



Technische Universität München
Fakultät für Medizin

Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums rechts der
Isar

**Evaluation eines Bluttests zur Diagnose der Alzheimer-Krankheit im Stadium
der leichten kognitiven Störung**

Stella Mathilde Rubow

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors
der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Timo Grimmer
2. apl. Prof. Dr. Werner Steimer

Die Dissertation wurde am 21.01.2020 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.08.2020
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Demenzen im Überblick	7
1.2	Die Alzheimer-Krankheit.....	9
1.3	Familiäre Form der Alzheimer-Krankheit	10
1.4	Sporadische Form der Alzheimer-Krankheit.....	11
1.5	Leichte kognitive Störung als Vorstufe der Demenz	13
1.6	Rolle der Neuroinflammation in der Entstehung der Alzheimer-Krankheit.....	15
1.7	Diagnostik der (Alzheimer-) Demenz.....	17
1.7.1	Klinische Diagnostik.....	17
1.7.2	Liquor basierte Diagnostik und Bildgebung	19
1.7.3	Diagnostische Kriterien der Alzheimer-Krankheit.....	19
1.7.4	Blut basierte Diagnostik	21
1.7.4.1	BDNF.....	23
1.7.4.2	IGF-1.....	24
1.7.4.3	VEGF	25
1.7.4.4	TGF- β	25
1.7.4.5	IL-18 und MCP-1.....	26
1.7.4.6	Validierungsstudie der Herstellerfirma ©Predemtec AG.....	27
1.7.5	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	31
2	Methoden.....	33
2.1	Ethikvotum und Einwilligungserklärung	33
2.2	Studiendesign und Patienten	33
2.3	Einschlusskriterien.....	35
2.4	Erfassung des Schweregrads einer Demenz.....	36
2.5	Lumbalpunktion.....	40
2.6	Blutabnahme und -verarbeitung	41
2.7	Blutbasierter Biomarker-Test	44
2.8	Statistische Auswertung	45
3	Ergebnisse	47
4	Publikation.....	65
5	Diskussion.....	69
5.1	Die Wachstumsfaktoren VEGF und BDNF	69
5.1.1	VEGF	70
5.1.2	BDNF.....	71

5.2	IGF-1.....	73
5.3	TGF- β	74
5.4	IL-18 und MCP-1	75
5.4.1	IL-18	75
5.4.2	MCP-1	76
5.5	Limitationen der Studie	77
5.6	Bedeutung der Studie	80
6	Zusammenfassung.....	81
7	Beobachtungsgrundlagen/Persönlicher Beitrag	82
8	Literaturverzeichnis.....	83
9	Anhang.....	94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Demenzformen	8
Abbildung 2: Entstehung des β -Amyloids aus dem APP durch die Aktivität der β - und γ -Sekretase	10
Abbildung 3: Kontinuum von normalem Altern hin zur Demenz.....	13
Abbildung 4: Subtypen der leichten kognitiven Störung (=MCI)	14
Abbildung 5: Neuroinflammation als physiologischer und als pathologischer Prozess	17
Abbildung 6: Die Rolle des BDNF für die Funktion des Hippocampus und damit des Gedächtnisses.....	24
Abbildung 7: Logistisches Regressionsmodell von ©Predemtec AG.	31
Abbildung 8: CDR.....	37
Abbildung 9: CERAD Testbatterie.....	38
Abbildung 10: MMST.....	39
Abbildung 12: Preanalytic Processing Guidelines	43
Abbildung 13: Verteilung des tTau-Werts bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit.....	52
Abbildung 14: Verteilung des pTau-Werts bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit.....	53
Abbildung 15: Verteilung des Amyloid- β -1-42-Werts bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit.	53
Abbildung 16: Verteilung des Quotienten aus A β 42 zu A β 40 bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit.....	54
Abbildung 17: Verteilung des BDNF-Werts bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit.....	54
Abbildung 18: Verteilung des IGF-1-Werts bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit.....	55
Abbildung 19: Verteilung des VEGF-Werts bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit.....	55
Abbildung 20: Verteilung des TGF- β -Werts bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit.....	56
Abbildung 21: Verteilung des MCP-1-Werts bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit.....	56
Abbildung 22: Verteilung des IL-18-Werts bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit.....	57
Abbildung 23: ROC-Kurven für die einzelnen Biomarker	58
Abbildung 24: Performance des Algorithmus bei Anwendung an den Daten der MCI-nonAD-Patienten	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ATN-System.	21
Tabelle 2: Vergleich der Serumproteingehalte der sechs Analyten bei Verwendung verschiedener Blutentnahmeröhrchen.	29
Tabelle 3: Serumproteinspiegel der sechs Biomarker bei Kontrollpersonen und AD-Patienten.	30
Tabelle 4: Konzentrationsänderungen der Biomarker bei Alzheimer Patienten im Vergleich zu Kontrollen.	30
Tabelle 5: Verteilung des Lebensalters bei Blutentnahme in den zwei Gruppen.	34
Tabelle 6: Ausschlusskriterien (definiert von ©Predemtec AG) in den beiden Gruppen.	36
Tabelle 7: Relevante Begleitmedikamente in den beiden Gruppen	36
Tabelle 8: MMST-Punkte in den beiden Gruppen.	40
Tabelle 9: Kommerzielle ELISA Kits, Probenverdünnung und Testspezifikationen.	44
Tabelle 10: Biomarkerwerte und Einordnung in Alzheimer/Nicht-Alzheimer durch ©Predemtec AG	48
Tabelle 11: Kreuztabelle unter Einschluss aller Patienten	49
Tabelle 12: Chi-Quadrat-Test unter Einschluss der gesamten Studienpopulation.	49
Tabelle 13: Kreuztabelle unter Ausschluss der Grenzfälle	50
Tabelle 14: Chi-Quadrat Test unter Ausschluss der Grenzfälle.	50
Tabelle 15: Kreuztabelle unter Ausschluss der Patienten mit Ausschlusskriterien	51
Tabelle 16: Kreuztabelle unter Ausschluss der Patienten mit Ausschlusskriterien und der Grenzfälle	51
Tabelle 17: AUCs für die Biomarker des Panels	59
Tabelle 18: Korrelation der Marker im Liquor und Blut mit den Klinischen Parametern	61
Tabelle 19: Korrelationen der CSF-Biomarker untereinander.	61
Tabelle 20: Korrelationen zwischen den CSF- und den Blutbiomarkern	62
Tabelle 21: Signifikante Korrelationen der Biomarker untereinander	62
Tabelle 22: Logistische Regressionsanalyse	63
Tabelle 23: Deskriptive Statistik	64

Abkürzungsverzeichnis

A β 40:	β -Amyloid-Protein 1-40
A β 42:	β -Amyloid-Protein 1-42
AD:	Alzheimer Krankheit (engl.: Alzheimer's Disease)
APP:	Amyloid-Vorläuferprotein (engl.: Amyloid Precursor Protein)
BDNF:	Brain derived neurotrophic factor
CDR:	Clinical Dementia Rating Scale
CDR-SOB:	Clinical Dementia Rating Scale-Sum Of Boxes
CSF:	Liquor cerebrospinalis (engl.: Cerebrospinal fluid)
DNA:	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
EOAD:	Präsenile Alzheimer-Krankheit (engl.: Early Onset Alzheimer's disease)
HDL:	High Density Lipoprotein
IGF-1:	Insulin like growth factor 1
IL-18:	Interleukin 18
LDL:	Low Density Lipoprotein
LOAD:	Senile Alzheimer-Krankheit (engl.: Late Onset Alzheimer's disease)
LP:	Lumbalpunktion
LWK:	Lendenwirbelkörper
MCI:	Leichte kognitive Störung (engl.: mild cognitive impairment)
MCI-AD:	Leichte kognitive Störung bei zugrundeliegender Alzheimer-Krankheit (engl.: mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease)
MCI-NonAD:	Leichte kognitive Störung bei nicht zugrundeliegender Alzheimer-Krankheit (engl.: mild cognitive impairment not due to Alzheimer's disease)
MCP-1:	monocyte chemotactic protein 1
miRNA :	mikro-Ribonukleinsäure (engl.: micro-ribonucleic acid)
MMST:	Mini-Mental-Status-Test
PET:	Positronen-Emissions-Tomographie
PSEN1:	Präsenilin 1
PSEN2:	Präsenilin 2
pTau:	Phosphoryliertes Tau-Protein (engl.: phosphorylated tau protein)
SOP:	Standard Operating Procedure
TGF- β :	Transforming growth factor β
tTau:	Gesamtes Tau-Protein (engl.: total tau protein)
VEGF:	Vascular endothelial growth factor
VLDL:	Very Low Density Lipoprotein

1 Einleitung

1.1 Demenzen im Überblick

Nach Zahlen des World Alzheimer Report 2019 leiden weltweit über 50 Millionen Menschen an einer Demenz. Im Jahr 2050 soll diese Zahl auf über 152 Millionen angestiegen sein. Dies stellt die Welt humanitär, aber auch wirtschaftlich vor eine Herausforderung. Die derzeitigen jährlichen Kosten der Demenz werden auf 1 Billionen US-Dollar geschätzt, eine Zahl, die sich bis 2030 verdoppeln dürfte (Alzheimer's Disease International, 2019).

Der Begriff Demenz beschreibt eine Störung des Gedächtnisses sowie weiterer kognitiver Funktionen wie der Sprache, der Orientierung, des Urteilsvermögens und des Denkens. Die Symptome führen zu einer Beeinträchtigung der sozialen und beruflichen Leistung bis hin zur vollständigen Aufhebung der Selbstständigkeit. Laut ICD-10 und DSM-5 wird nur dann von einer Demenz gesprochen, wenn Einschränkungen in der Alltagsbewältigung vorliegen (American Psychiatric Association, 2013).

Bei der häufigsten Ursache einer Demenz, der Alzheimer-Krankheit, ist zunächst charakteristischerweise das Neugedächtnis betroffen, das heißt, neue Informationen können nicht behalten werden (Cunningham et al., 2015). Zusätzlich kann die räumliche und zeitliche Orientierung gestört sein (Alzheimer's Association, 2012). In fortgeschrittenen Stadien sind die Betroffenen häufig nicht mehr in der Lage, ihre Angehörigen zu erkennen oder sich an ihren eigenen Namen zu erinnern.

Der Demenz können verschiedene Krankheiten zugrunde liegen (siehe Abbildung 1). Man unterscheidet hirnorganische (primäre) von nicht-hirnorganischen (sekundären) Demenzen (Lautenschlager & Förstl, 2003; Ritchie & Lovestone, 2002). Die sekundären Demenzen sind Folge einer anderen organischen Erkrankung wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, einer endokrinologischen Störung oder Folge einer Medikamentenintoxikation (Joshi & Morley, 2006). Diese Demenzen sind potentiell reversibel nach Behandlung der zugrundeliegenden Krankheit (Iglseider, 2014).

Die Ursache der primären Demenzformen ist direkt im Gehirn zu finden. Es handelt sich dabei entweder um vaskuläre oder neurodegenerative Erkrankungen des Gehirns (Reith & Mühl-Benninghaus, 2015).

Die vaskulären Demenzen sind durch eine gefäßbedingte Gehirnschädigung verursacht und zeichnen sich durch einen oft un stetigen Verlauf aus, im Gegensatz zu den langsam progredient verlaufenden neurodegenerativen Demenzformen, die meist schleichend beginnen (Nowrangi et al., 2015).

Bei den neurodegenerativen Erkrankungen mit dementiellem Syndrom kommt es zu Ablagerungen verschiedener Proteine bzw. Proteinaggregate im Gehirn und im Verlauf zu einer Atrophie. Zu den neurodegenerativen Erkrankungen mit Demenzentwicklung zählen unter anderen die Alzheimer-Krankheit, die Frontotemporalen Lobärdegenerationen und die Lewy-Körperchen-Krankheit (Moodley & Chan, 2014).

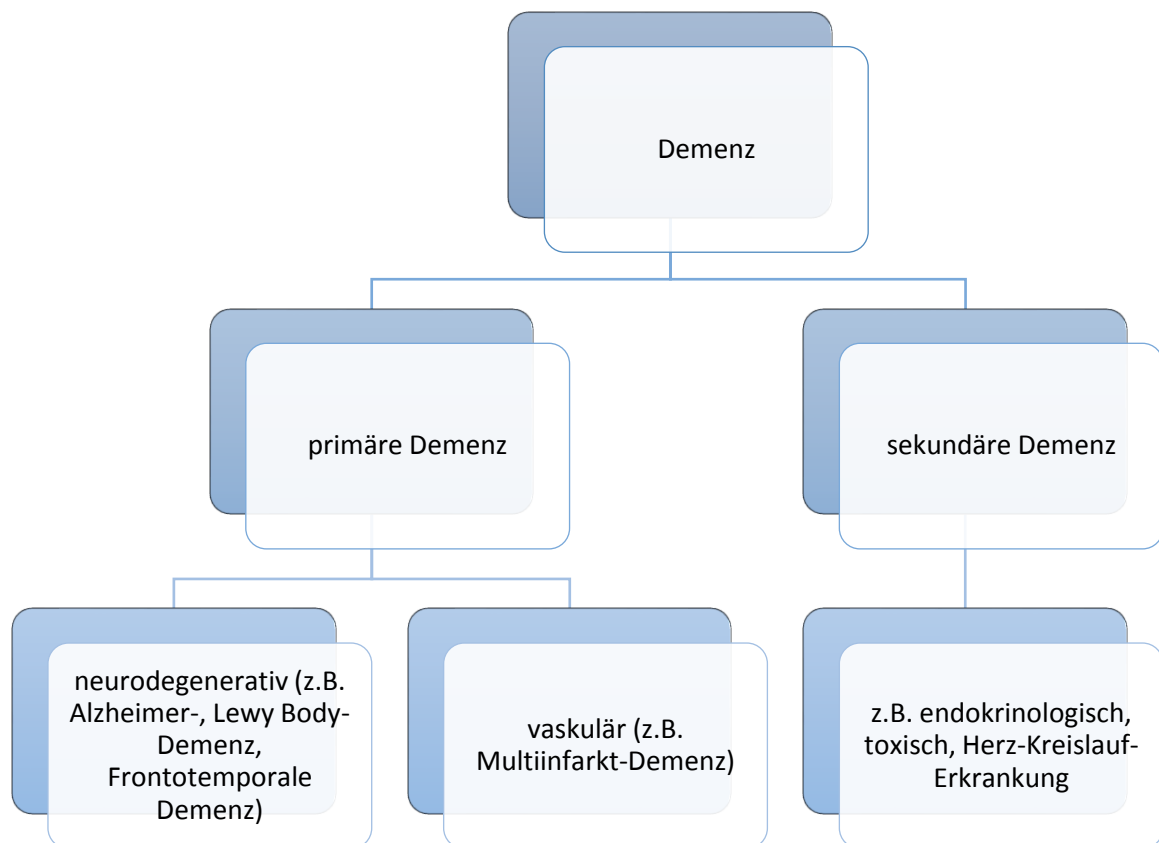


Abbildung 1: Demenzformen. Eigene Abbildung, angelehnt an Lautenschlager & Förstl (2003).

Bei der Demenz mit Lewy-Körperchen kommt es wie bei der Alzheimer-Krankheit zur Ablagerung pathologischer Proteinaggregate im Gehirn, den Lewy-Körperchen. Diese bestehen aus α -Synuclein und wurden zuerst bei der Parkinson-Krankheit entdeckt. Auch bei der Demenz mit Lewy-Körperchen kommt es, wie beim Morbus Parkinson, zu Bewegungsstörungen, die Demenz steht aber im Vordergrund und geht den Bewegungsstörungen voraus (Walker, Possin, Boeve & Aarsland, 2015)

Außerdem zählen die Frontotemporalen Lobärdegenerationen zu den neurodegenerativen Erkrankungen. Bei dem Subtyp der Frontotemporalen Demenz fällt zunächst eine Veränderung der Persönlichkeit auf, bevor das Gedächtnis beeinträchtigt ist (Shinagawa et al., 2006). Auch Prionenerkrankungen wie die Creutzfeld-Jacob-Krankheit verursachen durch Neurodegeneration eine Demenz (Rentz, 2003).

Die folgende Arbeit beschäftigt sich mit der am häufigsten auftretenden Demenzform, der Alzheimer-Demenz.

1.2 Die Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit ist die häufigste Ursache einer Demenz (Alzheimer's Association, 2012).

Benannt ist sie nach dem Psychiater Alois Alzheimer, der im Hirngewebe einer dementiellen Patientin, deren Gehirn er posthum obduzierte, Plaques und Fibrillen beschrieb.

Diese sind das neuropathologische Korrelat der Alzheimer-Krankheit. Die Plaques werden auch senile Plaques genannt und bestehen überwiegend aus extrazellulär aggregiertem β -Amyloid. Das β -Amyloid ist ein Peptid und entsteht aus einem transmembranösen Protein, dem Amyloid Precursor Protein (APP) durch die Aktivität zweier Sekretasen, der β - und γ -Sekretase (siehe Abbildung 2) (Vilalata et al., 2012). Durch die Aktivität der Sekretasen entstehen aus dem Amyloid Precursor Protein verschiedene Formen des β -Amyloids, unter anderem A β 40 und A β 42 (Murphy & LeVine III, 2010). A β 42 ist ein etwas längeres Peptid als A β 40. Es aggregiert schneller als A β 40, wirkt neurotoxisch und ist die vorherrschende Form des Amyloids in den senilen Plaques (Blennow, 2004).

Die Aggregation des Peptids und somit die Plaqueeinstellung beginnt 20 bis 30 Jahre vor der klinischen Manifestation der Erkrankung (Blennow, 2004).

Die Peptide A β 40 und A β 42 werden in das Nervenwasser sezerniert, sodass durch die Untersuchung desselbigen eine frühe Diagnose der Amyloid-Pathologie erreicht werden kann. In der aktuellen Standarddiagnostik spielt vor allem das A β 42 die entscheidende Rolle, dessen Konzentration im Nervenwasser bei Vorliegen der Alzheimer-Pathologie reduziert ist (Andreasen et al., 1999).

Die Neurofibrillen bestehen aus intrazellulärem Tau-Protein (Masuhr et al., 2013).

Das Tau-Protein ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein und relevant für die Stabilität der Mikrotubuli in den Axonen der Neuronen. Die Mikrotubuli sind wichtig für den axonalen Transport und somit für die Funktion der Axone. Tau kann an vielen verschiedenen Stellen phosphoryliert werden (Blennow, 2004). Hyperphosphoryliertes Tau ist der Hauptbestandteil der Alzheimer-Fibrillen. Sind Fibrillen in Neuronen vorhanden, kommt es zu einem Verlust an dendritischen Dornfortsätzen, welche sich an den Postsynapsen exzitatorischer Neurone befinden und wichtig für das Lernen, die Kognition und das Gedächtnis sind (DeFelipe, 2016). Tau kann wie das β -Amyloid im Liquor bestimmt werden, und zwar sowohl das Gesamt-Tau (t-tau für total Tau) wie auch das phosphorylierte Tau (p-tau) (Blennow, 2004).

Hinweisend auf die Alzheimer Pathologie sind dabei erhöhte Werte (Vigo-Pelfrey et al., 1995). Die Bestimmung der Bestandteile der Plaques und Fibrillen ist also ein wichtiger Bestandteil der aktuellen Standarddiagnostik. Auf die aktuell gültigen Diagnosekriterien sowie die Grenzen der verfügbaren Diagnostik wird in späteren Kapiteln dieser Arbeit eingegangen.¹

¹ Siehe Kapitel 1.7.3

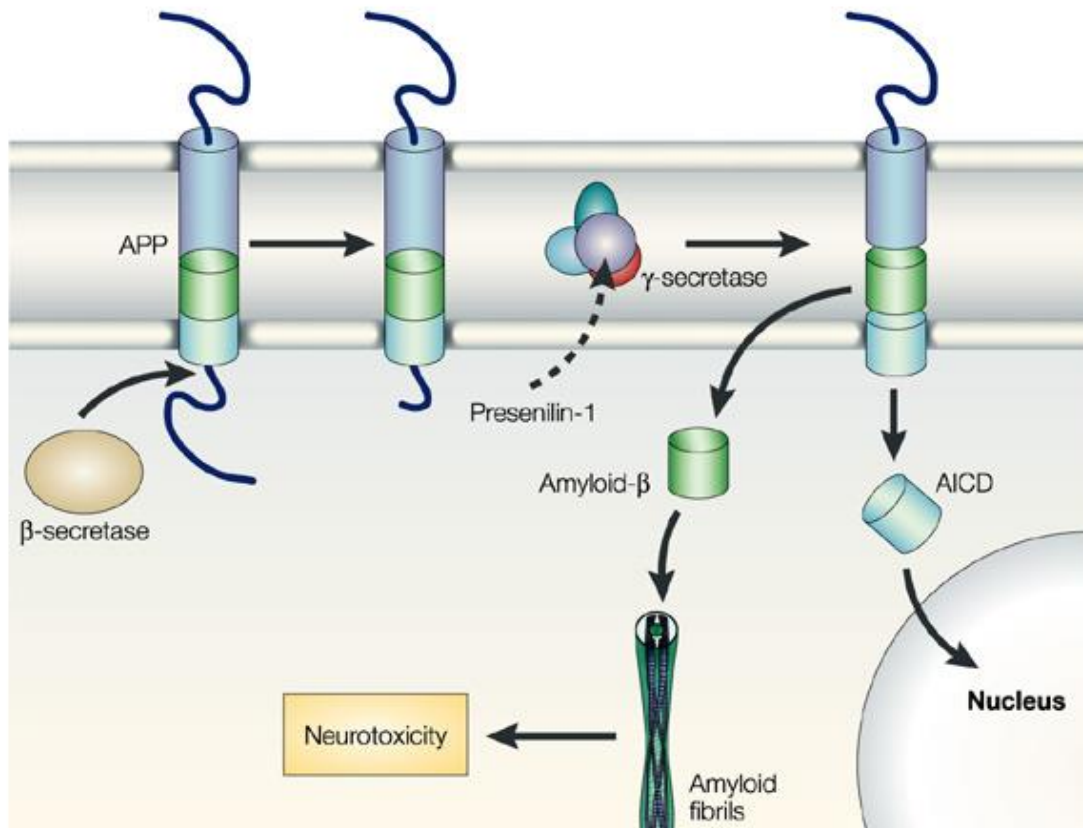


Abbildung 2: Entstehung des β -Amyloids aus dem APP durch die Aktivität der β - und γ -Sekretase. Abbildung von Buckingham (2003).

