptotoxic amyloid-beta oligomers: a molecular basis for the cause, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease?" J Alzheimers Dis **33** Suppl 1: S49-65.

Koopman, K., N. Le Bastard, J. J. Martin, G. Nagels, P. P. De Deyn and S. Engelborghs (2009). "Improved discrimination of autopsy-confirmed Alzheimer's disease (AD) from non-AD dementias using CSF P-tau(181P)." Neurochem Int **55**(4): 214-218.

Koudinov, A. R., T. T. Berezov, A. Kumar and N. V. Koudinova (1998). "Alzheimer's amyloid beta interaction with normal human plasma high density lipoprotein: association with apolipoprotein and lipids." Clin Chim Acta **270**(2): 75-84.

Kukull, W. A., D. E. Brenner, C. E. Speck, D. Nochlin, J. Bowen, W. McCormick, L. Teri, M. L. Pfanschmidt and E. B. Larson (1994). "Causes of death associated with Alzheimer disease: variation by level of cognitive impairment before death." J Am Geriatr Soc **42**(7): 723-726.

Kuo, Y. M., M. R. Emmerling, H. C. Lampert, S. R. Hempelman, T. A. Kokjohn, A. S. Woods, R. J. Cotter and A. E. Roher (1999). "High levels of circulating Abeta42 are sequestered by plasma proteins in Alzheimer's disease." Biochem Biophys Res Commun **257**(3): 787-791.

Larson, E. B., M. F. Shadlen, L. Wang, W. C. McCormick, J. D. Bowen, L. Teri and W. A. Kukull (2004). "Survival after initial diagnosis of Alzheimer disease." Ann Intern Med **140**(7): 501-509.

Lau, A. and M. Tymianski (2010). "Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration." Pflugers Arch **460**(2): 525-542.

Lepara, O., A. Alajbegovic, A. Zaciragic, E. Nakas-Icindic, A. Valjevac, D. Lepara, A. Hadzovic-Dzuvo, A. Fajkic, A. Kulo and E. Sofic (2009). "Elevated serum homocysteine level is not associated with serum C-reactive protein in patients with probable Alzheimer's disease." J Neural Transm **116**(12): 1651-1656.

Levy-Lahad, E., W. Wasco, P. Poorkaj, D. M. Romano, J. Oshima, W. H. Pettingell, C. E. Yu, P. D. Jondro, S. D. Schmidt, K. Wang and et al. (1995). "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus." Science **269**(5226): 973-977.

Lewczuk, P., J. Popp, N. Leental, H. Kolsch, W. Maier, J. Kornhuber and F. Jessen (2012). "Cerebrospinal fluid soluble amyloid-beta protein precursor as a potential novel biomarkers of Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **28**(1): 119-125.

Li, H., B. Wang, Z. Wang, Q. Guo, K. Tabuchi, R. E. Hammer, T. C. Sudhof and H. Zheng (2010). "Soluble amyloid precursor protein (APP) regulates transthyretin and Klotho gene expression without rescuing the essential function of APP." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(40): 17362-17367.

Li, Q. X., S. Whyte, J. E. Tanner, G. Evin, K. Beyreuther and C. L. Masters (1998). "Secretion of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptide by activated human platelets." Lab Invest **78**(4): 461-469.

Lobo, A., L. J. Launer, L. Fratiglioni, K. Andersen, A. Di Carlo, M. M. Breteler, J. R. Copeland, J. F. Dartigues, C. Jagger, J. Martinez-Lage, H. Soininen and A. Hofman (2000). "Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group." Neurology **54**(11 Suppl 5): S4-9.

Lopez, O. L., J. T. Becker, R. A. Sweet, W. Klunk, D. I. Kaufer, J. Saxton, M. Habeych and S. T. DeKosky (2003). "Psychiatric symptoms vary with the severity of dementia in probable Alzheimer's disease." J Neuropsychiatry Clin Neurosci **15**(3): 346-353.

Mapstone, M., A. K. Cheema, M. S. Fiandaca, X. Zhong, T. R. Mhyre, L. H. Macarthur, W. J. Hall, S. G. Fisher, D. R. Peterson, J. M. Haley, M. D. Nazar, S. A. Rich, D. J. Berlau, C. B. Peltz, M. T. Tan, C. H. Kawas and H. J. Federoff (2014). "Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults." Nat Med **20**(4): 415-418.