1.3 Familiäre Form der Alzheimer-Krankheit

Man unterscheidet eine sporadische und eine familiäre Form der Alzheimer-Krankheit. Für die Genese der sporadischen Form existieren verschiedene Hypothesen. Der selteneren familiären Form liegen verschiedene Gendefekte zugrunde.

Bekannte Gendefekte betreffen das Präsenilin 1 (PSEN1)- und 2-(PSEN2)Gen, sowie das Amyloid Protein Precursor (APP)-Gen (Lanoiselée et al., 2017). Am häufigsten sind Mutationen im PSEN 1 Gen verantwortlich für die familiäre Form der Alzheimer-Krankheit (Suárez-Calvet et al., 2014). PSEN 1 und 2 kodieren für Präsenilin 1 und 2, die an der Bildung des γ -Sekretase Komplexes beteiligt sind. Mutationen in PSEN 1 und 2 beeinflussen die katalytische Aktivität der γ -Sekretase, sodass ein längeres $A\beta$ -Peptid entsteht und das Verhältnis von $A\beta_{42}$ zu $A\beta_{40}$ ansteigt. Auch das mutierte Amyloid Precursor Protein führt unter anderem zu einem Anstieg des $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Verhältnis. Mutationen im APP führen außerdem zu einer Überproduktion des gesamten Amyloid β , und zur Bildung eines $A\beta_{42}$, das vermehrt zur Aggregation neigt (Lanoiselée et al., 2017).

Diese relativ seltenen genetisch bedingten Alzheimer-Erkrankungen mit pathogenen Punktmutationen unterscheiden sich von den viel häufigeren sporadischen Formen klinisch durch einen meist früheren, präsenilen Beginn der Symptomatik. Man spricht hier auch von Early Onset AD (EOAD) mit Beginn vor dem 65. Lebensjahr, und im Gegensatz dazu von den

im senilen Alter auftretenden, meist sporadischen Late Onset AD (LOAD)-Formen (Alzheimer's Association, 2019).

1.4 Sporadische Form der Alzheimer-Krankheit

Die oben genannten Mutationen (im PSEN1- und 2-Gen sowie im APP-Gen) sind nur für unter 1 % aller Alzheimer Erkrankungen verantwortlich – weitaus häufiger ist die sporadische Form der Krankheit (Alzheimer's Association, 2012). Auch bei der sporadischen Form kommt es zu einer Bildung von extrazellulären Plaques und intrazellulären Tau-Fibrillen. Die Ursache ist nicht bekannt, jedoch sind auch hier genetische Faktoren von Relevanz (Alzheimer's Association, 2012). Außerdem erhöhen verschiedene Umweltfaktoren das Risiko einer Erkrankung.

In Hinblick auf die genetischen Risikofaktoren ist der ApoE Genotyp erwähnenswert. Apolipoprotein E ist ein Bestandteil von verschiedenen Lipoproteinen (Giunta et al., 1998). Lipoproteine sind ein Komplex aus Proteinen und Lipiden und dienen dem Transport der hydrophoben Lipide im Blut.

Die Proteine in diesen Komplexen werden als Apolipoproteine bezeichnet. Es gibt verschiedene Apolipoproteine, die dann verschiedene Lipoproteine bilden. Zu den Lipoproteinen gehören unter anderem die als „gutes“ und „schlechtes“ Cholesterin bezeichneten HDL und LDL, sowie VLDL und Chylomikronen (Deutzmann et al., 2012).

Das ApoE Apolipoprotein ist Bestandteil aller genannten Lipoproteine (Giunta et al., 1998).

Das ApoE Gen hat drei Allele: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$. Daraus entstehen verschiedene ApoE Phänotypen, wobei immer zwei Allele einen Genotyp und damit einen Phänotyp bilden. Die Bestimmung des ApoE Genotyps ist von Relevanz zur Einschätzung des kardiovaskulären Risikos, und spielt auch in der Alzheimer-Forschung eine Rolle: das Allel $\epsilon 4$ ist ein Risikofaktor für die senile, das heißt, spät ausbrechende Form der Alzheimer Demenz (Giunta et al., 1998).

Neben den genetischen Faktoren gibt es verschiedene weitere Risikofaktoren für das Auftreten der sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit. Der wichtigste Risikofaktor ist das Alter. Je älter der Mensch, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass er eine Alzheimer Demenz entwickelt: die meisten Patienten mit Alzheimer sind 85 Jahre oder älter (Hebert et al., 2003). Die Alzheimer-Krankheit ist aber keine physiologische Folge des Alterns und kann auch bei jungen Menschen auftreten.

Außer der Genetik und dem Alter können eine Reihe weiterer Faktoren die Wahrscheinlichkeit einer Alzheimer-Krankheit erhöhen. Dazu gehören auch die bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren, wie ein erhöhter Cholesterinspiegel und Übergewicht (Alzheimer's Association, 2012). Als weitere Risikofaktor werden Kopftraumata diskutiert (Plassman et al., 2000). Plassman et al. (2000) untersuchten in einer historischen prospektiven Studie das Auftreten einer Demenz bei ehemaligen US Navy und Marine Soldaten, die während des zweiten Weltkriegs aufgrund von Kopfverletzungen im Krankenhaus behandelt wurden. Die Studie zeigte, dass das Risiko für eine Alzheimer-Demenz oder andere Form einer Demenz

durch Kopfverletzungen im jungen Erwachsenenalter zunimmt – und dies insbesondere, wenn diese Verletzungen schwer waren (Plassman et al., 2000).

Seit einigen Jahren steht auch Aluminium unter Verdacht, das Auftreten einer Alzheimer-Krankheit zu begünstigen (Tomljenovic, 2011).

Aluminium ist ein Metall, das neurotoxisch wirkt (Walton, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass Alzheimer-Patienten mehr Aluminium absorbieren, und so erhöhte Aluminium-Plasmalevel haben (P. B. Moore et al., 2000). Auch die Aufnahme von Aluminium in das Hirngewebe ist gesteigert. Die Neurone im Gehirn eines Alzheimer-Patienten zeigen zunächst eine erhöhte Stoffwechselaktivität, wofür sie Eisen brauchen. Da die Aluminium-Ionen den Eisen-Ionen ähneln und die Neurone bei beginnender Alzheimer-Pathologie in ihrer Funktion gestört sind, verwechseln sie gewissermaßen die Aluminium-Ionen mit den eigentlich benötigten Eisen-Ionen (Walton, 2013).

Der Zusammenhang zwischen Aluminium-Aufnahme und der Entwicklung neurokognitiver Defizite wurde auch am Rattenmodell untersucht. Hierbei ließen sich kognitive Defizite und neuropathologische Veränderungen, die denen der Alzheimer-Pathologie ähneln, bei Ratten feststellen, welchen Aluminium mit der Nahrung oder dem Wasser zugeführt wurde (P. B. Moore et al., 2000). Vermutet wird, dass Aluminium-Ionen die Entstehung der Plaques und Neurofibrillen beeinflussen (Walton, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass in Neuronen mit erhöhten Aluminiumwerten auch vermehrt Neurofibrillen vorkommen (Kowall et al., 1989; Kushkuley et al., 2010). Dabei ist bislang allerdings unklar, welcher Prozess dem anderen vorausgeht (Walton, 2006).

Erhöhte Aluminium-Werte im Gehirn von Patienten mit Alzheimer-Krankheit wurden in verschiedenen Studien gezeigt, mit den Neurofibrillen scheint es auch einen Zusammenhang zu geben, in den senilen Plaques konnte das Metall jedoch nicht festgestellt werden (Krämer & Förstl, 2008; Mirza et al., 2017). Inwiefern Aluminium die Entstehung der pathologisch relevanten Veränderungen bei Alzheimer-Krankheit beeinflusst, ist folglich nicht abschließend geklärt.

Es gibt zahlreiche weitere diskutierte Risikofaktoren für das Auftreten der Alzheimer-Krankheit. Auch Infektionen mit Viren, vor allem Herpesviren, werden diskutiert, da diese in der Lage sind, die DNA zu verändern (Krämer & Förstl, 2008).

Zusammengefasst kann man sagen: die genaue Ursache der sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit ist weiterhin nicht geklärt. Genetische Faktoren erhöhen jedoch die Wahrscheinlichkeit, zu erkranken, und viele verschiedene Umweltfaktoren führen dann zum tatsächlichen Ausbruch (Krämer & Förstl, 2008).

1.5 Leichte kognitive Störung als Vorstufe der Demenz

Die leichte kognitive Störung, kurz MCI (englisch für mild cognitive impairment), beschreibt kognitive Defizite, die die Diagnosekriterien einer Demenz nicht erfüllen und insbesondere keine Alltagsrelevanz zeigen (Herukka et al., 2005; Möller et al., 2015). Sie kann gewissermaßen als Vorstufe der Demenz betrachtet werden, denn die betroffenen Patienten haben ein hohes Risiko, im Verlauf die Kriterien einer Demenz zu erfüllen. Am häufigsten entwickelt sich aus der leichten kognitiven Störung eine Alzheimer-Demenz (Herukka et al., 2005; Möller et al., 2015). Der Begriff MCI wurde von Reisberg et al. (1988) eingeführt. Patienten mit leichter kognitiver Störung zeigen Defizite, die über das für das Alter physiologische Ausmaß hinausgehen (Vega & Newhouse, 2014). Die Diagnose einer solchen Störung, die eine Art „Zwischenstadium“ zwischen normalem Alterungsprozess und Demenz darstellt, ist eine Herausforderung – wann ist der Abbau kognitiver Funktionen physiologisch und wann nicht? Petersen (2004) untersuchte diese Problematik und zeigte die Komplexität der Diagnosestellung: so gibt es keine harten Grenzen zwischen normalem Altern, leichter kognitiver Störung und sehr leichtgradiger Demenz, vielmehr überlappen diese Stadien in ihren klinischen Charakteristika (siehe Abbildung 3) (Petersen, 2004).

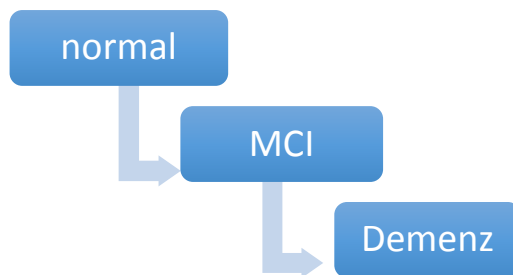


Abbildung 3: Kontinuum von normalem Altern hin zur Demenz, mit Überlappen der Grenzen zwischen normalem Altern, MCI und Demenz. Eigene Abbildung, angelehnt an Petersen et al. (2004).

Der typische MCI Patient hat ein eingeschränktes Erinnerungsvermögen, wobei andere kognitive Funktionen noch relativ unberührt sind. Peterson unterscheidet verschiedene MCI Subtypen, wobei der eben beschriebene den amnestic MCI Typ darstellt. Amnestic MCI ist der häufigste Subtyp. Amnestic ist englisch für „amnestic“ und bedeutet „die Amnesie (den Gedächtnisverlust) betreffend“. Bei diesem MCI Typ ist also das Gedächtnis beeinträchtigt. Daneben gibt es noch die non-amnestic MCI Patienten, die sich dadurch auszeichnen, dass das Erinnerungsvermögen nicht beeinträchtigt ist (Petersen, 2004). Bei den non-amnestic MCI Patienten sind andere kognitive Fähigkeiten eingeschränkt, wie Sprache, exekutive Funktionen und Visuokonstruktion (Petersen et al., 2014). Man kann diese beiden Subtypen weiter unterteilen in „Single Domain“, wobei nur eine kognitive Domäne betroffen ist, und

„Multiple Domain“, wenn mehrere kognitive Bereiche beeinträchtigt sind (siehe Abbildung 4) (Petersen et al., 2014).

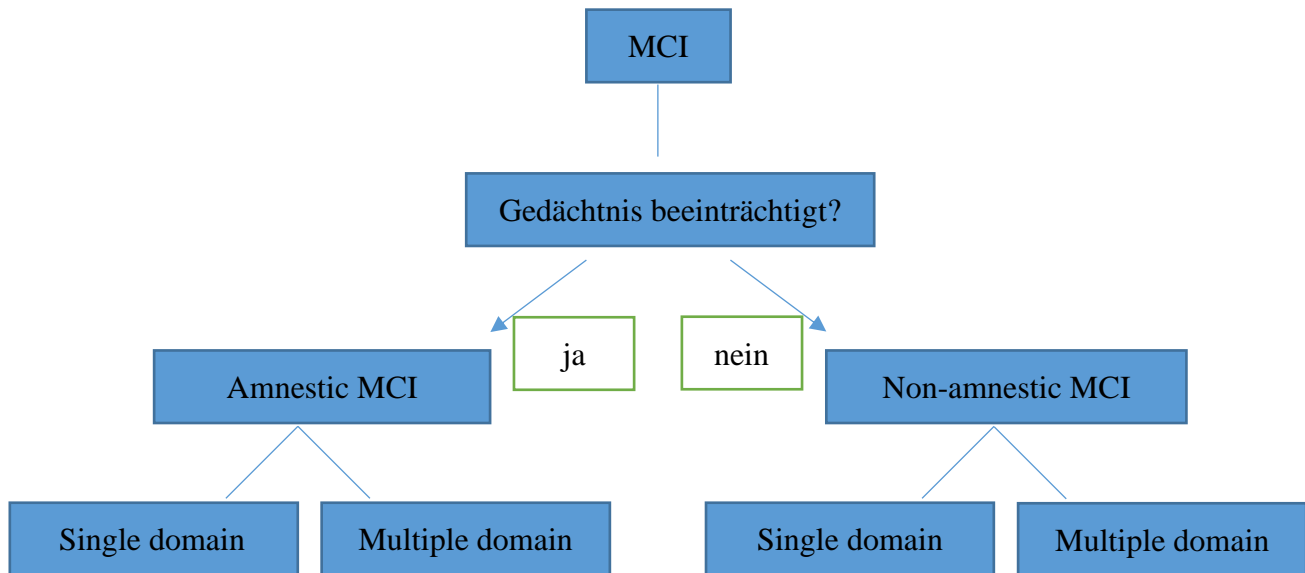


Abbildung 4: Subtypen der leichten kognitiven Störung (=MCI). Eigene Abbildung, angelehnt an Petersen et al. (2014).

Nach Albert et al. (2011) & Petersen et al. (2014) lauten die Diagnosekriterien für eine leichte kognitive Störung folgendermaßen:

- Selbst- oder fremdanamnestisch kognitive Beschwerden
- Objektiv bestätigte kognitive Beschwerden
- Funktionale Fähigkeiten noch erhalten
- Keine Demenz

(Albert et al., 2011; American Psychiatric Association, 2013; Lopez-Anton et al., 2015; Petersen et al., 2014)

Mit funktionalen Fähigkeiten sind Fähigkeiten gemeint, die im Alltag ausgeführt werden müssen, um unabhängig von fremder Hilfe zu sein, wie zum Beispiel Einkaufen, Kochen und Rechnungen bezahlen. MCI Patienten mögen hier zwar leichtgradige Probleme zeigen, verrichten die Tätigkeiten langsamer oder weniger effektiv, behalten dabei aber grundsätzlich ihre Unabhängigkeit bei (Albert et al., 2011).

Die Diagnose der leichten kognitiven Störung kann durch die genannten Kriterien gestellt werden (Albert et al., 2011). Zur Objektivierung der kognitiven Beschwerden eignen sich neuropsychologische Testbatterien.²

In vorliegender Arbeit wurde zusätzlich zu den Kriterien von Albert et al. (2011) die CDR (Clinical Dementia Rating Scale) zur Diagnose der leichten kognitiven Störung herangezogen. Die CDR ist eine klinische Skala zur Erfassung des Schweregrads eines dementiellen Syndroms. Eine Gesamt-CDR von 0,5 bedeutet, dass der Patient zwar kognitive Auffälligkeiten zeigt, jedoch die Diagnosekriterien einer Demenz noch nicht erfüllt (fragliche Demenz). Patienten mit einer CDR von 0,5 können als Patienten mit einer leichten kognitiven Störung eingestuft werden, sofern auch die obengenannten Kriterien erfüllt sind (Petersen, 2004).

MCI Patienten haben ein hohes Risiko, eine Demenz zu entwickeln. Allein anhand der Klinik lässt sich schwer beurteilen, welche Form der Demenz entstehen wird. Man geht davon aus, dass MCI Patienten vom amnestischen Typ (amnesic MCI) ein höheres Risiko haben, in eine Alzheimer-Demenz überzugehen, als die vom nicht-amnestischen Typ (non-amnesic MCI), aus denen sich eher eine Demenz mit Lewy-Körperchen- oder eine Frontotemporale Demenz entwickelt (Vega & Newhouse, 2014). Andere Studien konnten dies jedoch nicht belegen, sondern zeigten, dass einer Lewy Body Demenz sowohl eine amnestische wie auch eine nicht-amnestische MCI Phase vorausgehen kann (Molano et al., 2010).

Es wird ersichtlich, dass eine klinische Untersuchung allein nicht ausreicht, um MCI Patienten, die eine Alzheimer Pathologie haben, zu erkennen.

Die Nachfrage nach Biomarkern, die eine beginnende Alzheimer Pathologie erkennen können, ist groß – und sie wird noch größer werden, wenn neue Medikamente auf den Markt kommen, die den degenerativen Prozess der Krankheit aufhalten oder verlangsamen können (Blennow & Hampel, 2003). Es laufen viele vielversprechende Medikamentenstudien, wie Studien zu einer Impfung gegen die Alzheimer Pathologie, oder zu Sekretasehemmern, die die pathogenetisch bedeutsamen und oben erwähnten Sekretasen hemmen. Es ist offensichtlich, dass diese Medikamente früh im Krankheitsprogress eingesetzt werden müssen, am besten dann, wenn die Symptome die Alltagskompetenz noch nicht einschränken – also im Stadium der leichten kognitiven Störung (MCI) (Blennow & Hampel, 2003). Um früh eingreifen zu können, muss man die Krankheit früh diagnostizieren können, wofür sich die Bestimmung von Biomarkern eignet.

1.6 Rolle der Neuroinflammation in der Entstehung der Alzheimer-Krankheit

Extrazelluläre Amyloid-Plaques und intrazelluläre Neurofibrillen sind das neuropathologische Korrelat der Alzheimer-Krankheit. Eine wichtige Rolle in deren Entstehung spielt die Neuroinflammation, das heißt, die Aktivierung des lokalen Immunsystems im ZNS. Beteiligt an diesem Prozess sind vor allem die Mikrogliazellen (Solito & Sastre, 2012).

² Siehe Kapitel 1.7.1

Die Mikroglia gehören zu den Gliazellen. Gliazellen sind abzugrenzen von den Neuronen, kommen in vielen Arten vor und haben vielfältige Funktionen im sich entwickelnden und reifen Nervensystem (K. R. Jessen, 2004), wie zum Beispiel den Transport von Stoffwechselprodukten aus dem ZNS (N. A. Jessen et al., 2015). Zu den Gliazellen gehören unter anderen die Astrozyten, die Oligodendrozyten und die bei der Inflammation beteiligten Mikroglia. Diese können als Makrophagen des Gehirns und Rückenmarks bezeichnet werden und stellen die erste Antwort des angeborenen Immunsystems dar (Obulesu & Jhansilakshmi, 2014).

Wie erwähnt, spielen Mikroglia im Rahmen der Neuroinflammation eine wichtige Rolle in der Genese der Alzheimer-Krankheit: zum einen produzieren sie Entzündungsmediatoren und tragen so zur Neurodegeneration bei, zum anderen produzieren sie Antikörper gegen β -Amyloid und stimulieren den Abbau der Amyloid-Plaques (Cai et al., 2014).

Die Neuroinflammation ist die Reaktion des Gehirns auf eine Gewebeschädigung, den Untergang von Neuronen oder auf eingedrungene Erreger. Es werden Immunzellen aktiviert, die dann verschiedenen Mediatoren wie Zytokine und Chemokine sezernieren. Dies dient dem Schutz des zentralen Nervensystems vor einer weiteren Schädigung oder einer Infektion (Zhang & Jiang, 2015). Unter dem Begriff der Zytokine werden verschiedene Peptide zusammengefasst, die unter anderem der Kommunikation der an der immunologischen Reaktion beteiligten Zellen dienen. Zu diesen Peptiden gehören die Interleukine. Chemokine sind Peptide, die als chemischer Botenstoff fungieren und so weitere Immunzellen zum Ort des Geschehens locken können.

In dem in vorliegender Arbeit verwendeten blutbasiertem Biomarker-Panel sind sowohl ein Interleukin (IL-18) wie auch ein Chemokin (MCP-1) vertreten. Das ebenfalls im Panel enthaltene TGF- β ist auch an der Neuroinflammation beteiligt, hat aber zu den genannten Zytokinen eine gegensätzliche Funktion, indem es die Inflammation hemmt (Chao et al., 1994). Die Aktivierung der Immunzellen und die Freisetzung der genannten Mediatoren ist zwar ein Schutzmechanismus des ZNS, jedoch ist die immunologische Reaktion des Gehirns nicht sehr spezifisch. Sie richtet sich auch gegen Selbstantigene und trägt so zur Hirnschädigung bei (Gendelman, 2002). Im Fall der Alzheimer-Krankheit wird die Inflammation durch die Degeneration von Neuronen und die Ablagerung von Plaques und Neurofibrillen im Hirngewebe ausgelöst (Heneka et al., 2010). Sie ist auch hier ein fehlgeleiteter Schutzmechanismus des Gehirns und trägt zur Progression und Chronifizierung der Krankheit bei (Heneka et al., 2010). So fördern die ausgeschütteten Zytokine und Chemokine unter anderem die Bildung von β -Amyloid aus dem Amyloid Precursor Protein (Heneka et al., 2010). Die Neuroinflammation fördert also die Plaquentstehung. Die Plaques führen zur Neurodegeneration, und beides führt wiederum zur Neuroinflammation, wodurch ein Circulus vitiosus entsteht (siehe Abbildung 5) (Cai et al., 2014).