Masters, C. L., G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald and K. Beyreuther (1985). "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(12): 4245-4249.

Matthews, F. E., A. Arthur, L. E. Barnes, J. Bond, C. Jagger, L. Robinson, C. Brayne, F. Medical Research Council Cognitive and C. Ageing (2013). "A two-decade comparison of prevalence of dementia in individuals aged 65 years and older from three geographical areas of England: results of the Cognitive Function and Ageing Study I and II." Lancet **382**(9902): 1405-1412.

Mawuenyega, K. G., W. Sigurdson, V. Ovod, L. Munsell, T. Kasten, J. C. Morris, K. E. Yarasheski and R. J. Bateman (2010). "Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease." Science **330**(6012): 1774.

Mayeux, R., L. S. Honig, M. X. Tang, J. Manly, Y. Stern, N. Schupf and P. D. Mehta (2003). "Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk." Neurology **61**(9): 1185-1190.

- McKhann, G., D. Drachman, M. Folstein, R. Katzman, D. Price and E. M. Stadlan (1984). "Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease." Neurology **34**(7): 939-944.
- McKhann, G. M., D. S. Knopman, H. Chertkow, B. T. Hyman, C. R. Jack, Jr., C. H. Kawas, W. E. Klunk, W. J. Koroshetz, J. J. Manly, R. Mayeux, R. C. Mohs, J. C. Morris, M. N. Rossor, P. Scheltens, M. C. Carrillo, B. Thies, S. Weintraub and C. H. Phelps (2011). "The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **7**(3): 263-269.
- Mehta, P. D., T. Pirttila, S. P. Mehta, E. A. Sersen, P. S. Aisen and H. M. Wisniewski (2000). "Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease." Arch Neurol **57**(1): 100-105.
- Montgomery, S. A. and M. Asberg (1979). "A new depression scale designed to be sensitive to change." Br J Psychiatry **134**: 382-389.
- Morris, J. C., R. C. Mohs, H. Rogers, G. Fillenbaum and A. Heyman (1988). "Consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD) clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease." Psychopharmacol Bull **24**(4): 641-652.
- Nikolaev, A., T. McLaughlin, D. D. O'Leary and M. Tessier-Lavigne (2009). "APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases." Nature **457**(7232): 981-989.
- Otto, M., J. Wiltfang, H. Tumani, I. Zerr, M. Lantsch, J. Kornhuber, T. Weber, H. A. Kretschmar and S. Poser (1997). "Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease." Neurosci Lett **225**(3): 210-212.
- Pernecky, R., P. Alexopoulos and A. Kurz (2014). "Soluble amyloid precursor proteins and secretases as Alzheimer's disease biomarkers." Trends Mol Med **20**(1): 8-15.
- Pernecky, R. and A. Kurz (2012). "Dealing with uncertainty: biomarkers for the early detection of Alzheimer's disease." Int Psychogeriatr **24**(10): 1533-1535.
- Pernecky, R., A. Tsolakidou, A. Arnold, J. Diehl-Schmid, T. Grimmer, H. Forstl, A. Kurz and P. Alexopoulos (2011). "CSF soluble amyloid precursor proteins in the diagnosis of incipient Alzheimer disease." Neurology **77**(1): 35-38.
- Pomara, N., L. M. Willoughby, J. J. Sidtis and P. D. Mehta (2005). "Selective reductions in plasma Abeta 1-42 in healthy elderly subjects during longitudinal follow-up: a preliminary report." Am J Geriatr Psychiatry **13**(10): 914-917.
- Portelius, E., E. Price, G. Brinkmalm, M. Stiteler, M. Olsson, R. Persson, A. Westman-Brinkmalm, H. Zetterberg, A. J. Simon and K. Blennow (2011). "A novel pathway for amyloid precursor protein processing." Neurobiol Aging **32**(6): 1090-1098.
- Qiu, C., E. von Strauss, L. Backman, B. Winblad and L. Fratiglioni (2013). "Twenty-year changes in dementia occurrence suggest decreasing incidence in central Stockholm, Sweden." Neurology **80**(20): 1888-1894.