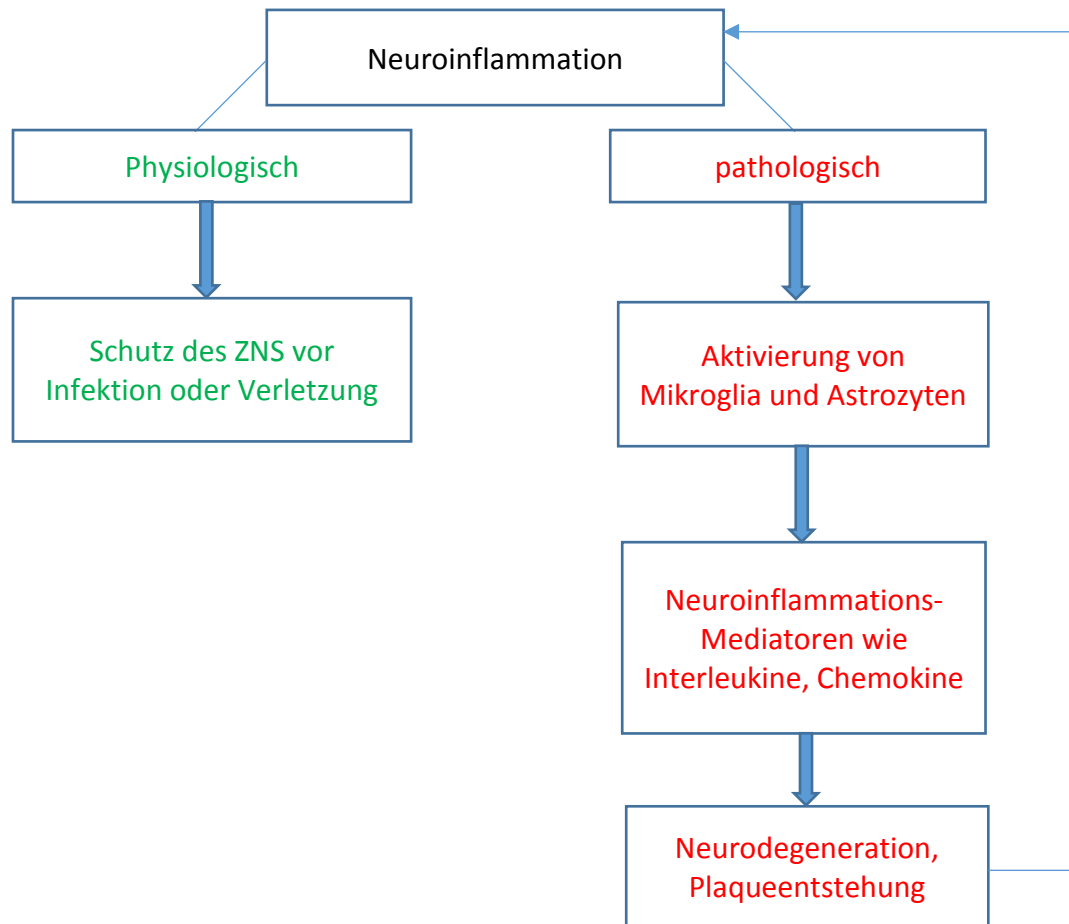


Abbildung 5: Neuroinflammation als physiologischer und als pathologischer Prozess. Eigene Abbildung, angelehnt an Obulesu & Jhansilakshmi (2014).

1.7 Diagnostik der (Alzheimer-) Demenz

1.7.1 Klinische Diagnostik

Der diagnostische Prozess beginnt zunächst mit der klinischen Diagnose eines dementiellen Syndroms oder einer leichten kognitiven Störung. Wichtig hierfür ist neben der Anamnese und dem psychopathologischen Befund vor allem die neuropsychologische Testung.

Es gibt neuropsychologische Screeningtests, das heißt kurze Testverfahren, die im klinischen Alltag durchgeführt werden und auf demenzielle Veränderung hinweisen können. Zu diesen kurzen Tests gehört der MMST, kurz für Mini-Mental-Status-Test (Skorga & Young, 2015).

Der MMST prüft die kognitive Funktion des Patienten. Unter der kognitiven Funktion versteht man verschiedene psychologische Funktionen des Patienten. Dazu gehören die Aufmerksamkeit, exekutive Funktionen, die Sprache, das Gedächtnis, die Orientierung, motorische Fähigkeiten und die Gnosie, das heißt, das Erkennen und Benennen können von Objekten und Gesichtern (Norris et al., 2016).

Der MMST ist verfügbar in vielen verschiedenen Sprachen, leicht durchzuführen und daher gut geeignet als Screening Instrument. Allerdings ist der Test nicht geeignet, um alleine den Progress von einer leichten kognitiven Störung zu einer Demenz zu erfassen (Skorga & Young, 2015). Außerdem sollte er nicht allein zur Diagnosestellung einer leichten kognitiven Störung verwendet werden (Mitchell, 2009). Dafür benötigt man unter anderem ausführlichere Tests, beziehungsweise Testbatterien.

Zu diesen gehört die sogenannte „CERAD Neuropsychologische Testbatterie (CERAD NAB)“, CERAD steht für „Consortium to Establish a Registry for Alzheimer’s Disease“, NAB steht für „Neuropsychological Assessment Battery“ (Möller et al., 2015). Die CERAD NAB umfasst verschiedene Tests, die Patienten mit leichtgradiger Alzheimer-Demenz von normal alternden Menschen unterscheiden können (Sotaniemi et al., 2012). Die Testbatterie wurde konstruiert, um kognitive Defizite, die durch eine Alzheimer-Krankheit verursacht werden, erkennen zu können (Sotaniemi et al., 2012). Um dies zu erreichen, erfasst die CERAD NAB Hirnleistungen in denjenigen Funktionsbereichen, in denen bei der Alzheimer-Demenz kognitive Defizite vorliegen. Alle Subtests können Alzheimer-Patienten von gesunden Kontrollen signifikant unterscheiden (Karrasch et al., 2005).

Wie oben beschrieben, geht der Demenz meist eine leichte kognitive Störung (MCI) voraus. Ob sich die CERAD NAB auch zur Unterscheidung zwischen gesunden Individuen und MCI-Patienten eignet, wurde in einigen Studien untersucht (Barth et al., 2005; Karrasch et al., 2005; Sotaniemi et al., 2012). Karrasch et al. (2005) zeigten, dass sich nicht alle Subtests der Batterie dazu eignen, MCI Patienten von Kontrollen zu trennen. Zur signifikanten Unterscheidung eignete sich nur der das Episodische Gedächtnis prüfende „Wortliste Lernen“-Test (Karrasch et al., 2005). Barth et al. (2005) konnten Patienten mit leichter kognitiver Störung von normal alternden Kontrollen ebenfalls durch Aufgaben zum Episodischen Gedächtnis (Wortliste Lernen, Wortliste Abrufen, Konstruktive Praxis Abrufen) der CERAD NAB trennen (Barth et al., 2005). Bei den Untertests „Wortliste Lernen“ und „Wortliste Abrufen“ wird das verbale Langzeitgedächtnis geprüft. Der Arzt zeigt dem Patienten zehn alltäglich Wörter, welche dieser ablesen soll. Direkt im Anschluss soll der Patient alle Wörter, an die er sich erinnert, aufsagen (Wortliste Lernen). Dann werden zunächst andere Untertests durchgeführt, um nach einigen Minuten erneut nach den zehn Wörtern zu fragen (Wortliste Abrufen).

Wie erwähnt, eignet sich auch die CDR in Kombination mit den Kriterien von Petersen et al. (2014) für die Diagnose einer leichten kognitiven Störung³. Bei den in die Studie eingeschlossenen Patienten wurde die Diagnose „MCI“ bei Erfüllen dieser Kriterien und einer erreichten CDR-Punktzahl von 0,5 gestellt.

³ Siehe Kapitel 1.5

1.7.2 Liquor basierte Diagnostik und Bildgebung

Da das Nervenwasser (Liquor cerebrospinalis, kurz Liquor) in direktem Kontakt zum Extrazellulärraum des Gehirns steht und die bereits erwähnten pathogenetisch bedeutsamen Peptide Amyloid $\beta(1-42)$ und Tau in den Liquor sezerniert werden, eignet sich dieser für die Alzheimer-Diagnostik (Blennow & Hampel, 2003). Charakteristisch für die Alzheimer-Krankheit ist dabei ein erniedrigtes A β 42 und ein erhöhtes Tau-Protein – und zwar schon im Stadium der leichten kognitiven Störung (Herukka et al., 2005).

Es gibt verschiedene Hypothesen, warum das A β 42 im Liquor reduziert ist. Vermutlich liegt der Grund darin, dass das Peptid vermehrt in den Plaques akkumuliert, und dadurch weniger ins Nervenwasser gelangt. Möglich ist auch, dass der Abfall des Peptids die Degeneration von Neuronen, die es produzieren, reflektiert (Samuels et al., 1999).

Die Untersuchung des Liquors ist also dazu geeignet, die Alzheimer-Pathologie früh aufzudecken, sie ist aber kein ideales Diagnostikum, denn man muss dazu eine Lumbalpunktion durchführen. Diese ist relativ invasiv und bei älteren Patienten nicht immer möglich (Nagaraj et al., 2017).

Auch mithilfe der bildgebenden Diagnostik, insbesondere der PET, können diejenigen MCI-Patienten, deren kognitive Defizite durch die Alzheimer Pathologie verursacht werden, früh erkannt werden (Palmqvist et al., 2015).

Die PET, kurz für Positronen-Emissions-Tomographie, kann mithilfe verschiedener Radiopharmaka, auch Tracer genannt, biochemische Funktionen des Organismus sichtbar machen. Die Radiopharmaka sind, wie es der Name sagt, radioaktiv markiert, wodurch deren Verteilung im Körper durch das PET-Gerät verfolgt werden kann. Die zur Diagnose der Alzheimer-Krankheit eingesetzten Radiopharmaka visualisieren die Amyloid- und Tau-Pathologie (Palmqvist et al., 2015). Das am meisten verbreitete Radiopharmakon ist ¹¹C-PiB, das mit hoher Affinität an Bestandteile der Amyloid-Plaques bindet (Rowe & Villemagne, 2013).

Die Bildgebung ist weniger invasiv als die Lumbalpunktion, aber auch die PET ist nicht das ideale Diagnostikum: Vor allem durch die Strahlenbelastung und die hohen Kosten eignet sich die Bildgebung nicht als Screening Instrument (Nagaraj et al., 2017).

1.7.3 Diagnostische Kriterien der Alzheimer-Krankheit

Vor über 36 Jahren, nämlich im Juli 1984, veröffentlichten das „National Institute of Neurology and Communicative Disorders and Stroke“ und die „Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association“ (heute die Alzheimer’s Association) die bis 2011 am weitesten verbreiteten diagnostischen Kriterien für die Alzheimer-Krankheit (Dubois et al., 2007; G. McKhann et al., 1984).

In diesen Kriterien wurde nicht nur der für die Alzheimer-Krankheit typische Phänotyp gefordert, das heißt, eine progrediente Demenz, sondern auch spezifische

neuropathologische Veränderungen, die erst postmortal im Hirngewebe festgestellt werden können (Dubois et al., 2010).

Nur wenn die Pathologie der Krankheit postmortal nachgewiesen werden konnte, sprach man von einer „definitiven“ Alzheimer-Krankheit (definite AD) (Dubois et al., 2007).

Bei für die Alzheimer-Krankheit typischer Klinik und entsprechenden Befunden im Nervenwasser oder der Bildgebung ohne Ergebnisse einer histopathologischen Untersuchung, wurde von einer „wahrscheinlichen“ Alzheimer-Krankheit (probable AD) gesprochen (Dubois et al., 2007).

Im Jahr 2011 wurden diese Kriterien überarbeitet, und zwar sowohl von der Alzheimer's Association als auch vom National Institute on Aging. Im Rahmen dieser Überarbeitung kam es vor allem zu einer Aktualisierung der klinischen Kriterien als Grundpfeiler für die Diagnose der AD Demenz in der klinischen Praxis. Allerdings wurde bereits mehr Augenmerk auf die Biomarker gelegt. Mit dem Begriff Biomarker sind sowohl die Ergebnisse der Liquoruntersuchung wie auch die der MRT- und PET-Bildgebung gemeint. Die 1984 etablierten Begriffe der „möglichen“ und „wahrscheinlichen“ Demenz vom Alzheimer-Typ wurden beibehalten. Allerdings wurde eine dritte Gruppe definiert: Mögliche oder wahrscheinliche AD Demenz mit Nachweis des pathophysiologischen Prozesses der Alzheimer Krankheit. Hiermit waren der Nachweis von Biomarkern in vivo gemeint. Diese dritte Gruppe wurde für Forschungszwecke etabliert (G. M. McKhann et al., 2011).

Sieben Jahre später, also im Jahr 2018, wurden die Kriterien erneut aktualisiert. Dieses Mal als reine Kriterien für die Forschung und nicht für den klinischen Alltag, sodass man von einem „Forschungsrahmenwerk“ spricht. Die Alzheimer-Krankheit wird hier durch ihre zugrundeliegenden pathologischen Prozesse definiert, die durch die postmortale Obduktion oder in vivo durch Biomarker evident werden können. Somit beruht die Diagnose der Krankheit laut der Forschungskriterien nicht mehr auf dem klinischen Erscheinungsbild des Patienten, sondern auf dem Nachweis von Biomarkern, die für die Krankheit spezifisch sind. Mit jeder Aktualisierung der Kriterien kommt es also zu einer weiteren Verschiebung der Definition der Alzheimer-Krankheit bei lebenden Patienten von einem syndromalen hin zu einem biologischen Konstrukt (Jack Jr et al., 2018).

Die Alzheimerklassifikation von 2018 nach NIA-AA ist in unten dargestellter Tabelle gezeigt (siehe Tabelle 1). Diese wird auch als AT(N)-Klassifikation bezeichnet. Mit „A“ werden die Biomarker der A β -Plaques bezeichnet, also der Nachweis des β -Amyloids im PET oder im Nervenwasser. Die Biomarker von Tau („T“) sind ein erhöhtes pTau im Liquor oder die Darstellung der Neurofibrillen im PET. A und T gelten als spezifisch für die Alzheimer-Krankheit. Mit „N“ werden unspezifische Biomarker der Neurodegeneration im MRT, im FDG-PET oder als totales Tau im Liquor bezeichnet.

A	T	N	Interpretation
-	-	-	Normale Alzheimer-Biomarker
+	-	-	Pathologische Alzheimer-Veränderungen, nicht als Alzheimer-Krankheit bezeichnet
+	+	-/+	Alzheimer-Krankheit
+	-	+	Pathologische Alzheimer-Veränderungen, nicht als Alzheimer-Krankheit bezeichnet
-	+/-	-/+	Keine Alzheimer-Pathophysiologie

Tabelle 1: ATN-System. Positive Aβ-Biomarker bedeuten Alzheimer-Veränderungen, bei zusätzlich pathologischen Tau Biomarkern spricht man von der Alzheimer-Krankheit. Eigene Tabelle, angelehnt an Jack Jr et al. (2018).

Die aktuellen Kriterien beinhalten Biomarker im Nervenwasser und in der Bildgebung. Seit Jahren wird an blutbasierten Biomarkern geforscht, bislang mit begrenztem Erfolg. Auf Forschungsergebnisse und mögliche Biomarker der Zukunft wird im Folgenden eingegangen.

1.7.4 Blut basierte Diagnostik

Eine blutbasierte Diagnostik würde die Diagnose der Alzheimer Krankheit erleichtern. Blutbasierte Marker sind günstig, wenig zeitaufwendig und geeignet für Verlaufs- und Therapieerfolgskontrollen (O’Byrant et al., 2017).

Durch das Entdecken neuer, für die Pathogenese der Alzheimer-Krankheit relevanter Biomarker, eröffnen sich außerdem neue Türen für mögliche therapeutische Angriffspunkte. Pathogenetische Komponenten der Krankheit können sowohl diagnostisch wie auch therapeutisch genutzt werden (Goetzl et al., 2015).

In zahlreichen Studien wurde bereits nach einem blutbasierten Biomarker gesucht – bisher allerdings nur mit begrenztem Erfolg.

Naheliegender war es, einen Biomarker zu finden, der mit der Aβ42- und Tau-Pathologie in Zusammenhang steht.

In der Framingham Heart Study wurde 2014 ein signifikanter Zusammenhang zwischen reduziertem Aβ42 im Plasma und später auftretender Alzheimer Demenz festgestellt (Chouraki et al., 2015). Auch die Untersuchung des Aβ1-42/Aβ1-40 Quotienten im Plasma zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit dem Risiko für eine beginnende Alzheimer Krankheit und einer Demenz (Chouraki et al., 2015).

Jedoch zeigte sich in Metaanalysen verschiedener ähnlicher Studien eine große Heterogenität in den Ergebnissen (Chouraki et al., 2015; Toledo et al., 2013).

Aufgrund dieser Heterogenität benötigt man weitere Forschung, um beurteilen zu können, inwieweit sich die Biomarker der Amyloid Pathologie, das heißt Aβ1-42 und Aβ1-40, zur Diagnose der Alzheimer-Krankheit im Blut eignen. Faktoren wie das Alter, die Ernährung und verwendete Labormethoden könnten für die Heterogenität verantwortlich sein (Snyder et al., 2014; Toledo et al., 2013). Um Aβ1-42 und Aβ1-40 als Plasma-basierte Biomarker verwenden

zu können, sind daher standardisierte Protokolle für die präanalytischen und analytischen Prozesse in Studien erforderlich (Toledo et al., 2013).

Es wurden viele weitere potenzielle Biomarker untersucht, zum Beispiel befassten sich viele Studien mit den sogenannten microRNAs. MicroRNAs, kurz miRNAs sind kleine, nicht kodierende RNAs, die die Genexpression regulieren. Sie spielen insbesondere eine Rolle beim sogenannten Gene-Silencing (englisch für Gen-Stillegung) (He & Hannon, 2004). Dazu binden die miRNAs an ein Ende einer mRNA und hemmen so die Proteintranslation, das heißt, die Übersetzung der messenger RNA in ein Protein (Filipowicz et al., 2005). Die miRNAs greifen also in die Genexpression ein, wenn die Transkription bereits stattgefunden hat. Die Transkription ist die Übersetzung eines Gens in eine messenger RNA (mRNA). Diese mRNA gelangt dann zu den Ribosomen, an denen die Translation stattfindet. Dabei werden jeweils drei Basenpaare in eine Aminosäure übersetzt, wobei mehrere Aminosäuren ein Peptid, und mehrere Peptide ein Protein ergeben. Sollen bestimmte Proteine nicht hergestellt werden, greifen die miRNAs ein, binden an die fertige mRNA und verhindern den Prozess der Translation (Deutzmann et al., 2012).

Tan et al. (2014) untersuchten, ob sich die microRNAs 125 b, 181c und 9 zur Diagnostik der Alzheimer-Krankheit eignen (Tan et al., 2014). In ihrer Studie war die Konzentration von miRNA 125b und miRNA181 c im Blut von Patienten mit klinisch diagnostizierter, mittelschwerer Alzheimer-Demenz signifikant niedriger als im Blut von gesunden, neurologisch unauffälligen Kontrollen. Die Individuen in den verglichenen Gruppen waren jeweils über 65 Jahre alt. Die Konzentration von miRNA-9 war signifikant höher. Sie wiesen jedoch daraufhin, dass in anderen Studien eine reduzierte Konzentration von miRNA-9 beobachtet wurde (Tan et al., 2014). Dies führten sie darauf zurück, dass ihre Studienpopulation einen anderen geographischen Hintergrund hatte als die der Studien, die gegensätzliche Ergebnisse zeigten (Tan et al., 2014). Das Profil der miRNAs könnte also abhängig sein von der Population, aus der der Patient stammt, und eine Veränderung der Konzentration bestimmter miRNAs könnte so nur vor dem Hintergrund des miRNA Profils der jeweiligen Population beurteilt werden (Tan et al., 2014).

Satoh et al. (2015) identifizierten 27 miRNAs, die bei Patienten mit leicht- bis mittelgradiger Alzheimer-Demenz anders exprimiert waren als bei gesunden Kontrollen. 13 dieser miRNAs waren bei den Alzheimer-Patienten hoch-, 14 herunterreguliert (Satoh et al., 2015). Die Gruppe der Patienten mit Alzheimer-Demenz wurde gebildet von Patienten mit einem Mini-Mental-Status-Test Wert von $18,7 \pm 3,5$, die Gruppe der Kontrollen erreichte einen Wert von $29,3 \pm 1,2$ (Satoh et al., 2015). Zur Bestimmung der miRNAs wurde Vollblut verwendet. Auch sie stellten eine große Heterogenität der Ergebnisse zu miRNAs in verschiedenen Studien fest. Sie führten dies einerseits auf die unterschiedlichen Studienpopulationen wie auch auf die unterschiedlichen Medien zurück, in denen die miRNAs bestimmt wurden. Einige Studien verwendeten Vollblut (Satoh et al., 2015), während andere Serum (L. Cheng et al., 2015) oder Plasma (Sheinerman et al., 2013) verwendeten (Satoh et al., 2015).

Die Ergebnisse der genannten Studien zeigen, dass das miRNA Profil in Patienten mit Alzheimer-Krankheit stark variieren kann, und sich deshalb nur bedingt zur Diagnostik eignet.

Wie oben bereits beschrieben, scheinen Inflammationsprozesse eine relevante Rolle bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit zu haben (Heppner et al., 2015).

Daher ist es naheliegend, an der Inflammation beteiligte Peptide als mögliche Biomarker zu untersuchen. So wählte ©Predemtec AG sechs immun- und neuroregulatorische Proteine aus, die von der Firma in einer Validierungsstudie getestet⁴ und in vorliegender Arbeit evaluiert wurden. Bei besagten Proteinen handelt es sich um BDNF, IGF-1, VEGF, TGF- β , MCP-1 und IL-18. Im Folgenden wird auf alle sechs untersuchten Serum-Biomarker eingegangen.

1.7.4.1 BDNF

BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) ist ein Wachstumsfaktor des Gehirns.

BDNF wurde zunächst im Zusammenhang mit Depressionen untersucht (Schmidt et al., 2011). Dabei stellte sich heraus, dass BDNF ein potenzieller Biomarker für die Major Form (MDD = Major depressive disorder) der Depression ist. Außerdem zeigte sich, dass BDNF die Neurogenese, das heißt die Neubildung von Nervenzellen aus Stammzellen, im Hippocampus induziert (Schmidt & Duman, 2010). Der Hippocampus ist eine Hirnregion, der wichtige Funktionen bei Gedächtnisprozessen zugeschrieben wird. Die von BDNF beeinflusste Neurogenese ist essentiell für die Funktion der Neuronen im Hippocampus, die synaptische Plastizität und Gedächtnisprozesse (Weinstein et al., 2014). Eine gestörte Neurogenese im Hippocampus könnte so nicht nur das Risiko für eine Depression, sondern auch das für die Entwicklung einer Demenz erhöhen. Die Depression stellt außerdem selbst einen Risikofaktor für die Entwicklung einer Alzheimer-Demenz dar und es wurde gezeigt, dass Antidepressiva, die Einfluss auf die Konzentration von BDNF haben, das Fortschreiten der Alzheimer-Demenz verzögern können (Song et al., 2015). Weinstein et al. (2014) stellten an einer Kohorte der Framingham-Studie fest, dass eine Zunahme der BDNF-Konzentration im Serum mit einem erniedrigten Risiko für die Alzheimer-Demenz und andere Demenzen einhergeht (Weinstein et al., 2014). Im Umkehrschluss bedeutet das, dass ein erniedrigtes BDNF-1 einen Risikofaktor für die Entwicklung einer (Alzheimer-)Demenz darstellt. Auch Gezen-Ak et al. (2013) fanden signifikant erniedrigte Werte von BDNF im Serum von Patienten mit mittelschwerer Alzheimer-Demenz (MMST-Wert $16,944 \pm 5,07$ bzw. MMST-Wert $16,883 \pm 5,18$), sowohl bei Erkrankung mit frühem („Early-Onset“), wie auch mit spätem Beginn („Late-Onset“) (Gezen-Ak et al., 2013)

⁴ Siehe Kapitel 1.7.4.6

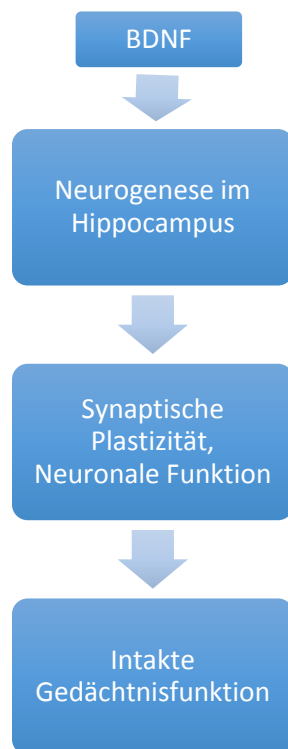


Abbildung 6: Die Rolle des BDNF für die Funktion des Hippocampus und damit des Gedächtnisses. Eigene Abbildung, angelehnt an Weinstein et al. (2014)

1.7.4.2 IGF-1

Ein weiterer der im Panel enthaltenen Biomarker ist der Insulin-Like-Growth-Factor 1 (IGF-1). IGF-1 ähnelt in seiner Struktur dem Insulin und wird vor allem von der Leber produziert. Die Produktion wird stimuliert von Somatotropin (Growth Hormone, GH), das in der Hypophyse entsteht (Deutzmann et al., 2012). IGF 1 wurde vor allem im Zusammenhang mit Diabetes Typ 2 untersucht. Erniedrigte IGF1 Konzentrationen bedeuten ein höheres Diabetes-mellitus-Typ-2-Risiko (Dunger et al., 2003). IGF 1 hat einen Einfluss auf den Insulin-Stoffwechsel, indem es die Insulin-Sensitivität beeinflusst. Erhöhte IGF1 Spiegel senken die Insulin-Resistenz und so das Risiko für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes mellitus (Sandhu et al., 2002). Störungen im Insulin-Metabolismus sind ein wichtiger Einflussfaktor für die Genese der Alzheimer-Krankheit (Ghareeb et al., 2013). Reduzierte IGF-1 Spiegel erhöhen also das Risiko eines Diabetes mellitus Typ 2, und ein Diabetes mellitus Typ 2 erhöht wiederum das Risiko für die Entwicklung einer Alzheimer-Demenz. Westwood et al. (2014) untersuchten den Zusammenhang zwischen der IGF-1-Konzentration im Serum und dem Risiko einer Demenzentwicklung. Sie konnten zeigen, dass ein reduzierter IGF-1 Spiegel mit einem erhöhten Risiko für alle Demenzen und insbesondere für die Alzheimer-Demenz einhergeht (Westwood et al., 2014). Die im MRT untersuchten Hirnvolumina zeigten, dass Patienten mit

höherem IGF-1-Spiegel ein größeres Hirnvolumen hatten. Westwood et al. (2014) schlussfolgerten, dass höhere IGF-1-Spiegel gegen Neurodegeneration schützen.

1.7.4.3 VEGF

Der im Panel enthaltene Marker VEGF ist ein Wachstumsfaktor für Gefäße. VEGF steht für Vascular endothelial growth factor und wird insbesondere dann ausgeschüttet, wenn in einem Gewebe Sauerstoffmangel herrscht. VEGF stimuliert dann das Wachstum neuer Gefäße, so dass die Sauerstoffversorgung wieder ansteigt (Shweiki et al., 1992).

Der Zusammenhang zwischen der Konzentration von VEGF und dem Risiko von neurodegenerativen Krankheiten wie der Alzheimer-Krankheit wurde in vielen Studien untersucht (Huang et al., 2013; Jung et al., 2015). Die Ergebnisse waren dabei allerdings sehr heterogen. Es wurden sowohl negative wie auch positive Korrelationen zwischen der VEGF-Konzentrationen und dem Risiko einer Alzheimer-Krankheit festgestellt (Jung et al., 2015). So zeigten Y.N. Kim & D.H. Kim (2012) erhöhte Serum-Konzentrationen von VEGF bei Patienten mit Alzheimer-Demenz mit Mini-Mental-Status-Werten zwischen 10 und 24 Punkten. Es wurde aber auch von erniedrigten Spiegeln berichtet: Mateo et al. (2007) untersuchten die VEGF-Spiegel im Serum von Patienten mit leicht- bis schwergradiger Alzheimer-Demenz und stellten, unabhängig vom Stadium der Krankheit, reduzierte Werte im Vergleich zu gesunden Kontrollen fest (Mateo et al., 2007). Jung et al. (2015) untersuchten die Serumspiegel von VEGF bei Alzheimer-Patienten mit Depression, solchen ohne Depression und gesunden Kontrollen und stellten fest, dass ein erhöhtes VEGF vor allem ein Zeichen für depressive Symptome bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit ist (Jung et al., 2015). Untersucht wurden Patienten mit einer CDR von 1 bis 3 Punkten, wobei die Gruppe der Patienten mit Alzheimer-Demenz und Depression 1 oder 2 Punkte erreichte, die ohne Depression 1 bis 3. Die Gruppe der Patienten mit Alzheimer-Demenz und Depression zeigte höhere VEGF-Werte als die der Patienten ohne Depression oder die gesunden Kontrollen ($p < 0,035$) (Jung et al., 2015).

In einer großen Metaanalyse aus dem Jahr 2018 konnte weder im Blut noch im Liquor cerebrospinalis ein relevanter Unterschied in der VEGF-Konzentration bei Alzheimer-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen gezeigt werden (Du et al., 2018).

1.7.4.4 TGF- β

Im verwendeten Panel sind sowohl die proinflammatorisch wirkenden Zytokine IL-18 und MCP-1 wie auch das antiinflammatorische Zytokin TGF- β vertreten. Ähnlich wie bei den anderen Proteinen des Panels zeigt sich auch bei TGF- β eine große Heterogenität in den bisherigen Studienergebnissen.

Chao et al. (1994) untersuchten, ob TGF- β im Rahmen der inflammatorischen Prozesse der Alzheimer-Krankheit erhöht ist. Sie bestimmten dazu die Konzentration des Zytokins im Serum

und im Liquor von verstorbenen Patienten, bei denen die Alzheimer-Diagnose histopathologisch bestätigt wurde und stellten, im Vergleich zu Kontrollen, die histopathologisch keine Form einer neurodegenerativen Erkrankung zeigten, erhöhte Werte in beiden Medien fest (Chao et al., 1994). Untersucht wurde außerdem der TGF- β - Spiegel im Serum von lebenden Patienten, in deren Gehirn postmortal die Alzheimer-Krankheit histopathologisch bestätigt werden konnte. Auch hier zeigten sich im Vergleich zu Kontrollen ohne neurologische Symptome signifikant erhöhte TGF- β -Spiegel ($p < 0,01$) (Chao et al., 1994). Huang et al. (2013) befassten sich ebenfalls mit TGF- β und zeigten eine signifikante Reduktion des Faktors im Serum von Patienten mit Alzheimer-Krankheit in unterschiedlichen Stadien (CDR zwischen 0,5 und 3) im Vergleich zu randomisiert ausgewählten Kontrollen ($p < 0,05$). Bei den Kontrollen handelte es sich um ambulante Patienten der neurologischen Abteilung des Xuanwu Krankenhauses in China, die keine dementielle Störung aufwiesen (CDR 0) (Huang et al., 2013). Auch Patienten mit amnestischer leichter kognitiver Störung (aMCI) zeigten reduzierte TGF- β -Spiegel, der Unterschied zu der Kontrollgruppe war hier aber nicht signifikant (Huang et al., 2013). Sie stellten eine positive Korrelation zwischen TGF- β und VEGF fest und vermuteten, dass TGF- β die Expression von VEGF triggert (Huang et al., 2013). Außerdem zeigten sich negative Korrelationen zwischen sowohl Serum VEGF-Werten und der erreichten CDR wie auch zwischen TGF- β -Serumwerten und der CDR (Huang et al., 2013). In einer weiteren Studie wurden keine veränderten Serum-TGF- β -Spiegel bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit in verschiedenen Stadien im Vergleich zu neurologisch unauffälligen Kontrollen gefunden (Rodriguez-Rodriguez et al., 2007).

1.7.4.5 IL-18 und MCP-1

IL-18 und MCP-1 sind proinflammatorisch wirksame Peptide. Interleukin 18 ist ein Zytokin und entscheidend an der zellvermittelten Immunität beteiligt (Dinarello, 1999).

MCP-1, kurz für Monocyte chemotactic protein 1, ist ein Chemokin, das durch seine Funktion als Chemokin Monozyten, T-Zellen und Dendritische Zellen zum Ort der Inflammation lockt (Liu et al., 2014).

IL-18 wie auch MCP-1 schenken bereits viele Studien Beachtung. So stellte eine finnische Forschungsgruppe erhöhte IL 18 RNA Werte im Frontalhirn von Patienten mit Alzheimer-Pathologie fest (Ojala et al., 2009). Chen et al. (2015) untersuchten, ob sich auch die Messung von IL 18 im Blut zur Diagnostik eignet (Chen et al., 2014). Sie konnten zeigen, dass die Konzentration von IL18 im Serum von Patienten mit klinisch diagnostizierter Alzheimer-Demenz ($MMST 11.4 \pm 4$, entspricht bereits fortgeschrittenen Stadien) signifikant höher ist als die von gesunden Kontrollen (p -Wert: 0,002) (Chen et al., 2014).

Auch MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1), das wie IL-18 bei Entzündungsprozessen freigesetzt wird, wurde bereits als potenzieller Biomarker untersucht. Galimberti et al. stellten erhöhte MCP-1-Werte im Serum von MCI-Patienten und Patienten mit leichtgradiger Alzheimer-Demenz fest. (Galimberti et al., 2006). Mit zunehmender Schwere der Demenz

bemerkten sie eine Reduktion der MCP-1-Konzentration (Galimberti et al., 2006). Sie postulierten, dass MCP-1 von Gliazellen in einem frühen Stadium der Krankheit produziert wird, um das β -Amyloid abzutransportieren. Die Versuche des lokalen Immunsystems, das Gehirn vor der Neurodegeneration zu bewahren, scheitern jedoch. Die Plaquentstehung schreitet weiter fort, Neuronen sterben ab, und die Chemo- und Zytokinproduktion, wie die von MCP-1, lässt wieder nach. Dieser Prozess findet im Gehirn statt, beeinflusst aber auch periphere Zellen und führt so im frühen Stadium der Alzheimer-Krankheit zu messbaren Anstiegen und in späteren Stadien zu Abfällen der MCP-1 Konzentration im Serum (Galimberti et al., 2006).

Die Daten zu MCP-1-Serumkonzentrationen bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit sind allerdings widersprüchlich. Einige Studien konnten nicht bestätigen, dass MCP-1 bei Alzheimer-Krankheit im Serum erhöht ist (Fenoglio et al., 2004; Kim et al., 2011). Porcellini et al. (2013) zeigten, dass die biologische Aktivität und die Serum-Konzentrationen von MCP-1 von einem Single Nucleotid Polymorphismus (SNP) im Promotor des MCP-1 Gens reguliert werden. In einigen Studien wurde untersucht, ob dieser SNP einen Risikofaktor für die Alzheimer-Krankheit darstellt. Fenoglio et al. (2004) und Combarros et al. (2004) konnten keinen Zusammenhang zwischen dem SNP im MCP-1 Gen und einem erhöhten Risiko für die Alzheimer-Krankheit feststellen (Combarros et al., 2004; Fenoglio et al., 2004). Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Gegenwart des Polymorphismus mit einem höheren MCP-1-Serum-Level korreliert – und dies vor allem dann, wenn es sich um einen Patienten mit Alzheimer-Krankheit handelt (durchschnittliche MMST Punktzahl in genannter Studie 18,6; entspricht einer mittelschweren Demenz) (Fenoglio et al., 2004).

1.7.4.6 Validierungsstudie der Herstellerfirma ©Predemtec AG

Die genannten sechs Biomarker wurden von der Herstellerfirma des Bluttests, ©Predemtec AG, bereits in einer Validierungsstudie getestet (Schipke et al., 2019).

In dieser Studie befasste sich ©Predemtec AG nicht nur mit der Trennung von AD Patienten und gesunden Kontrollen durch die Biomarker, sondern versuchte, einen Schritt in die Richtung der Optimierung und Standardisierung von Präanalytischen Prozessen sowie von Quantifizierungsmethoden zu gehen. Ein großes Problem der seit Jahren andauernden Suche nach einem blutbasiertem Biomarkertest für die Alzheimerkrankheit ist der Mangel an Reproduzierbarkeit der Forschungsergebnisse – zu einem großen Teil bedingt durch die Tatsache, dass keine einheitlichen Studienprotokolle existieren (Ioannidis, 2005; O’Bryant et al., 2015).

Ungenauigkeiten bei der Blutentnahme sowie das Verwenden von verschiedenen Zusätzen in den Röhrchen, wie Trenngele oder Gleitmittel, können die Ergebnisse verfälschen und sind so eine mögliche Fehlerquelle der Präanalytik bei Labortests. Auch die Quantifizierungsmethoden bedürfen einer Standardisierung, angefangen bei der Blutfraktion, welche für die Testung verwendet wird (Plasma, Serum oder Vollblut) (Bowen et al., 2010; O’Bryant et al., 2016).

Dass inflammatorische Prozesse eine Rolle bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit spielen, wurde in vielen Studien dargestellt (Su et al., 2016; K. A. Walker et al., 2019).

Im Rahmen dieser Kenntnisse wurden von ©Predemtec AG sechs Biomarker gewählt, die immun- oder neuroregulatorisch wirksam sind, nämlich BDNF, VEGF, IL-18, TGF- β , MCP-1 und IGF-1. Die Firma wählte Serum als Zielblutfraktion, da es sich als am besten geeignet für die Immunodetektion von Neurotrophinen und entzündlichen Zytokinen im Allgemeinen erwiesen hat (Khemka et al., 2014).

Die Konzentrationen der Biomarker im Serum wurden mittels ELISA bestimmt. Dabei bestimmte ©Predemtec AG die Konzentrationen sowohl in Röhrchen ohne Zusätze als auch in mit Gel beschichteten Röhrchen (siehe Tabelle 2). Sie stellten fest, dass sich die Durchschnittswerte der meisten Analyte deutlich unterscheiden, wenn man die Konzentrationen sowohl in neutralen Röhrchen als auch in Röhrchen mit Gel misst. Gele in den Röhrchen interagieren mit den Analyten und führen dazu, dass die gemessenen Konzentrationen so gering sind, dass sie beinahe unter der Quantifizierungsgrenze des verwendeten Assays liegen. Die Studie wurde daher mit neutralen Röhrchen ohne trennendes Gel fortgeführt. Die verwendeten Assays und weitere Methoden der Validierungsstudie werden im Methoden-Teil dieser Arbeit⁵ kurz erläutert, da dieselben Quantifizierungsmethoden auch für die Proben aus unserer Forschungsgruppe verwendet wurden.

⁵ siehe Kapitel 2.7

		Average Value (SD)	Coefficient of Variation	Correlation Coefficient
BDNF [ng/ml]	Neutral Tubes	13.21 (9.06)	49.52%	0.688
	Tubes with Gel	18.72 (8.03)***		
IGF-1 [ng/ml]	Neutral Tubes	76.92 (29.74)	10.31%	0.977
	Tubes with Gel	75.15 (30.68)*		
VEGF [pg/ml]	Neutral Tubes	443.35 (408.40)	39.54%	0.862
	Tubes with Gel	598.06 (470.17)***		
TGF-β [ng/ml]	Neutral Tubes	29.45 (33.27)	215.03%	0.665
	Tubes with Gel	27.39 (38.31)*		
MCP-1 [pg/ml]	Neutral Tubes	89.41 (78.93)	31.04%	0.928
	Tubes with Gel	117.55 (79.29)***		
IL-18 [pg/ml]	Neutral Tubes	287.22 (165.36)	9.64%	0.988
	Tubes with Gel	293.04 (171.58)n.s.		

*Tabelle 2: Vergleich der Serumproteingehalte der sechs Analyten bei Verwendung verschiedener Blutentnahmeröhrchen. Gezeigt sind die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen in Röhrchen mit und ohne Gelzusatz. Außer bei IL-18 ist der Variationskoeffizient sehr hoch und der Korrelationskoeffizient niedrig. *** (p<0,001), ** (p<0,01) und * (p<0,05); Tabelle aus Schipke et al. (2019).*

Um zu testen, ob die gewählten Biomarker die Alzheimer-Krankheit erkennen können, schloss ©Predemtec AG 81 AD Patienten im Alter von 57-95 Jahren und 79 gesunde Kontrollen im Alter von 60-70 Jahren in die Studie ein. Der mittlere MMST-Score der AD-Patienten betrug 18, so dass die Mehrheit der Patienten als mittelschwer dement eingestuft werden konnte. Die Kontrollgruppe wurde nicht kognitiv getestet.

Zunächst wurde geprüft, ob jeder der Biomarker allein genommen die Patienten von den gesunden Kontrollen trennen kann (siehe Tabelle 3). Die AD-Gruppe und die Kontrollgruppe unterschieden sich signifikant in Bezug auf alle Biomarker außer VEGF. Dabei waren BDNF, IGF-1, TGF-β und MCP-1 reduziert und IL-18 erhöht im Vergleich zu den Kontrollen. VEGF war zwar auch reduziert, der Unterschied war hier aber nicht signifikant.

Gruppe	N	BDNF [ng/ml]	IGF-1 [ng/ml]	VEGF [pg/ml]	TGF-β [ng/ml]	MCP-1 [pg/ml]	IL-18 [pg/ml]
Kontrollen	79	25.0 (±7.2)	95.4 (±24.1)	409.6 (±225.1)	31.4 (±8.4)	126.4 (±61.5)	238.6 (±101.9)
AD	81	11.1 (±7.9)***	66.6 (±32.3)***	465.7 (±581.1)	20.9 (±18.2)***	79.3 (±130.4)**	324.8 (±282.9)*

Tabelle 3: Serumproteinspiegel der sechs Biomarker bei Kontrollpersonen und AD-Patienten. Die Daten sind als Mittelwert (± S.D.) dargestellt. *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001. AD: Alzheimer’s disease. Tabelle aus Schipke et al. (2019).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Konzentrationen der Biomarker bei Alzheimer Patienten im Vergleich zu normalen Kontrollen in eine bestimmte Richtung verändert sind (siehe Tabelle 4). Wenn diese Veränderungen spezifisch für die Alzheimerkrankheit sind, so würde man bei der Stichprobe in vorliegender Arbeit beim Vergleich von MCI-AD zu MCI-nonAD ähnliche Ergebnisse erwarten.

	BDNF	IGF-1	VEGF	TGF-β	MCP-1	IL-18
AD	↓	↓	(↓)	↓	↓	↑
Kontrollen	↔	↔	↔	↔	↔	↔

- ↓ Reduzierte Konzentration im Serum
- ↑ Erhöhte Konzentration im Serum
- ↔Keine Veränderung der Konzentration im Serum

Tabelle 4: Gezeigt ist die Richtung der Konzentrationsänderung bei Alzheimer Patienten im Vergleich zu Kontrollen. Eigene Tabelle, angelehnt an Schipke et al. (2019).