Ray, B., J. M. Long, D. K. Sokol and D. K. Lahiri (2011). "Increased secreted amyloid precursor protein-alpha (sAPPalpha) in severe autism: proposal of a specific, anabolic pathway and putative biomarker." PLoS One **6**(6): e20405.

Ray, S., M. Britschgi, C. Herbert, Y. Takeda-Uchimura, A. Boxer, K. Blennow, L. F. Friedman, D. R. Galasko, M. Jutel, A. Karydas, J. A. Kaye, J. Leszek, B. L. Miller, L. Minthon, J. F. Quinn, G. D. Rabinovici, W. H. Robinson, M. N. Sabbagh, Y. T. So, D. L. Sparks, M. Tabaton, J. Tinklenberg, J. A. Yesavage, R. Tibshirani and T. Wyss-Coray (2007). "Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins." Nat Med **13**(11): 1359-1362.

Rohan de Silva, H. A., A. Jen, C. Wickenden, L. S. Jen, S. L. Wilkinson and A. J. Patel (1997). "Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes." Brain Res Mol Brain Res **47**(1-2): 147-156.

Rosen, C., U. Andreasson, N. Mattsson, J. Marcusson, L. Minthon, N. Andreasen, K. Blennow and H. Zetterberg (2012). "Cerebrospinal fluid profiles of amyloid beta-related biomarkers in Alzheimer's disease." Neuromolecular Med **14**(1): 65-73.

Schellenberg, G. D. and T. J. Montine (2012). "The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease." Acta Neuropathol.

Scheuner, D., C. Eckman, M. Jensen, X. Song, M. Citron, N. Suzuki, T. D. Bird, J. Hardy, M. Hutton, W. Kukull, E. Larson, E. Levy-Lahad, M. Viitanen, E. Peskind, P. Poorkaj, G. Schellenberg, R. Tanzi, W. Wasco, L. Lannfelt, D. Selkoe and S. Younkin (1996). "Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease." Nat Med **2**(8): 864-870.

Sherrington, R., E. I. Rogaev, Y. Liang, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, T. Tsuda, L. Mar, J. F. Foncin, A. C. Bruni, M. P. Montesi, S. Sorbi, I. Rainero, L. Pinessi, L. Nee, I. Chumakov, D. Pollen, A. Brookes, P. Sanseau, R. J. Polinsky, W. Wasco, H. A. Da Silva, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, R. E. Tanzi, A. D. Roses, P. E. Fraser, J. M. Rommens and P. H. St George-Hyslop (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." Nature **375**(6534): 754-760.

Shulman, K. I. (2000). "Clock-drawing: is it the ideal cognitive screening test?" Int J Geriatr Psychiatry **15**(6): 548-561.

Sisodia, S. S. and P. H. St George-Hyslop (2002). "gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in?" Nat Rev Neurosci **3**(4): 281-290.

Skoog, I., P. Davidsson, O. Aevansson, H. Vanderstichele, E. Vanmechelen and K. Blennow (2003). "Cerebrospinal fluid beta-amyloid 42 is reduced before the onset of sporadic dementia: a population-based study in 85-year-olds." Dement Geriatr Cogn Disord **15**(3): 169-176.

Solbach, H. G., A. Enghardt and R. Merten (1962). "[Differences of enzyme activities in serum and plasma and their significance for the clinical enzyme diagnosis]." Klin Wochenschr **40**: 1136-1139.

Sperling, R. A., P. S. Aisen, L. A. Beckett, D. A. Bennett, S. Craft, A. M. Fagan, T. Iwatsubo, C. R. Jack, Jr., J. Kaye, T. J. Montine, D. C. Park, E. M. Reiman, C. C. Rowe, E. Siemers, Y. Stern, K. Yaffe, M. C. Carrillo, B. Thies, M. Morrison-Bogorad, M. V. Wagster and C. H. Phelps (2011). "Toward defining the

preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **7**(3): 280-292.

Storey, E., M. J. Slavin and G. J. Kinsella (2002). "Patterns of cognitive impairment in Alzheimer's disease: assessment and differential diagnosis." Front Biosci **7**: e155-184.