Weiterhin prüfte ©Predemtec AG, ob die Kombination der Biomarker es erlaubt, jeden Studienteilnehmer entweder der Patienten- oder der Kontrollgruppe zuzuordnen. Dazu wurde eine auf einem Algorithmus basierende Klassifizierungsanalyse durchgeführt. Dieselbe Klassifizierungsanalyse wandte ©Predemtec AG auch für die Proben aus dem Zentrum für kognitive Störungen in München an. Der Algorithmus, der die Patienten der jeweiligen Gruppe zuordnet, wurde mithilfe eines logistischen Regressionsmodells berechnet. Dieser Algorithmus kombiniert alle sechs Biomarker zu einem Score, der in der Studie eine Accuracy von 85% erreichte (siehe Abbildung 7). In der Validierungsstudie konnte die Kombination der sechs Serumproteine AD-Patienten mit 76% Sensitivität und Kontrollen mit 95% Spezifität identifizieren. Da die Probanden zwischen den Gruppen nicht geschlechtsangepasst waren und das mittlere Alter zwischen den Gruppen signifikant unterschiedlich war, wurden reduzierte geschlechtsangepasste Datensätze ausgewählt, die altersbereinigt wurden. Dennoch konnten Patienten und Kontrollen mit 80% Sensitivität und 80% Spezifität identifiziert werden.

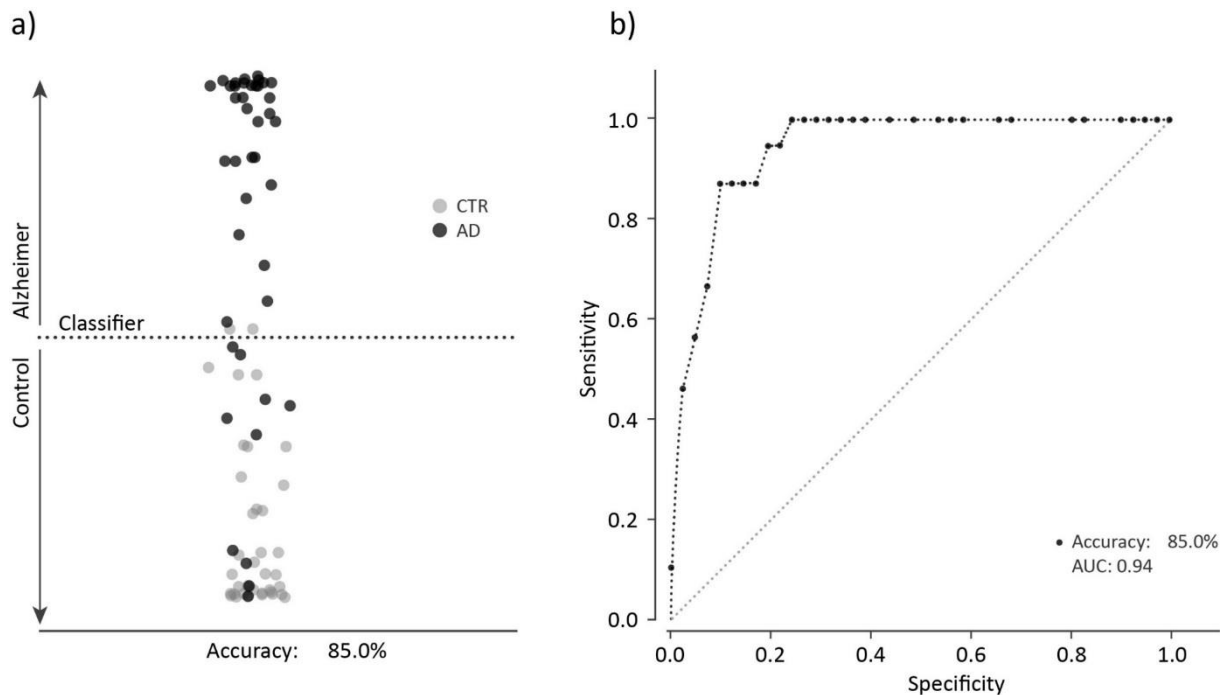


Abbildung 7: Eine Visualisierung der Ergebnisse aus dem logistischen Regressionsmodell zur Trennung von Alzheimer-Patienten von der Kontrollgruppe. a) Das Diagramm zeigt den Wert (y-Achse), den man nach Anwendung des logistischen Regressionsmodells auf Datensätze von Alzheimer-Patienten und Kontrollgruppe (Control) erhält, wobei jeder Punkt die Daten von einem einzelnen Patienten/einer einzelnen Kontrolle darstellt. Der Klassifikator (Classifier) zeigt die beste Trennung zwischen den Gruppen an. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen die Gruppe gemäß dem Algorithmus an. Die Daten sind 1D, die Werte in der zweiten Dimension (x-Achse) werden nur zu Visualisierungszwecken variiert. b) Eine ROC-Analyse auf der Grundlage des errechneten Scores, wobei der Algorithmus alle sechs Marker zu einem einzigen Score kombiniert. AUC: Fläche unter der Kurve, Accuracy: Treffergenauigkeit. Abbildung aus Schipke et al. (2019).

Ein großer Unterschied der vorliegenden Arbeit zu der Validierungsstudie von ©Predemtec AG ist, dass in ersterer keine Patienten mit mittelschwerer Demenz und gesunde Kontrollen eingeschlossen wurden, sondern nur Probanden mit MCI untersucht wurden, um feststellen zu können, ob sich die sechs Biomarker auch zur Frühdiagnose der Alzheimer-Krankheit eignen und ob deren Veränderungen spezifisch für die Alzheimer-Krankheit sind. Die Validierungsstudie wurde hier dargestellt, um zu verdeutlichen, warum die sechs genannten Biomarker ausgewählt wurden und auf welcher Grundlage die vorliegende Verifizierungsstudie entworfen wurde.

1.7.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Blut-basierten Test zur Frühdiagnostik der Alzheimer-Krankheit zu evaluieren. Der Test beinhaltet die Messung von sechs Biomarkern im Serum (BDNF, IGF-1, VEGF, TGF- β , MCP-1 und IL-18) und wurde von der Firma ©Predemtec AG hergestellt. Geprüft wurde, ob der Test eine zugrunde liegende Alzheimer-Krankheit bei Patienten mit leichter kognitiver Störung erkennen kann. Dies wurde im Vergleich zu den

Ergebnissen der Lumbalpunktion getestet, mit deren Hilfe die Einteilung in AD positiv und AD negativ erfolgte. Es wurden Patienten im Stadium der leichten kognitiven Störung gewählt, um zu prüfen, ob der Test eine frühe Diagnose ermöglichen kann. Eine frühe Diagnose ist deshalb wichtig, weil nur dann die Behandlung früh begonnen werden und Lebensqualität erhalten werden kann.

Die sechs Serum-Biomarker wurden in einer Gruppe von 32 Patienten mit leichter kognitiver Störung mit verminderter Konzentration von A β 42 im Liquor (also bei zugrundeliegender Alzheimer-Krankheit) und in einer Gruppe von 20 Patienten mit leichter kognitiver Störung mit normaler Konzentration von A β 42 im Liquor (also bei nicht zugrundeliegender Alzheimer-Krankheit) untersucht.

Dazu wurden vier Hypothesen aufgestellt:

Hypothese 1: Die MCI-AD Gruppe und die MCI-nonAD Gruppe unterscheiden sich in Bezug auf das Panel der 6 Serum-Biomarker signifikant. Die Sensitivität und die Spezifität des Biomarkertests betragen >80%.

Hypothese 2: Die Werte der Biomarker 1-6 korrelieren sowohl mit der erreichten Punktzahl im MMST wie auch mit der CDR-SOB.

Hypothese 3: Die Werte der Biomarker 1-6 korrelieren mit der Konzentration des A β 1-42, des Gesamt Taus, des p-Taus und dem Quotienten aus A β 1-42/A β 1-40.

Hypothese 4: Die gemessenen Biomarker korrelieren untereinander.

Erläuterung der gewählten Hypothesen:

Die erste Hypothese ist die primäre Hypothese dieser Arbeit. Die Grundlage für die geforderte Sensitivität und Spezifität ist ein Konsensus-Bericht der Arbeitsgruppe für molekulare und biochemische Marker der Alzheimer-Krankheit des National Institute on Aging und der Alzheimer's Association aus dem Jahr 1998. In diesem Bericht werden unter anderem folgende Forderungen für mögliche Biomarker der Alzheimerkrankheit genannt:

Der ideale Biomarker für die Alzheimer-Krankheit (AD) sollte eine Sensitivität von >80% für die Erkennung von AD und eine Spezifität von >80% für die Unterscheidung von anderen Demenzen aufweisen; er sollte zuverlässig, reproduzierbar, nicht invasiv, einfach durchzuführen und kostengünstig sein (Ronald et al., 1998).

Auch der zweite Teil dieser Forderung soll durch den in der vorliegenden Arbeit evaluierten Biomarkertest erfüllt werden.

Die zweite Hypothese wurde gewählt, um beurteilen zu können, ob die Serum-Biomarker mit dem kognitiven Abbau, gemessen an MMST und CDR-SOB, korrelieren. Die CDR wurde dabei außer Acht gelassen, da eines der Einschlusskriterien eine CDR von 0,5 ist und eine Korrelationsanalyse somit nicht sinnvoll ist.

Die Rationale hinter der dritten Hypothese ist, dass die genannten CSF-Biomarker der in der Arbeit verwendete Vergleichsstandard sind. Auch wenn die erste Hypothese abgelehnt

werden muss, kann eine Korrelation der Serum-Biomarker des Panels mit denen der Lumbalpunktion auf einen Zusammenhang der Marker mit der Neuropathologie der Alzheimerkrankheit hinweisen. Wenn die erste Hypothese nicht verworfen werden muss, bestätigt eine Korrelation der Serum-Biomarker mit den CSF-Biomarkern den Zusammenhang der gewählten Marker mit den neuropathologischen Veränderungen der Alzheimer Krankheit. Die vierte und letzte Hypothese wurde gewählt, da eine Korrelation der Biomarker untereinander zeigen kann, dass diese Marker Ausdruck desselben Prozesses sind. Wenn das Panel an sich eine signifikante Trennung von MCI-AD und MCI-nonAD möglich macht, dann sollten die Biomarker auch miteinander korrelieren, da sie dann alle mit der Alzheimer-Pathologie in Zusammenhang stehen.

2 Methoden

2.1 Ethikvotum und Einwilligungserklärung

Die geplante Studie wurde der Ethikkommission der Technischen Universität München am 07.12.2015 vorgelegt und die Durchführung ebendieser am 08.02.2016 bewilligt.⁶

Vor der Lumbalpunktion und der Blutentnahme erfolgte eine Aufklärung aller Patienten im Sinne der Spende, Einlagerung und Nutzung von Biomaterialien. Als Einwilligungserklärung für die vorliegende Studie diente das offizielle Einwilligungsformular⁶ für die BioBank der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Technischen Universität München am Klinikum rechts der Isar. Dieses Vorgehen wurde zuvor von der Ethikkommission genehmigt.

2.2 Studiendesign und Patienten

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Studie war prospektiv. Die Patienten wurden lumbalpunktiert, anschließend erfolgte die Blutabnahme. Die Serumproben wurden nach Eingang der LP-Ergebnisse in die zwei Gruppen eingeteilt oder verworfen.

In die Studie wurden ambulante und stationäre Patienten der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München eingeschlossen. Alle Patienten stammten aus Bayern. Das mittlere Alter in den Gruppen war $62,7 \pm 11,43$ bei den MCI-nonAD- und $66,8 \pm 10,56$ bei den MCI-AD-Patienten (siehe Tabelle 5).

Bei den eingeschlossenen ambulanten Patienten handelte es sich um Patienten des Zentrums für kognitive Störungen des Klinikums Rechts der Isar in München. Das Zentrum für kognitive Störungen untersucht und behandelt Patienten, die sich dort aufgrund von kognitiven Störungen wie Gedächtnisproblemen vorstellen oder von ihrem Psychiater oder Neurologen

⁶ Siehe Anhang

zur diagnostischen Abklärung überwiesen wurden. Im Rahmen der Vorstellung im Zentrum für kognitive Störung ist eine Lumbalpunktion Standard.

Mithilfe der Alzheimer-Marker im Liquor wurden zwei Patientengruppen gebildet. Eine Gruppe umfasste diejenigen Patienten mit leichter kognitiver Störung, die im Liquor eine „normale“ (>650 pg/ml) Konzentration von A β 1-42 und einen „normalen“ A β 1-42/A β 1-40-Quotienten (>0,05) aufwiesen. Diese Gruppe wurde definiert als MCI-nonAD, das heißt, Patienten mit leichter kognitiver Störung, die nicht auf eine Alzheimer Pathologie zurückzuführen war. Die andere Gruppe waren Patienten mit reduziertem A β 1-42(<650 pg/ml) beziehungsweise A β 1-42/A β 1-40-Quotienten (<0,05), diese wurden als MCI-AD definiert, das heißt, Patienten mit leichter kognitiver Störung aufgrund einer Alzheimer Pathologie.

Im Anschluss an die Lumbalpunktion erfolgten eine Blutentnahme und die Verarbeitung der Proben nach unten beschriebener SOP⁷. Die Bestimmung der Biomarker im Liquor dauert einige Wochen. Wie bereits beschrieben ist die Alzheimer Krankheit die häufigste Ursache einer Demenz und für ca. 60% aller Demenzen verantwortlich (Kalaria et al., 2008).

So erfüllten auch die meisten der ambulanten Patienten im Zentrum für kognitive Störungen die Kriterien der Alzheimer Krankheit, indem sich in ihrem Liquor reduzierte A β (1-42)-Konzentrationen und/oder ein reduzierter A β (1-42)/A β (1-40)-Quotient zeigte. In unserer Stichprobe bestätigte sich also, dass der leichten kognitiven Störung meist eine Alzheimer-Krankheit zugrunde liegt. Um genug MCI-nonAD Patienten für die Kontrollgruppe zu rekrutieren, wurden auch stationäre Patienten der Psychiatrie des Klinikums Rechts der Isar miteinbezogen. Diese Patienten zeigten ebenso wie die ambulanten Patienten eine leichte kognitive Störung, die im Rahmen des stationären Aufenthaltes abgeklärt wurde. Auch bei diesen Patienten fanden sich zum größeren Anteil Alzheimer-typische CSF-Veränderungen. Die Rekrutierung fand von Dezember 2015 bis September 2017 statt. Bis zum Ende dieser Zeitspanne konnten nicht, wie ursprünglich geplant, 25 MCI-nonAD Probanden gefunden werden, sodass die Anzahl der Studienteilnehmer in den zwei Gruppen angepasst wurde. Es wurden somit 32 MCI-AD Patienten und 20 MCI-nonAD Patienten in die Studie eingeschlossen.

	<i>AD nein</i>	<i>AD ja</i>	<i>p-Wert</i>
<i>Alter bei Blutentnahme</i>	62,7 ± 11,43 (47 – 81) M: 62,5	66,8 ± 10,56 (41 – 83) M: 67,5	0,178

Tabelle 5: Verteilung des Lebensalters bei Blutentnahme in den zwei Gruppen. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichung, Minimum und Maximum sowie der Median in beiden Gruppen. Der p-Wert zeigt an, dass sich die Gruppen hinsichtlich des Alters nicht signifikant unterschieden.

⁷ Siehe Kapitel 2.6

2.3 Einschlusskriterien

1. Diagnose einer leichten kognitiven Störung nach den aktuellen Forschungskriterien der Alzheimer's Association und des National Institute on Aging: (Albert et al., 2011)
 - a. Kriterien für das klinische und kognitive Syndrom:
 - i. Selbst- oder fremdanamnestisch kognitive Beschwerden
 - ii. Beeinträchtigung in mindestens einer kognitiven Domäne
 - iii. Funktionale Fähigkeiten noch erhalten
 - iv. Keine Demenz
 - b. Objektive Bestätigung der kognitiven Beschwerden durch kognitive Testung
2. CDR von 0,5.
3. Vorliegende Ergebnisse einer Liquoruntersuchung nach Lumbalpunktion
 - a) Reduzierte Konzentration (<650 pg/ml) von A β 42 oder erniedrigter A β (1-42)/A β (1-40)-Quotient (<0,05); (MCI-AD)
 - b) Normale Konzentration von A β 42 und normaler A β (1-42)/A β (1-40)-Quotient (MCI-non-AD)
4. Unterschriebene Einverständniserklärung nach mündlicher Aufklärung

Anzahl der Studienteilnehmer:

32 MCI-AD Patienten

20 MCI-non-AD Patienten

Von der Firma ©Predemtec AG wurden nach Abschluss der Probensammlung, jedoch vor Analyse des Probenmaterials, noch einige Ausschlusskriterien genannt. Als solche galten eine Nieren- und Leberinsuffizienz, ein aktives Tumorleiden, eine Schizophrenie sowie HIV-Positivität. Insgesamt wiesen drei aller untersuchten Patienten ein solches Ausschlusskriterium auf. In der MCI-Non-AD Gruppe ließ sich bei einem der Patienten eine Niereninsuffizienz nachweisen, sowie bei einem weiteren eine Schizophrenie. In der MCI-AD Gruppe gab es ebenfalls einen Patienten mit Niereninsuffizienz. (siehe Tabelle 6).

Durch die Einnahme von Medikamenten wie Antidepressiva, Antipsychotika, Antidementiva und Antiparkinson-Medikamente kann sich die klinische Präsentation eines Patienten verändern. In beiden Gruppen wurden von einigen der Patienten die genannten Medikamente eingenommen (siehe Tabelle 7).

<i>Ausschlusskriterien</i>	<i>AD nein= 0</i>	<i>AD ja =1</i>
<i>Niereninsuffizienz</i>	1	1
<i>Leberinsuffizienz</i>	0	0
<i>Tumor</i>	0	0
<i>Schizophrenie</i>	1	0
<i>HIV-Positivität</i>	0	0

Tabelle 6: Die Tabelle zeigt die Verteilung von Ausschlusskriterien (definiert von ©Predemtec AG) in den beiden Gruppen.

<i>Begleitmedikamente</i>	<i>AD nein=0</i>	<i>AD ja=1</i>
<i>Antidepressiva</i> (<i>Escitalopram, Duloxetin, Venlafaxin, Mirtazapin, Citalopram, Johanniskraut, Amitryptilin</i>)	10/20 (50%)	9/32 (28%)
<i>Antipsychotika</i> (<i>Quetiapin, Flupentixol, Olanzapin, Aripiprazol, Lithium</i>)	8/20 (40%)	0 (0%)
<i>Antidementiva</i> (<i>Memantine, Gingko biloba, Donepezil</i>)	1/20 (5%)	6/32 (19%)
<i>Parkinson-Medikamente</i> (<i>L-Dopa</i>)	0 (0%)	1/32 (3%)

Tabelle 7: Relevante Begleitmedikamente in den beiden Gruppen. In den Klammern hinter den Wirkgruppen sind alle Wirkstoffe aufgezählt, die von den Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme regelmäßig eingenommen wurden.

2.4 Erfassung des Schweregrads einer Demenz

Durch Anwendung der oben genannten⁸ klinischen Kernkriterien von Albert et al. (2011) wurde die Diagnose einer leichten kognitiven Störung gestellt. Um Punkt b. der Kriterien gerecht zu werden, wurde der Schweregrad der Demenz mithilfe der Clinical Dementia Rating Scale (siehe Abbildung 8) bestimmt. Um die CDR zu erfassen, wurden der Patient sowie ein Angehöriger getrennt befragt. Die CDR prüft etwaige Defizite in sechs kognitiven Kategorien (Gedächtnis, Orientierung, Problemlösung und Urteilsvermögen, Angelegenheiten des

⁸ Siehe Kapitel 2.3

Gemeinwesens, Haus und Hobby, Persönliche Pflege). In jeder dieser Kategorien können 0 bis 3 Punkte erreicht werden. Aus den in den einzelnen Kategorien ermittelten Punkten wird anschließend eine Gesamt-CDR (Global CDR) errechnet, die eine Ordinalskala darstellt und nur die Werte 0; 0,5; 1; 2; oder 3 annehmen kann, wobei 0 keine Demenz, 0,5 eine fragliche, 1 eine leichtgradige, 2 eine mittelschwere und 3 eine schwere Demenz bedeutet (J. C. Morris, 1993).

Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit die CDR SOB (Sum of Boxes) verwendet, die durch Aufsummieren der Einzelwerte der einzelnen Kategorien ermittelt wird und eine Verhältnisskala darstellt.

Einschlusskriterium für die vorliegende Studie war hierbei ein globaler CDR Wert von 0,5, der für „fragliche Demenz“ steht und hier das klinische Stadium der leichten kognitiven Störung repräsentiert.

Table. Clinical Dementia Rating (CDR)

	Impairment				
	None 0	Questionable 0.5	Mild 1	Moderate 2	Severe 3
Memory	No memory loss or slight inconstant forgetfulness	Consistent slight forgetfulness; partial recollection of events; "benign" forgetfulness	Moderate memory loss; more marked for recent events; defect interferes with everyday activities	Severe memory loss; only highly learned material retained; new material rapidly lost	Severe memory loss; only fragments remain
Orientation	Fully oriented	Fully oriented except for slight difficulty with time relationships	Moderate difficulty with time relationships; oriented for place at examination; may have geographic disorientation elsewhere	Severe difficulty with time relationships; usually disoriented to time, often to place	Oriented to person only
Judgment and Problem Solving	Solves everyday problems and handles business and financial affairs well; judgment good in relation to past performance	Slight impairment in solving problems, similarities, and differences	Moderate difficulty in handling problems, similarities, and differences; social judgment usually maintained	Severely impaired in handling problems, similarities, and differences; social judgment usually impaired	Unable to make judgments or solve problems
Community Affairs	Independent function at usual level in job, shopping, and volunteer and social groups	Slight impairment in these activities	Unable to function independently at these activities although may still be engaged in some; appears normal to casual inspection	No pretense of independent function outside home Appears well enough to be taken to functions outside a family home	Appears too ill to be taken to functions outside a family home
Home and Hobbies	Life at home, hobbies, and intellectual interests well maintained	Life at home, hobbies, and intellectual interests slightly impaired	Mild but definite impairment of function at home; more difficult chores abandoned; more complicated hobbies and interests abandoned	Only simple chores preserved; very restricted interests, poorly maintained	No significant function in home
Personal Care	Fully capable of self-care		Needs prompting	Requires assistance in dressing, hygiene, keeping of personal effects	Requires much help with personal care; frequent incontinence

Score only as decline from previous usual level due to cognitive loss, not impairment due to other factors.

Abbildung 8: CDR, Abbildung aus Morris (1993)

Für Therapieentscheidungen, die Kommunikation unter Kollegen und um in der Forschung vergleichbare Gruppen zu definieren, ist es wichtig, dass man die Demenz in Stadien unterteilt (Perneckzy et al., 2006). Diese Einteilung in Stadien gelingt mit der CDR. Da das Erfassen der

CDR jedoch aufwändig ist, könnte man zur Erfassung des Schweregrads der Demenz auch den MMST heranziehen. Der MMST ist schnell zu erfassen und korreliert mit den Werten der CDR (Pernecky et al., 2006). Bei allen Patienten der vorliegenden Studie wurde sowohl die CDR wie auch der MMST erfasst.

Der MMST umfasst 30 Fragen, die Aufmerksamkeit, Orientierung, Gedächtnis, Rechnen, Sprache und die kognitive Funktion erfassen. Für jede dieser Fragen wird bei richtiger Antwort ein Punkt vergeben, sodass insgesamt 30 Punkte erreicht werden können (siehe Abbildung 10). In der MCI-AD-Gruppe wurde ein Mittelwert von $26,1 \pm 1,99$, in der MCI-nonAD-Gruppe $26,2 \pm 3,52$ erreicht (siehe Tabelle 8). Da der MMST allein nicht zur sicheren Diagnose einer Demenz bzw. einer leichten kognitiven Störung geeignet ist (Creavin et al., 2016), wurde er hier nur als ergänzendes Diagnostikum herangezogen. Die Diagnose einer leichten kognitiven Störung wurde mithilfe der CDR gestellt.

Außerdem wurde die „CERAD neuropsychologische Testbatterie“ durchgeführt. Die Testbatterie besteht aus folgenden Subtests:

CERAD Testbatterie

- verbale Flüssigkeit (Tiere)
- Boston Naming Test
- Mini Mental Status Examination
- Wortliste lernen, abrufen, wiedererkennen
- Figuren abzeichnen, abrufen

Plus Tests

- Trail Making Test A und B
- Phonematische Flüssigkeit (S-Wörter)

Abbildung 9: CERAD Testbatterie nach Memory Clinic des Felix Platter-Spital in Basel (2015)

<i>Maximum Score</i>		"MINI-MENTAL STATE"	
<i>Score</i>	<i>Score</i>		
ORIENTATION			
5	()	What is the (year) (season) (date) (day) (month)?	
5	()	Where are we: (state) (county) (town) (hospital) (floor).	
REGISTRATION			
3	()	Name 3 objects: 1 second to say each. Then ask the patient all 3 after you have said them. Give 1 point for each correct answer. Then repeat them until he learns all 3. Count trials and record.	Trials
ATTENTION AND CALCULATION			
5	()	Serial 7's. 1 point for each correct. Stop after 5 answers. Alternatively spell "world" backwards.	
RECALL			
3	()	Ask for the 3 objects repeated above. Give 1 point for each correct.	
LANGUAGE			
9	()	Name a pencil, and watch (2 points) Repeat the following "No ifs, ands or buts." (1 point) Follow a 3-stage command: "Take a paper in your right hand, fold it in half, and put it on the floor" (3 points) Read and obey the following: CLOSE YOUR EYES (1 point) Write a sentence (1 point) Copy design (1 point)	
_____		Total score	
		ASSESS level of consciousness along a continuum	Alert Drowsy Stupor Coma

Abbildung 10: Mini Mental State Examination, Abbildung aus Folstein et al. (1975)

Erreichte Punktzahl	AD nein	AD ja
17	1	0
21	1	1
22	1	1
23	2	2
24	1	1
25	0	6
26	0	6
27	2	7
28	7	5
29	2	3
30	2	0
Mittelwert ± Standardabweichung, Minimum, Maximum und Median	26,2 ± 3,52 (17 – 30) M: 28	26,1 ± 1,99 (21 – 29) M: 26

Tabelle 8: MMST-Punkte in den beiden Gruppen. Maximal können 30 Punkte erreicht werden. Dargestellt sind außerdem der Mittelwert +/- Standardabweichung, sowie Minimum, Maximum und Median in den zwei Gruppen.

2.5 Lumbalpunktion

Der Liquor wurde durch eine Lumbalpunktion auf Höhe LWK 3/4 oder 4/5 gewonnen. Bei der Lumbalpunktion nimmt der Patient eine sitzende Position mit ventral flektierter Lendenwirbelsäule ein. Dies ermöglicht ein Auseinandergleiten der Dornfortsätze der Wirbelkörper, sodass der Spinalkanal besser zugänglich wird. Um die Punktionsstelle aufzufinden, ertastet man die Beckenkämme, auf deren Höhe sich ungefähr der 4. Lendenwirbel befindet. In der Mitte einer gedachten, die Beckenkämme verbindenden Linie markiert man die Punktionsstelle zwischen den Dornfortsätzen zweier benachbarter Wirbelkörper. Diese Höhe ist für die Lumbalpunktion geeignet, da man auf Höhe des 4. Lendenwirbels kein Rückenmark mehr erwartet. Nach gründlicher Desinfektion und mit oder ohne Lokalanästhesie wird dann auf Höhe LWK 3/4 oder 4/5 eingestochen und der Liquorraum mit einer atraumatischen Nadel eröffnet. Standardmäßig werden bei der Lumbalpunktion vier Röhrchen (à ca. 4 ml) mit Liquor befüllt. Der Liquor wird untersucht auf: Zellart und-zahl, Gesamteiweiß, Laktat, Glucose und Oligoklonale Banden; Konzentrationen des Gesamt-Taus (tTau), des phosphorylierten Taus (pTau), des Aβ1-42 und des Aβ1-40; Aβ1-42/Aβ1-40; bakteriologische Verunreinigung.

Wie in der Einleitung beschrieben⁹, wird die Diagnose der Alzheimer-Krankheit nach aktuellen Kriterien mithilfe der AT(N)-Klassifikation gestellt. Die CSF-Biomarker sind Teil dieser Klassifikation. Im Zentrum für kognitive Störungen des Klinikums Rechts der Isar München

⁹ siehe Kapitel 1.7.3

gelten folgende Cut-Off-Werte für die Diagnose einer Alzheimer-Krankheit: $A\beta_{1-42} < 650$ pg/ml, $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40} < 0,05$, $t\text{Tau} > 252$ pg/ml, $p\text{Tau} > 60$ pg/ml. Allerdings wurden in vorliegender Arbeit nur die β -Amyloid-Werte für die Diagnose der Alzheimer-Pathologie beachtet. Die Einteilung der Probanden in AD/nonAD erfolgte also nicht nach der aktuell gültigen AT(N)-Klassifikation, sondern lediglich auf Basis der Klinischen Präsentation sowie der β -Amyloid-Werte im Liquor cerebrospinalis. In der Diskussion wird auf die Gründe dieses Vorgehens genauer eingegangen¹⁰.

2.6 Blutabnahme und -verarbeitung

Bei fast jedem der verwendeten Serum-Biomarker zeigte sich in bisherigen Studien eine große Heterogenität der Ergebnisse. Viele Studienergebnisse ließen sich nicht reproduzieren (O'Bryant et al., 2016). Der Grund hierfür liegt zu einem großen Teil darin, dass keine einheitlichen Studienprotokolle existieren (O'Bryant et al., 2015). So verwendeten einige Forschungsgruppen für ihre Analysen Serum, andere Plasma. Das Material wurde unterschiedlich verarbeitet, aufbewahrt und analysiert (O'Bryant et al., 2015).

Oft werden außerdem Serumröhrchen mit Gelen oder anderen Zusätzen verwendet. Diese verfälschen die Werte (meist insofern, dass zu niedrige Konzentrationen gemessen werden) und führen so zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen (O'Bryant et al., 2015). Zusätze in den Abnahmeröhrchen können die Ergebnisse relevant verändern (Bowen et al., 2010; Lista et al., 2013; Rai & Vitzthum, 2006). Beschichtungen wie Kleber, Gerinnungshemmer oder Gele können zum Beispiel Peaks in der Spektrometrie beeinflussen, in dem Komponenten der Zusätze in das Serum diffundieren oder Proteine im Serum/Plasma von der Wand des Röhrchens absorbiert werden (Bowen et al., 2010).

Um einheitlichere Studienprotokolle zu schaffen, entstand eine Arbeitsgruppe zur Entwicklung von Guidelines, die „international collaboration of the blood-based biomarker professional interest area (BBB-PIA)“, die die ersten Konsensus-basierten Leitlinien zu präanalytischen Prozessen veröffentlichte (siehe Abbildung 7) (O'Bryant et al., 2015, 2016).

¹⁰ Siehe Kapitel 5.5

Preanalytic Processing Guidelines

1. Fasting - The majority of Alzheimer's studies globally utilizes fasting blood collection and thus is recommended (at least 8 hours since last meal). Whether fasting or non-fasting procedures are utilized, time since last meal should be documented.
2. Needle gauge -
 - a. 21g needle is preferable
 - b. Needle gauge can range from 19-23g
3. Order of blood draw should be as follows (skip tubes not being utilized):
 1. Blood Culture Tube
 2. Coagulation tube (blue top)
 3. Serum
 1. Serum separator (e.g. gold or red-grey "tiger top")
 2. Serum without gel (e.g. red top)
 4. Heparin
 1. Heparin plasma (e.g. green top)
 2. Heparin plasma (e.g. gel separator – light green or green-grey top)
 5. EDTA with or without separator (e.g. lavender/purple or pearl top)
 6. Glycolytic inhibitor (e.g. gray top)
 7. PAXgene blood RNA tube
4. Processing –
 - a. Total processing time \leq 2hrs from "stick-to-freezer".
 - b. Serum/plasma should be physically separated from contact with cells as soon as possible (<2 hrs). Do not store aliquots from serum/plasma that have been in contact with cells for >2 hrs.
 - c. Serum should be clotted in vertical position at room temperature before centrifugation (30-60m) if patient is not on anti-coagulant therapy.
 - d. Plasma tube should be gently inverted 5-10 times.
 - e. Relative centrifugal force (RCF; g-force) is preferred over revolutions per minute (rpm) in standard operating procedures (SOPs) and publications.
 - f. First centrifugation at 2000g for 10min with horizontal rotors preferable.
 - g. Aliquots should be made in polypropylene tubes (screw top preferably)(or straws) using polypropylene tips for pipets.
5. Storage –
 - a. Long-term storage should be at -80°C or liquid nitrogen. If storage on dry ice is utilized for shipment, the headspace should be vented or the sample should be allowed to sit in -70°C or -80°C freezer for 9hrs prior to thaw.
 - b. Small aliquots (generally not larger than 0.5 ml) are recommended for storage. Avoid unnecessary thawing and refreezing of samples and ensure consistent freeze thaw

- cycles between samples analyzed. For plasma or serum samples, consider aliquoting in small volumes, e.g. 100 to 200 microliters, if these are to be used for a large number of analyses.
6. Other precentrifugation and centrifugation factors that should be documented:
 - a. Type of collection tube (manufacturer's name, type of anticoagulant, etc.)
 - b. Time from collection to centrifugation
 - c. Temperature between collection and centrifugation
 - d. Presence and type of separator
 - e. Temperature of centrifugation
 - f. Number of centrifugations (single or double)
 - g. Use of protease inhibitors after aliquoting
 7. Other post-centrifugation considerations that should be documented:
 - a. Information regarding secondary container (vendor, lot number, type, tube, straw, etc.)
 - b. Time between centrifugation and freezing
 - c. Storage temperature
 - d. Number of freeze/thaw cycles
 - e. Duration of storage
 8. Other general considerations –
 - a. Document the volume of plasma or serum that was obtained.
 - b. The quality of serum or plasma can be influenced by hemolysis, and red or pink tingeing of plasma or serum is an indicator that significant hemolysis has occurred, which may render the samples less useful for many biomarker studies to be determined on case-by-case basis.

Abbildung 11. Prenalytic Processing Guidelines. Abbildung aus O'Bryant et al. (2015)

Die in vorliegender Arbeit verwendete SOP (kurz für Standard Operation Procedure, also Arbeitsanleitung) wurde an diese Leitlinien angelehnt. Allerdings gab es ein paar Abweichungen im Studienprotokoll. Die Patienten waren bei der Blutabnahme nicht nüchtern und das Serum wurde bei -20 und nicht bei -80°Celsius gelagert.

Wie beschrieben, können Zusätze in Blutröhrchen das Ergebnis verfälschen. Deshalb wurden in dieser Studie S-Monovetten von Sarstedt ohne Zusätze verwendet.

Die Blutentnahme erfolgte mithilfe von 0,8 mm dicken, 21 Gauge (g) großen Kanülen (Sarstedt) in der Ellenbeuge des Patienten. Es wurden zwei sterile neutrale Monovetten (Sarstedt) à 7,5 ml pro Patient befüllt.

Das Vollblut wurde dann für 30 Minuten, vor Sonnenlicht und direkter Wärmeeinwirkung geschützt, stehengelassen, bis die Spontangerinnung vollständig abgelaufen war.

Anschließend wurde das Vollblut in einer Kühlzentrifuge (Centrifuge 5702Rm Eppendorf Deutschland), bei 4 °C und 2000xg für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, also das Serum, wurde mit einer Pipette in ein neues Röhrchen gefüllt, der im Serumröhrchen verbleibende Hämatokrit des Bluts wurde verworfen. Das so gewonnene Serum wurde erneut bei 4 Grad und 2000xg für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde nun auf Gefrier-Tubes (Cryo-Tubes, Labsolute, Th.Geyer, 2 ml) aufgeteilt. Das Serum wurde zu je 0,5 ml aliquotiert, sodass pro Patient, je nach Blutmenge, bis zu 3,5 ml an Serum gewonnen wurden. Anschließend wurde das Serum bei -20 Grad eingefroren.

Insgesamt dauerte der Vorgang von Blutentnahme bis zum Einfrieren des Serums unter zwei Stunden.

2.7 Blutbasierter Biomarker-Test

Die eingefrorenen Seren wurden von der Biotechnologie Firma ©Predemtec AG auf die Biomarker BDNF, IGF-1, VEGF, TGF-β, MCP-1 und IL-18 untersucht.

Wie oben beschrieben, hatte ©Predemtec AG die Kombination der Biomarker bereits in einer Validierungsstudie getestet. Anschließend suchte die Firma Forschungszentren (Charité Universitätsmedizin Berlin und Technische Universität München) zur Rekrutierung weiterer Patienten, um so den Biomarkertest mit größeren Datenmengen evaluieren zu können. Die von uns gesammelten Proben wurden verblindet nach Berlin geschickt und von der Firma getestet. Nach Abschluss der Studien in Berlin und München wurde eine weitere Arbeit publiziert, in der alle Daten zusammengefasst wurden (Schipke et al., 2020).¹¹

Anhand dieser Publikation und der oben beschriebenen Validierungsstudie lässt sich der Biomarker Test kurz beschreiben.

Die Serumkonzentrationen der sechs Biomarker wurden mit ELISAs bestimmt. Die von Premdetec verwendeten Assays sind in untenstehender Tabelle aufgeführt (siehe Tabelle 9).

Name	Katalog No.	Hersteller	Proben- verdünnung	Sensitivität (LLOQ)	Interassay- Variabilität (CV)	Intraassay- Variabilität (CV)
Human Free BDNF Immunoassay	DBD00/SBD00	Bio-Techne GmbH (R&D)	1:20	20.0 pg/ml	9.0%	5.0%
Human IGF-1 Immunoassay	DG100/SG100	Bio-Techne GmbH (R&D)	1:100	26.0 pg/ml	7.9%	4.0%
Human VEGF Immunoassay	DVE00/SVE00	Bio-Techne GmbH (R&D)	Unverdünnt	9.0 pg/ml	7.3%	5.4%
Human TGF-β1	DB100B/SB100B	Bio-Techne GmbH (R&D)	1:40	4.61 pg/ml	8.3%	2.4%
LEGEND MAX™ Human MCP-1/CCL2	438807/438808	Biolegend	Unverdünnt	1.6 pg/ml	3.9%	6.2%
Human IL-18 ELISA Kit	7620	Bio-Techne GmbH (R&D)/MBL	1:5	12.5 pg/ml	7.5%	8.0%

LLOQ: lower limit of quantification, CV: coefficient of variation

Tabelle 9: Kommerzielle ELISA Kits, Probenverdünnung und Testspezifikationen, Tabelle aus Schipke et al. (2020).

¹¹ Siehe Kapitel 4

Die Quantifizierungen wurden nach den Anweisungen des Herstellers unter Anwendung der in der Tabelle angegebenen spezifischen Probenverdünnungen durchgeführt. Spezifikationen zur Assay-Variabilität und Sensitivität sind in der Tabelle angegeben. Die Testergebnisse wurden mit einem Mikroplatten-Lesegerät (ELX808, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT) quantifiziert. Die Proteinkonzentrationen für BDNF, IGF-1 und TGF- β werden in ng/ml und für VEGF, MCP-1 und IL-18 in pg/ml angegeben.

Um die Patienten anhand der Biomarker-Konzentrationen in die zwei Gruppen AD ja/nein zu trennen, entwickelte ©Predemtec AG einen Algorithmus. Dabei handelt es sich um ein logistisches Regressionsmodell mit den Daten aller sechs Biomarker, welches durch einen K-Means-Algorithmus in drei Intervalle diskretisiert wurde. Dadurch bekommt man für jedes Datenset einen 1-dimensionalen Wert und einen Klassifikator, der die Gruppen am besten trennt. Der so entwickelte Algorithmus wurde anschließend trainiert und validiert. Dazu wurden die Daten aus der Charité verwendet. Anschließend wurde der Algorithmus verwendet, um alle Patienten in die Gruppe „AD“ oder „Kontrolle“ einzuteilen (Schipke et al., 2019, 2020).

Der Ablauf der in vorliegender Dissertation durchgeführten Studie lässt sich zusammenfassend wie folgt beschreiben: Für die Evaluierung des von ©Predemtec AG entworfenen blutbasierten Biomarker-Tests wurden durch Forschungsgruppen der Charité Berlin und des Klinikums Rechts der Isar München Seren gesammelt und diese der Herstellerfirma geschickt. ©Predemtec AG testete die Biomarker-Konzentrationen in den Seren und gab den Forschungsgruppen die jeweiligen Messergebnisse bekannt. Die Firma nutzte einen speziell konzipierten Algorithmus für die Einteilung der Seren in AD/nonAD und teilte den involvierten Zentren ebenfalls die Einteilung in die zwei Gruppen mit. Mit dieser Einteilung sowie den Rohwerten der Messung wurden durch die Autorin dieser Arbeit eigene statistische Analysen durchgeführt, um eine weitgehend unabhängige Beurteilung des Biomarker-Tests zu ermöglichen. Die Messmethoden mittels ELISA und der Algorithmus zur Einteilung in AD/nonAD waren jedoch bei allen Proben gleich, eine eigene Messung der Biomarker-Konzentrationen erfolgte nicht. Somit wurden die Daten, also die Messwerte und die Einteilung in AD/nonAD der Firma, die in vorliegender Arbeit dargestellt wurden, auch in der Publikation der Firma verwendet. Die statistische Auswertung unterscheidet sich aber zwischen vorliegender Dissertation und der unten beschriebenen Publikation¹².

2.8 Statistische Auswertung

Die Daten wurden zunächst mit der Software Excel 2016 ® (Microsoft Corp./USA) erfasst und anschließend mit der Statistiksoftware IBM SPSS Statistics ausgewertet und dargestellt. Anhand von Kreuztabellen wurden Sensitivität und Spezifität des Bluttests berechnet. Um zu ermitteln, ob die im Blut gemessenen Marker Patienten mit Alzheimer-Pathologie von solchen

¹² Siehe Kapitel 4

ohne Alzheimer-Pathologie signifikant unterscheiden können, wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt.

Mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest wurde geprüft, ob die untersuchten Biomarker im Blut (BDNF, IGF-1, VEGF, TGF- β , MCP-1, IL-18), wie auch die Marker im Liquor und die Werte des MMST und der CDR-SOB einer Normalverteilung folgen, wobei sich nur für IGF-1 und die CDR-SOB eine Normalverteilung zeigte.

Alle Daten wurden außerdem graphisch dargestellt. Anhand dieser Darstellung konnte nur bei den genannten Werten eine Normalverteilung angenommen werden.

Da die meisten Werte keiner Normalverteilung folgten, entschieden wir uns im Folgenden für nicht-parametrische Tests (Mann-Whitney-U-Test und Spearman-Korrelationskoeffizient).

Mithilfe des Mann-Whitney-U Test bestimmten wir, ob ein einzelner der Serum-Biomarker die Gruppe der Alzheimer-Patienten von der der Nicht-Alzheimer-Patienten unterscheiden kann. In der ROC-Analyse wurde das Verhältnis von Sensitivität zu 1-Spezifität für jeden einzelnen Biomarker graphisch dargestellt. Berechnet wurde die AUC (Area under the curve), die die diskriminatorische Qualität eines Tests angibt.