Suzuki, N., T. T. Cheung, X. D. Cai, A. Odaka, L. Otvos, Jr., C. Eckman, T. E. Golde and S. G. Younkin (1994). "An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants." Science **264**(5163): 1336-1340.

Tanzi, R. E., J. F. Gusella, P. C. Watkins, G. A. Bruns, P. St George-Hyslop, M. L. Van Keuren, D. Patterson, S. Pagan, D. M. Kurnit and R. L. Neve (1987). "Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus." Science **235**(4791): 880-884.

Tapiola, T., I. Alafuzoff, S. K. Herukka, L. Parkkinen, P. Hartikainen, H. Soininen and T. Pirttila (2009). "Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain." Arch Neurol **66**(3): 382-389.

Tsolakidou, A., P. Alexopoulos, L. H. Guo, T. Grimmer, C. Westerteicher, M. Kratzer, M. Jiang, H. Bujo, F. Roselli, M. R. Leante, P. Livrea, A. Kurz and R. Perneczky (2013). "beta-Site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 activity is related to cerebrospinal fluid concentrations of sortilin-related receptor with A-type repeats, soluble amyloid precursor protein, and tau." Alzheimers Dement **9**(4): 386-391.

van Oijen, M., A. Hofman, H. D. Soares, P. J. Koudstaal and M. M. Breteler (2006). "Plasma A β (1-40) and A β (1-42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study." Lancet Neurol **5**(8): 655-660.

Vassar, R., B. D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E. A. Mendiaz, P. Denis, D. B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M. A. Jarosinski, A. L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J. C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers and M. Citron (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." Science **286**(5440): 735-741.

Walsh, D. M. and D. J. Selkoe (2007). "A beta oligomers - a decade of discovery." J Neurochem **101**(5): 1172-1184.

Wimo, A., L. Jonsson, A. Gustavsson, D. McDaid, K. Ersek, J. Georges, L. Gulacsi, K. Karpati, P. Kenigsberg and H. Valtonen (2011). "The economic impact of dementia in Europe in 2008-cost estimates from the Eurocode project." Int J Geriatr Psychiatry **26**(8): 825-832.

Wright, B. L., J. T. Lai and A. J. Sinclair (2012). "Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: a practical review." J Neurol.

Wu, G., S. Sankaranarayanan, S. H. Hsieh, A. J. Simon and M. J. Savage (2011). "Decrease in brain soluble amyloid precursor protein beta (sAPP β) in Alzheimer's disease cortex." J Neurosci Res **89**(6): 822-832.

Lösliches Amyloidvorläuferprotein Beta als Biomarker für die Alzheimer-Krankheit

Zetterberg, H., U. Andreasson, O. Hansson, G. Wu, S. Sankaranarayanan, M. E. Andersson, P. Buchhave, E. Londos, R. M. Umek, L. Minthon, A. J. Simon and K. Blennow (2008). "Elevated cerebrospinal fluid BACE1 activity in incipient Alzheimer disease." Arch Neurol **65**(8): 1102-1107.

10 Danksagung

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Robert Perneczky möchte ich mich herzlich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die hervorragende Betreuung meiner Arbeit bedanken. Seine stets gute Erreichbarkeit, Flexibilität und Organisation ermöglichten mir eine bereichernde und lehrreiche Zeit als Doktorand in seinem neurobiologischen Labor.

Des Weiteren gebührt mein Dank Tamara Eisele, die mir geduldig alle labortechnischen Methoden dieser Arbeit beibrachte und die für das besonders angenehme und freundliche Arbeitsklima im Labor verantwortlich war.

Danke auch an Dr. Lainghao Guo für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft sowie an Dr. Panagiotis Alexopoulos für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Für die Vermittlung meiner Bewerbung an das neurobiologische Labor seiner Klinik und die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. J. Förstl.

Außerdem danke ich meiner Familie für die emotionale, fachliche und finanzielle Unterstützung und den sicheren Rückhalt nicht nur während meiner medizinischen Ausbildung.

Schließlich geht der letzte Dank an meine Freundin Jana Wörsching, mit der ich meine Begeisterung für Hirnforschung teile und die mir mit ihrem Wissen über Statistik und formale Gestaltung wissenschaftlicher Arbeiten eine große Hilfe war.