Inwieweit die Werte der Serum-Biomarker mit denen der neuropsychologischen Testung, den Werten der Amyloid-Pathologie im Liquor und untereinander korrelieren, ermittelten wir mit dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman (nicht-parametrischer Korrelationskoeffizient). Da der Korrelationskoeffizient lediglich eine Aussage über einen möglichen linearen Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen liefert, wurde anschließend noch eine binäre logistische Regressionsanalyse durchgeführt, die auch nicht lineare Beziehungen anzeigt. Hierbei kann geprüft werden, ob die Biomarker einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit haben, dass der Test positiv wird, das heißt, dass bei dem Patienten die Alzheimer-Krankheit diagnostiziert wird. Außerdem kann die Stärke des möglichen Einflusses bestimmt werden.

In vorliegender Arbeit wurden die CSF-Parameter zur Einteilung in die zwei Gruppen AD/nonAD verwendet. Im folgenden Ergebnisteil werden gelegentlich die p-Werte der CSF-Biomarker-Konzentrationen genannt sowie Boxplots mit den Konzentrationsunterschieden in den zwei Gruppen gezeigt. Dies ist nicht als Bewertung der Lumbalpunktion zur Unterscheidung AD/nonAD zu interpretieren, da die Lumbalpunktion die Grundlage der Klassifikation darstellte. Die Graphiken und Werte sind lediglich zum Vergleich aufgeführt.

3 Ergebnisse

Die Herstellerfirma des Bluttests, ©Predemtec AG, testete die Seren verblindet auf die Konzentrationen der sechs Biomarker. Die absoluten Werte der Marker und die von ©Predemtec AG vorgenommene Einteilung in AD ja (=1) und AD nein (=0) wurden uns anschließend bekanntgegeben (siehe Tabelle 10).

<i>BDNF</i> <i>ng/ml</i>	<i>IGF-1</i> <i>ng/ml</i>	<i>VEGF</i> <i>pg/ml</i>	<i>TGF-β</i> <i>ng/ml</i>	<i>MCP-1</i> <i>pg/ml</i>	<i>IL-18</i> <i>pg/ml</i>	<i>AD ja=1,</i> <i>nein= 0</i>
0,87	154,08	96,16	6,15	30,77	355,14	1
1,81	78,97	38,36	5,30	39,69	231,35	1
8,63	74,15	183,95	28,88	86,76	640,56	1
18,98	89,15	741,85	42,49	223,63	109,30	0
3,11	112,18	45,94	6,89	41,57	228,87	1
14,86	91,17	275,76	25,35	118,79	152,62	0
21,93	171,65	94,92	36,70	162,77	195,44	0
12,07	93,47	108,22	26,36	136,87	243,82	0
8,10	68,78	42,74	10,10	157,45	185,61	1
2,41	59,16	148,17	7,34	34,28	175,78	1
19,88	134,51	128,75	24,04	30,53	200,37	0
8,01	90,70	94,11	13,20	58,97	258,84	1
6,73	91,87	97,82	12,54	60,13	184,37	1
15,29	137,71	36,37	29,09	97,29	158,69	0
15,22	145,50	157,50	21,62	224,81	414,31	0
10,76	114,85	19,94	16,52	66,77	306,74	1
1,65	97,73	59,74	4,30	31,51	194,20	1
17,62	56,91	781,96	22,82	86,76	236,34	1
1,17	103,84	19,97	4,15	32,73	280,21	1
2,85	129,83	90,40	5,57	36,17	228,87	1
9,66	144,81	177,78	19,17	178,11	131,17	0
29,78	71,46	330,64	31,95	157,93	138,15	0
1,52	96,22	26,67	3,55	36,99	120,25	1
7,43	102,95	32,08	9,76	67,48	166,35	1
22,30	111,11	224,00	29,18	59,41	155,22	0

3,17	53,17	15,55	3,22	49,75	209,34	1
12,12	90,38	134,69	13,46	105,32	140,15	1
3,32	87,89	20,17	7,49	42,59	131,17	1
4,99	82,27	45,89	8,01	59,67	228,00	1
6,44	113,21	31,77	11,68	65,98	164,33	1
10,19	61,03	95,10	13,19	104,41	182,63	1
4,88	101,89	194,95	7,84	36,47	270,92	1
2,31	155,18	24,29	4,67	37,93	286,78	1
17,99	80,85	137,07	21,73	70,03	234,24	1
7,77	91,32	42,79	5,60	55,40	202,12	1
2,04	76,58	59,42	6,06	52,01	324,05	1
1,28	86,81	16,70	3,26	39,30	195,95	1
4,17	87,43	90,16	5,88	35,79	278,31	1
3,57	95,60	37,60	8,09	89,21	388,37	1
2,68	135,99	57,56	4,77	36,66	191,02	1
24,19	66,91	468,21	30,89	88,32	254,74	0
7,37	100,78	109,32	8,82	63,83	222,25	1
2,28	83,16	16,25	3,52	38,29	267,10	1
4,55	105,77	26,18	8,37	30,51	149,99	1
18,21	87,50	386,04	24,24	129,74	203,27	0
9,79	57,43	71,28	15,91	88,67	307,70	1
5,23	99,85	51,63	6,65	35,89	167,70	1
5,43	55,19	185,94	9,95	93,84	315,63	1
2,86	43,02	91,00	7,49	56,31	305,44	1
1,48	127,31	24,34	3,30	35,80	125,74	1
0,85	35,32	39,81	2,65	64,97	125,74	1
4,06	64,73	48,67	5,95	27,19	236,80	1

Tabelle 10: Gezeigt sind die gemessenen Werte für die einzelnen Biomarker sowie die Einordnung in Alzheimer/Nicht-Alzheimer durch ©Predemtec AG.

Um die primäre Hypothese dieser Arbeit zu testen¹³, wurde zunächst die Einordnung in AD ja/nein durch den blutbasierten Biomarkertest mit der CSF-Einschätzung AD ja/nein als Diagnosestandard verglichen (siehe Tabelle 11). Dabei zeigte sich, dass das Panel der sechs Serum-Biomarker Patienten mit leichter kognitiver Störung mit zugrundeliegender Alzheimer-Krankheit (MCI-AD) von Patienten mit leichter kognitiver Störung ohne zugrundeliegender Alzheimer-Krankheit (MCI-NonAD) nicht signifikant trennen kann (p-Wert im Chi-Quadrat-Test unter Einschluss aller untersuchten Patienten 0,795; siehe Tabelle 12).

In unserer Stichprobe ergab sich eine Sensitivität von 78,13% und eine Spezifität von 25%, die Treffergenauigkeit (Accuracy) betrug 57,69%.

	<i>CSF AD ja</i>	<i>CSF AD nein</i>	<i>Gesamt</i>
<i>Predemtec AD ja</i>	25	15	40
<i>Predemtec AD nein</i>	7	5	12
<i>Gesamt</i>	32	20	52

Tabelle 11: Kreuztabelle unter Einschluss aller Patienten. Es ergibt sich eine Sensitivität von 78,13%, eine Spezifität von 25% sowie eine Treffergenauigkeit (Accuracy) von 57,69%.

	<i>Wert</i>	<i>df</i>	<i>Asymptomatische Signifikanz (zweiseitig)</i>	<i>Exakte Signifikanz (2-seitig)</i>
<i>Chi-Quadrat nach Pearson</i>	0,068	1	0,795	
<i>Kontinuitätskorrektur</i>	0,000	1	1,000	
<i>Likelihood-Quotient</i>	0,067	1	0,795	
<i>Exakter Test nach Fisher</i>				
<i>Zusammenhang linear-mit-linear</i>	0,66	1	0,797	
<i>Anzahl der gültigen Fälle</i>	52			

Tabelle 12: Chi-Quadrat-Test unter Einschluss der gesamten Studienpopulation. Relevant ist der fettmarkierte p-Wert von 0,795, der über dem Signifikanzniveau liegt.

Drei der untersuchten Seren wurden von ©Predemtec AG aufgrund der Ergebnisse als Grenzfälle bezeichnet. Bei den Grenzfällen handelte es sich um zwei richtig-positive und einen falsch-positive Patienten. Im Folgenden wurden diese Grenzfälle von der Berechnung der

¹³ Siehe Kapitel 1.7.5

Sensitivität und Spezifität ausgeschlossen. Aus der so veränderten Kreuztabelle ergaben sich eine Sensitivität von 76,67%, eine Spezifität von 26,32% und eine Treffergenauigkeit (Accuracy) von 57,14% (siehe Tabelle 13). Auch unter Ausschluss der Grenzfälle errechnete der Chi-Quadrat-Test keinen signifikanten p-Wert ($p=0,813$, siehe Tabelle 14).

	<i>CSF AD ja</i>	<i>CSF AD nein</i>	<i>Gesamt</i>
<i>Predemtec AD ja</i>	23	14	37
<i>Predemtec AD nein</i>	7	5	12
<i>Gesamt</i>	30	19	49

Tabelle 13: Kreuztabelle unter Ausschluss der Grenzfälle. Sensitivität 76,67%, Spezifität 26,32%, Accuracy 57,14%.

	<i>Wert</i>	<i>df</i>	<i>Asymptomatische Signifikanz (zweiseitig)</i>	<i>Exakte Signifikanz (2-seitig)</i>
<i>Chi-Quadrat nach Pearson</i>	0,056	1	0,813	
<i>Kontinuitätskorrektur</i>	0,000	1	1,000	
<i>Likelihood-Quotient</i>	0,056	1	0,814	
<i>Exakter Test nach Fisher</i>				1,000
<i>Zusammenhang linear-mit-linear</i>	0,056	1	0,815	
<i>Anzahl der gültigen Fälle</i>	49			

Tabelle 14: Chi-Quadrat Test unter Ausschluss der Grenzfälle. p-Wert: 0,813.

Wie bereits erwähnt, definierte ©Predemtec AG nach Abschluss der Probensammlung einige Ausschlusskriterien. Drei der von uns eingeschlossenen Patienten erfüllten jeweils eines dieser Ausschlusskriterien und wurden daher im Folgenden von den Berechnungen ausgeschlossen. Es handelte sich dabei um zwei falsch-positive und einen richtig-positiven Patienten (siehe Tabelle 15). Bei der so veränderten Studienpopulation errechnete sich eine Sensitivität von 77,42%, eine Spezifität von 27,78% und eine Accuracy von 59,18%. Der Chi2-Test ergab einen p-Wert von 0,683, was keinem signifikanten Ergebnis entspricht. Schließlich wurden sowohl die Grenzfälle wie auch die Patienten mit Ausschlusskriterien von den Berechnungen ausgeschlossen (siehe Tabelle 16). Dabei ergab sich eine Sensitivität von 75,86%, eine Spezifität von 29,41% sowie eine Accuracy von 58,7%. Auch hier errechnete sich mit 0,694 ein p-Wert weit oberhalb des Signifikanzniveaus von 5%.

	<i>CSF AD ja</i>	<i>CSF AD nein</i>	<i>Gesamt</i>
<i>Predemtec AD ja</i>	24	13	37
<i>AD nein</i>	7	5	12
<i>Gesamt</i>	31	18	49

Tabelle 15: Kreuztabelle unter Ausschluss der Patienten mit Ausschlusskriterien. Sensitivität 77,42%, Spezifität 27,78%, Accuracy 59,18%.

	<i>CSF AD ja</i>	<i>CSF AD nein</i>	<i>Gesamt</i>
<i>Predemtec AD ja</i>	22	12	34
<i>AD nein</i>	7	5	12
<i>Gesamt</i>	29	17	46

Tabelle 16: Kreuztabelle unter Ausschluss der Patienten mit Ausschlusskriterien und der Grenzfälle. Sensitivität 75,86%, Spezifität 29,41%, Accuracy 58,7%.

Alle weiteren statistischen Tests wurden mit der ursprünglichen Studienpopulation durchgeführt.

Da die Kombination der sechs Serum-Biomarker sich nicht zur Unterscheidung der zwei Gruppen zu eignen schien, untersuchten wir als nächstes, ob es signifikante Unterschiede in den Konzentrationen der einzelnen Marker zwischen den MCI-AD- und den MCI-nonAD-Patienten geben könnte. Dazu berechneten wir mithilfe des Mann-Whitney-U-Test die p-Werte für jeden der sechs Biomarker.

Hierbei ergab sich, dass keiner der Biomarker des Panels allein genommen die MCI-AD von den MCI-Non-AD Patienten trennen kann. Die errechneten p-Werte lagen alle weit über dem Signifikanzniveau (p-Werte: BDNF 0,397; IGF-1: 0,970; VEGF: 0,940; TGF-β: 0,463; MCP-1: 0,573; IL-18: 0,809). Signifikante Unterschiede in den Konzentrationen der Serum-Biomarker zeigten sich also in unserer Studienpopulation nicht.

Auch die graphische Darstellung mit Boxplots bestätigte dies (siehe Abbildungen 16-21).

Zum Vergleich sind außerdem die Konzentrationen der CSF-Marker in den beiden Gruppen mithilfe von Boxplots abgebildet (siehe Abbildungen 12-15).

Wie zuvor beschrieben¹⁴, sind die Darstellungen der CSF-Marker lediglich zum Vergleich aufgeführt. Die Unterschiede in den zwei Gruppen sind durch die Verwendung der CSF-Marker als Grundlage der Klassifikation in AD/non AD bedingt.

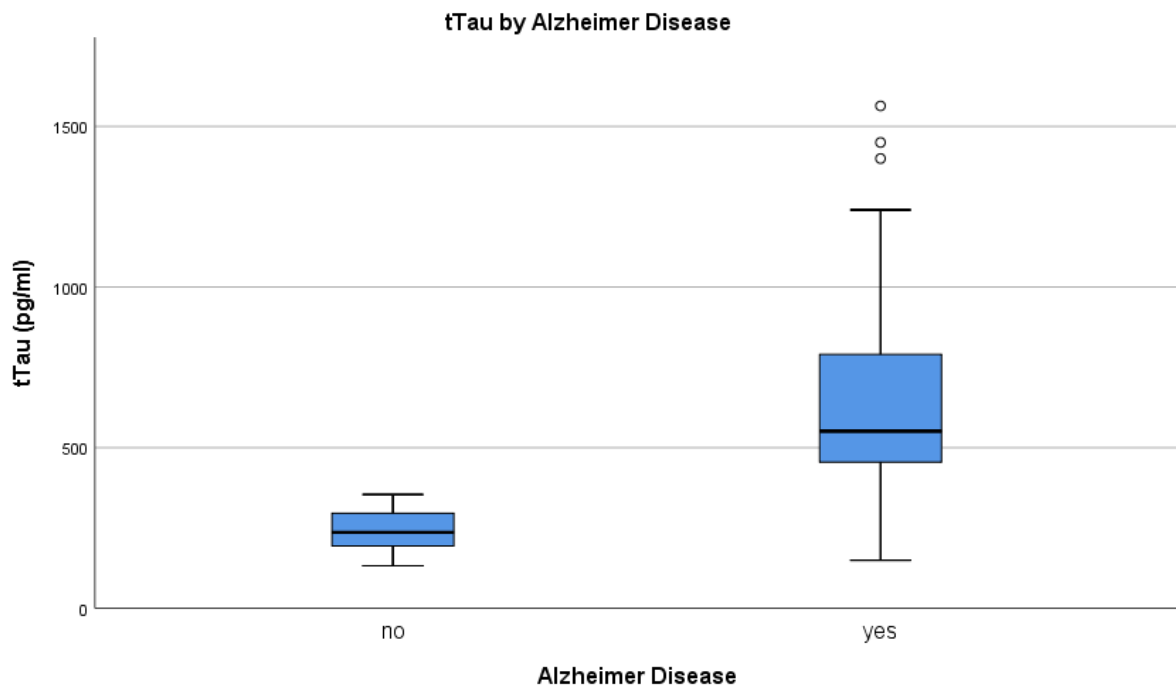


Abbildung 12: Verteilung des tTau-Werts bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit. Zur Klassifikation genutzter Marker.

¹⁴ Siehe Kapitel 2.8

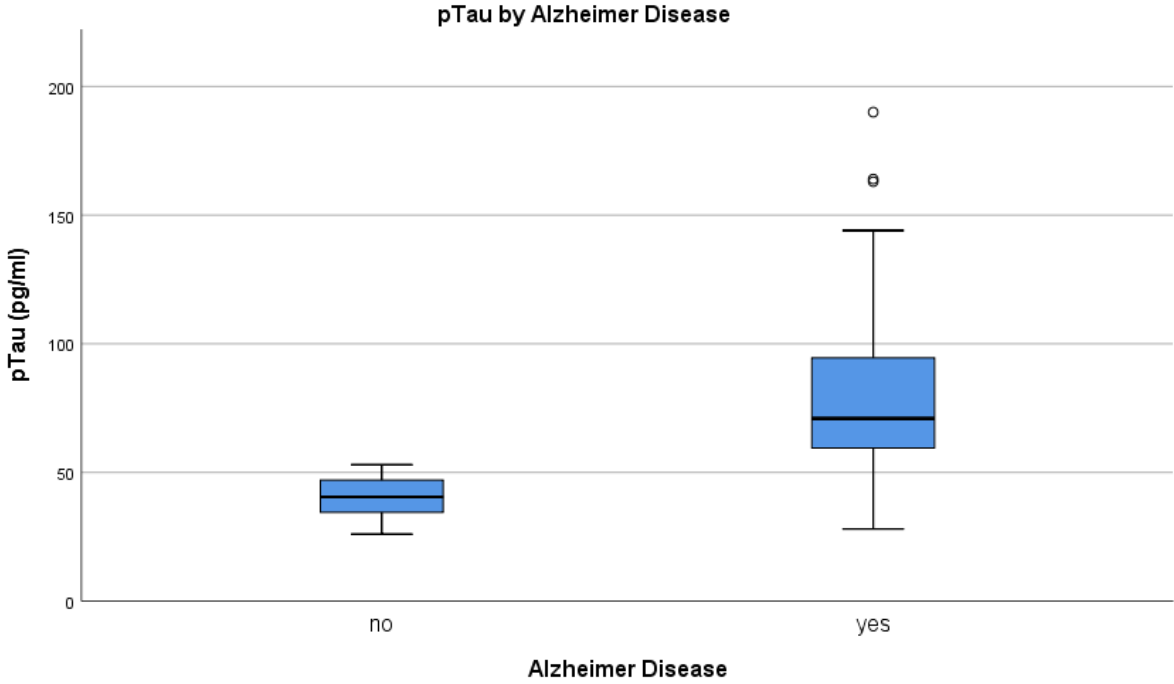


Abbildung 13: Verteilung des pTau-Werts bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit. Zur Klassifikation genutzter Marker.

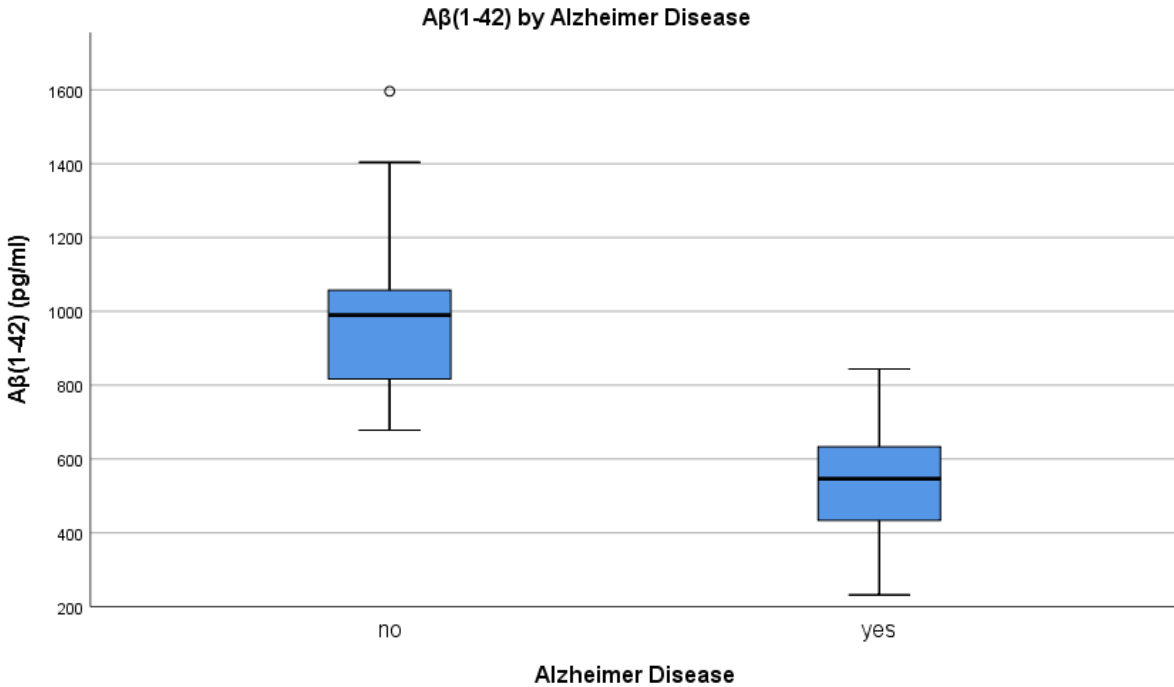


Abbildung 14: Verteilung des Amyloid-β-1-42-Werts bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit. Zur Klassifikation genutzter Marker.

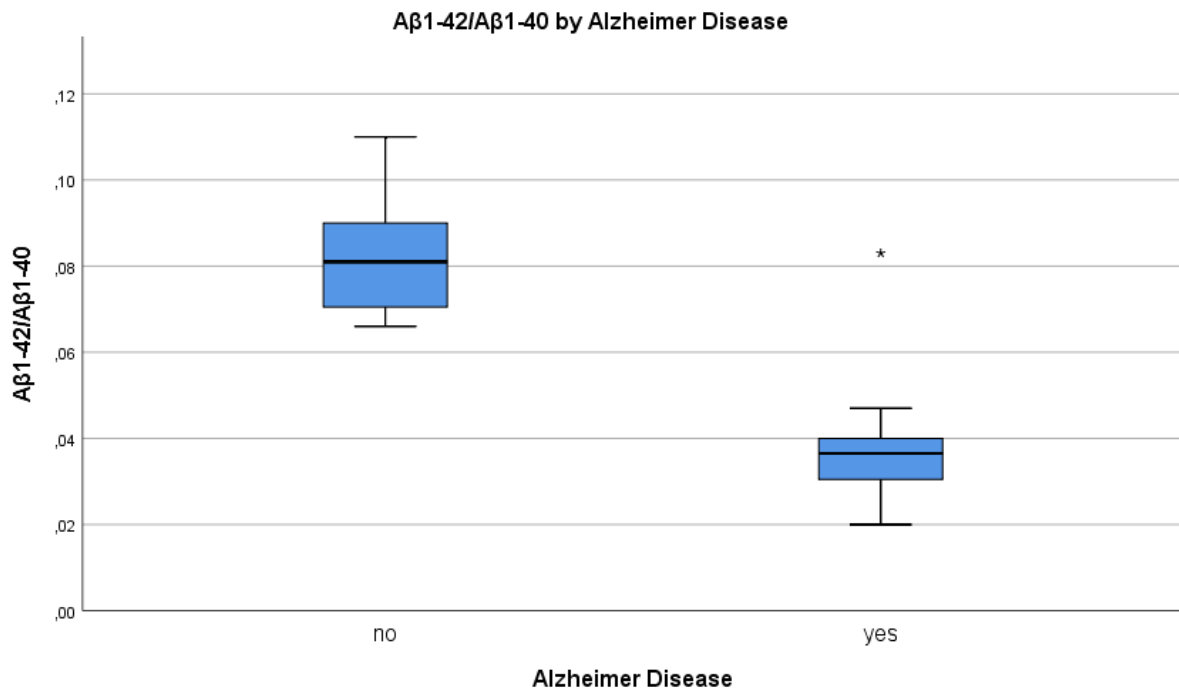


Abbildung 15: Verteilung des Quotienten aus Aβ42 zu Aβ40 bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit. Zur Klassifikation genutzter Marker.

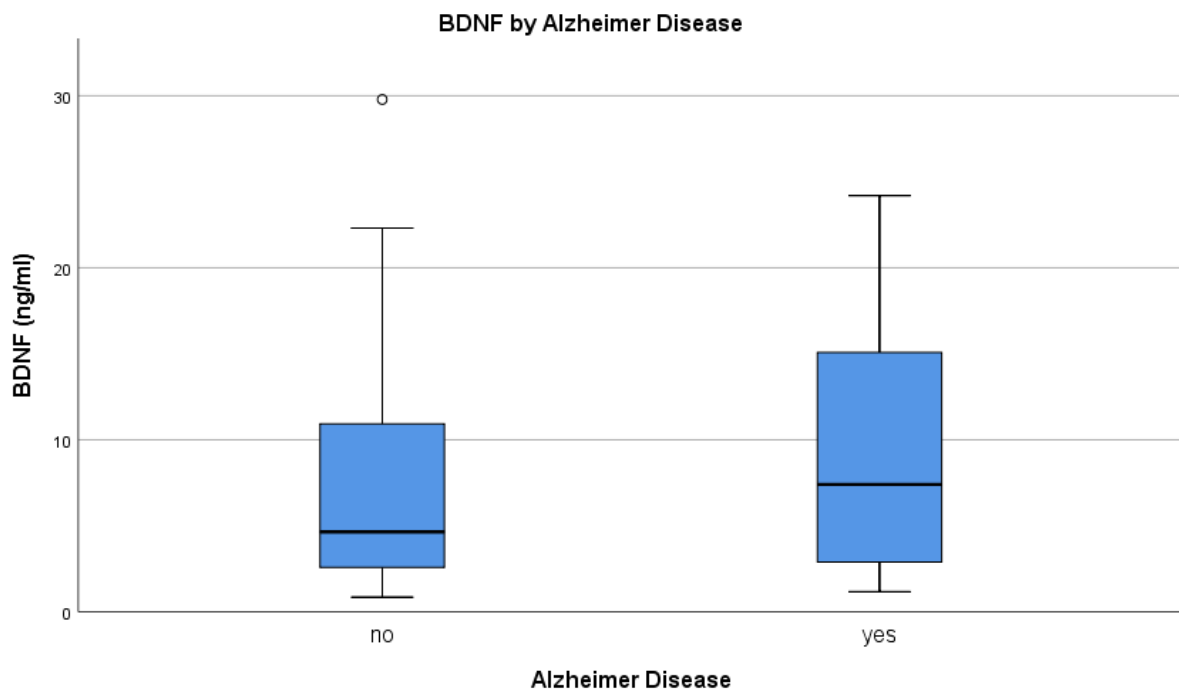


Abbildung 16: Verteilung des BDNF-Werts bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit.

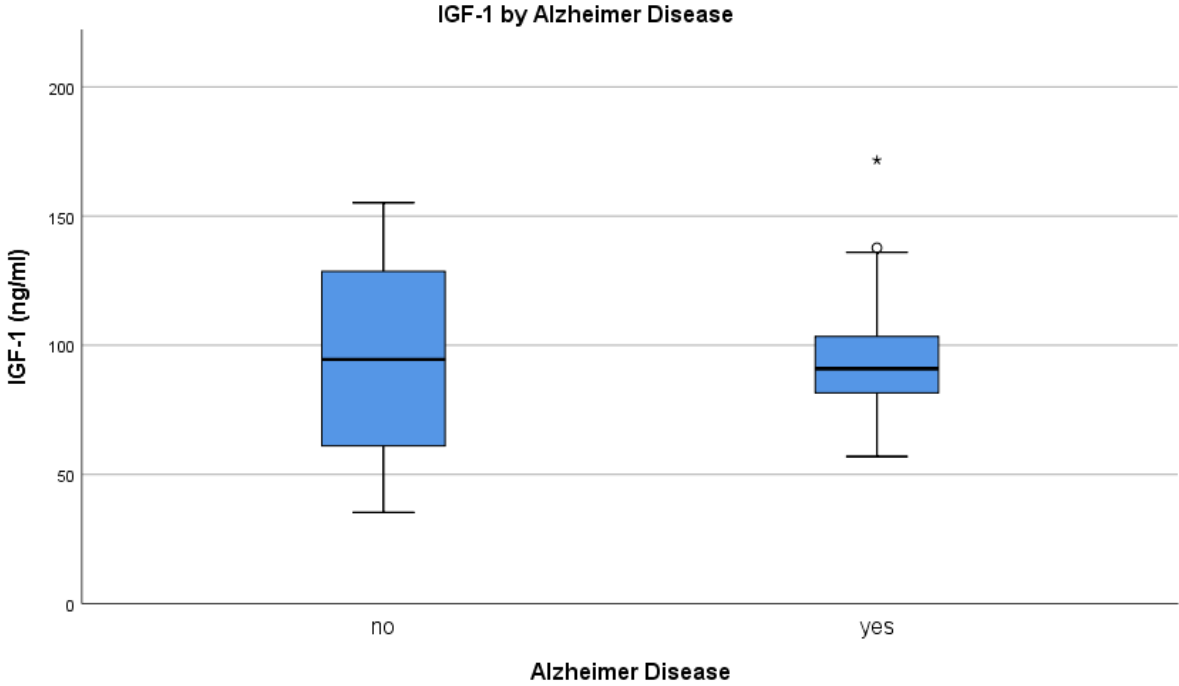


Abbildung 17: Verteilung des IGF-1-Werts bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit.

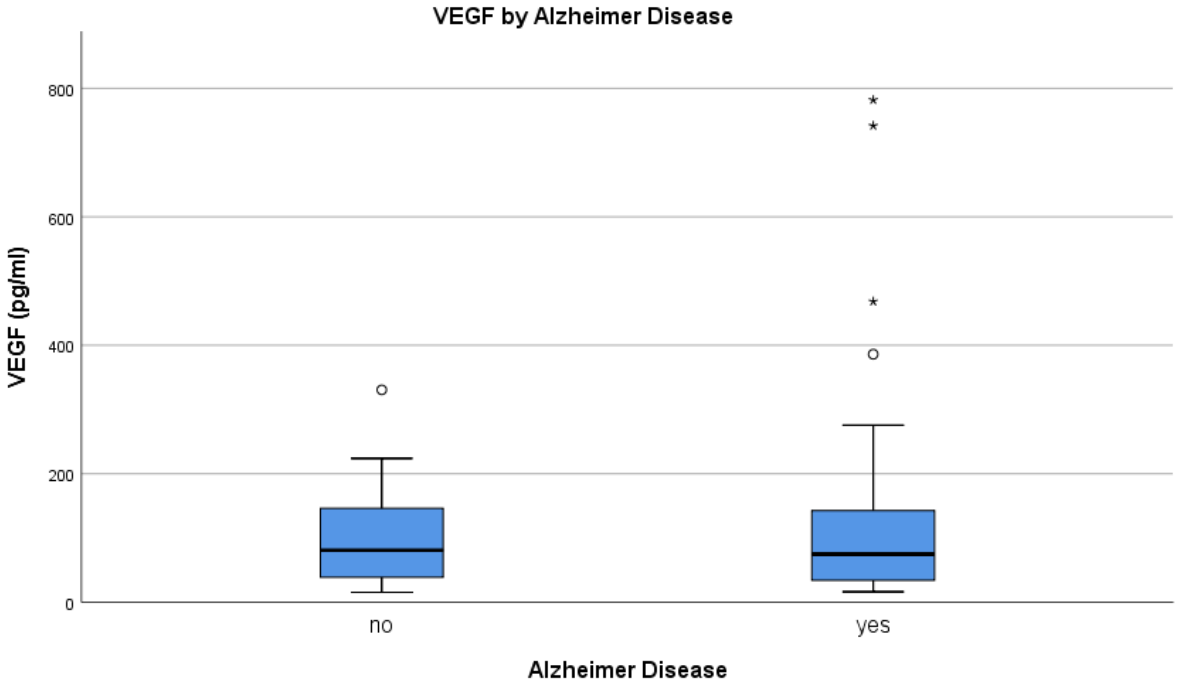


Abbildung 18: Verteilung des VEGF-Werts bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit.

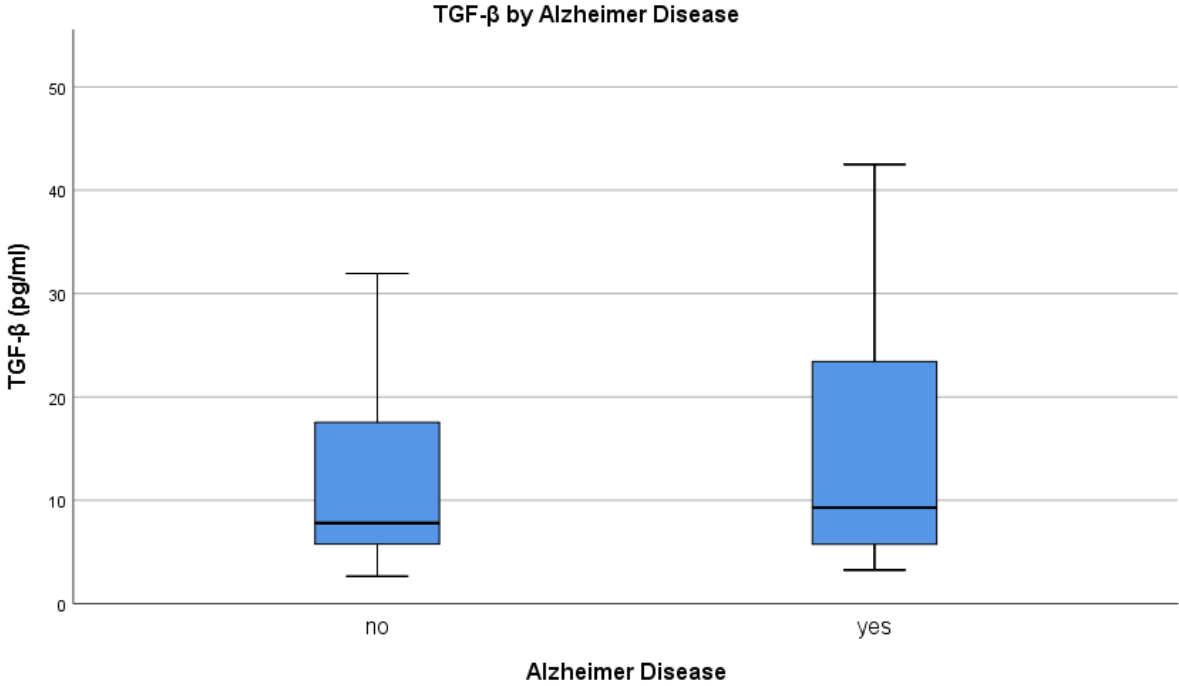


Abbildung 19: Verteilung des TGF-β-Werts bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit.

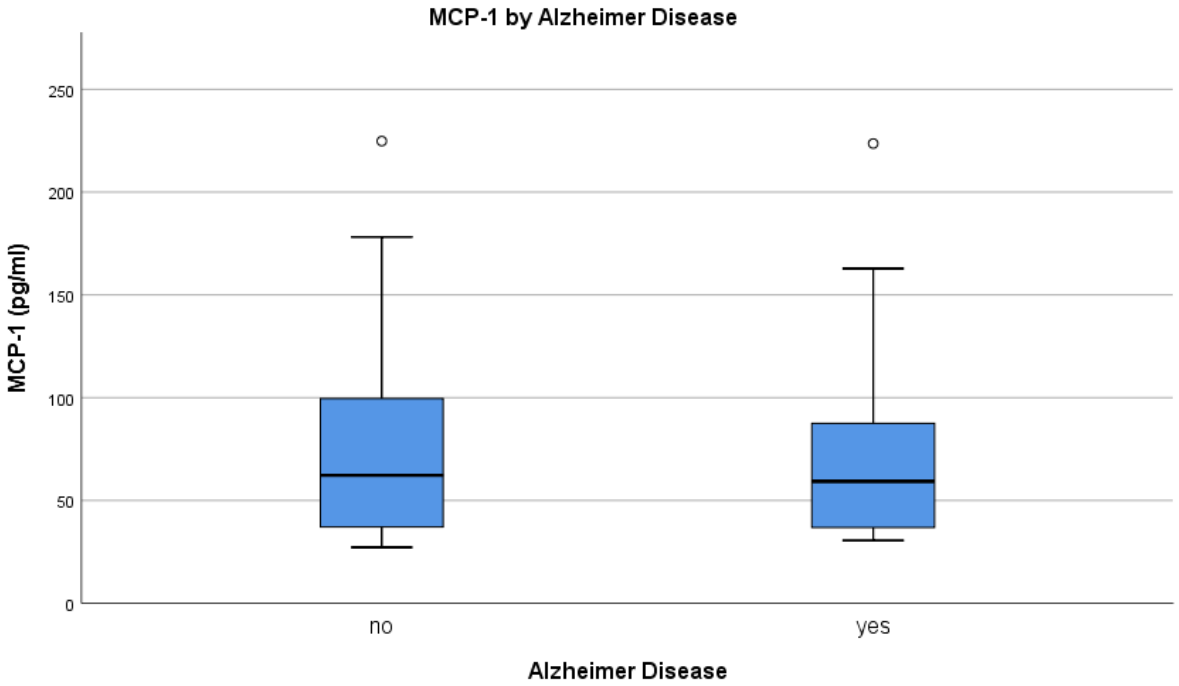


Abbildung 20: Verteilung des MCP-1-Werts bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit.

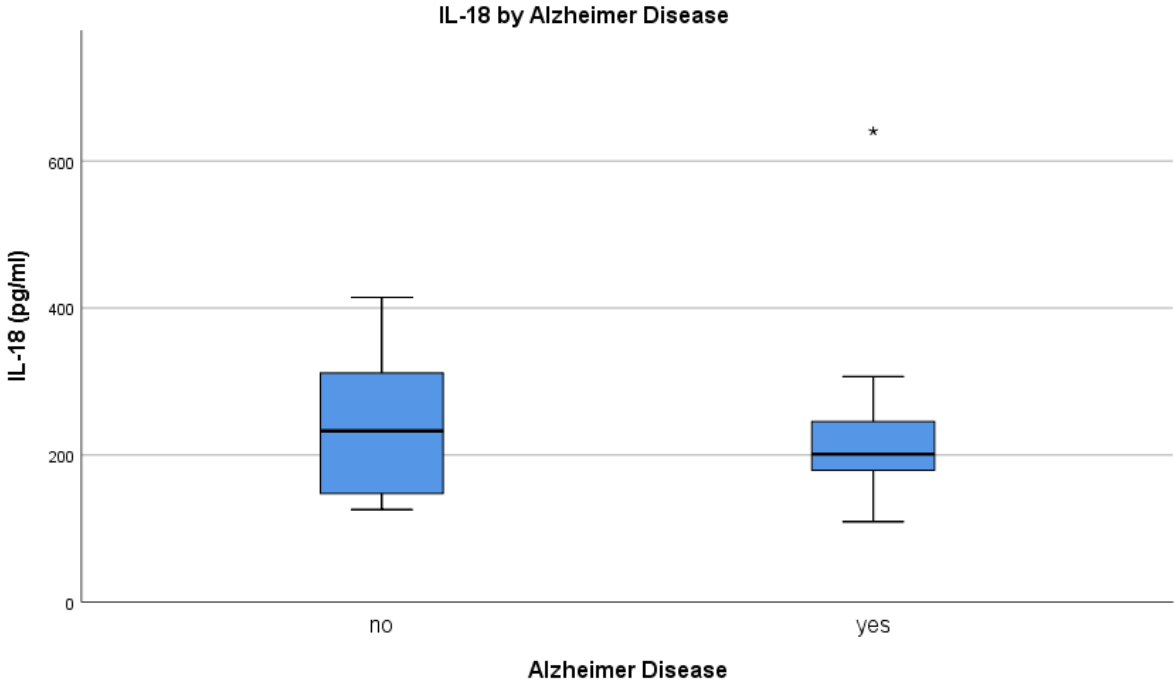


Abbildung 21: Verteilung des IL-18-Werts bei Patienten ohne Alzheimer-Krankheit und bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit.

Um die Sensitivität und Spezifität der einzelnen Biomarker zu visualisieren, verwendeten wir ROC-Analysen (siehe Abbildung 23). Die ROC-Kurven der Marker liefen dabei nahe an der diagonalen Bezugslinie, was auf eine zufällige Verteilung der Werte hindeutet. Ein Maß für die Güte des Tests, also hier die Fähigkeit der einzelnen Biomarker, MCI-AD und MCI-nonAD zu trennen, ist die Fläche unter der ROC-Kurve (Area under the curve, AUC). Sie kann Werte zwischen 0,5 und 1 annehmen, wobei ein Wert nahe der 1 eine höhere Güte anzeigt. Die errechneten AUCs der einzelnen Biomarker sind 0,570 für BDNF, 0,497 für IGF-1, 0,494 für VEGF, 0,561 für TGF- β , 0,453 für MCP-1 und 0,433 für IL-18 (siehe Tabelle 19). Alle AUCs liegen nahe an 0,5, was wie der Verlauf der ROC-Kurven für eine zufällige Verteilung der Werte spricht.

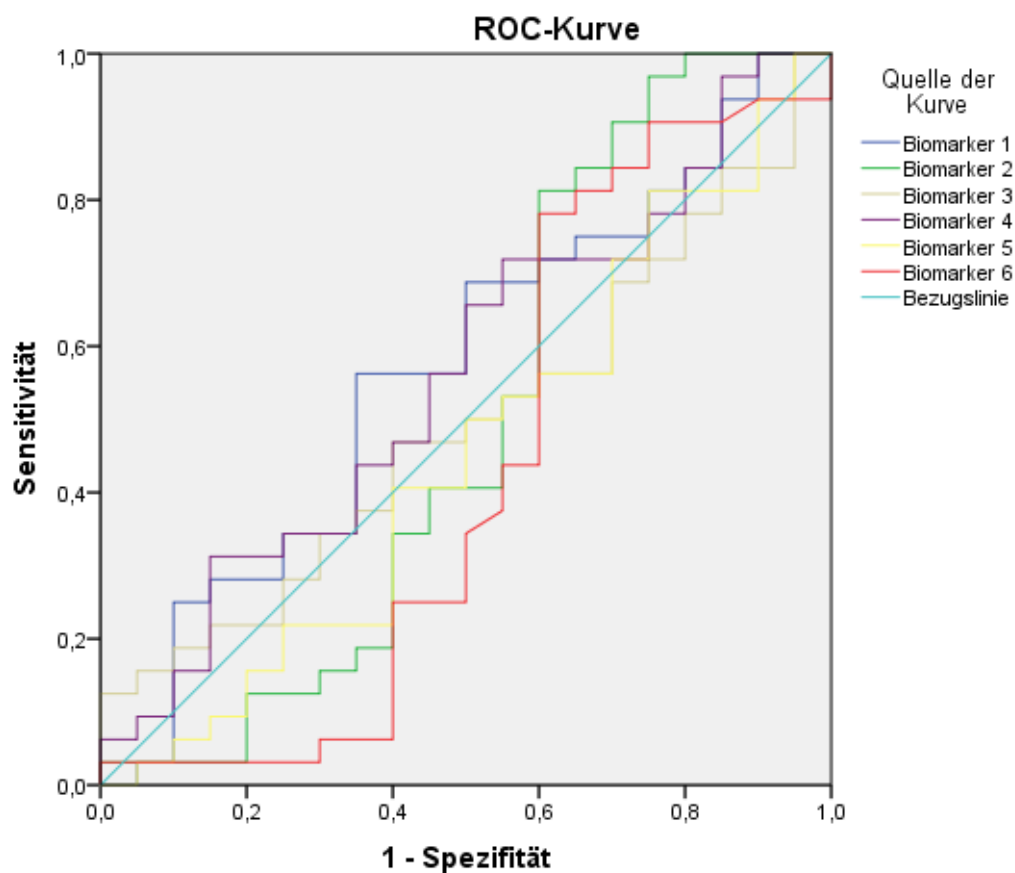


Abbildung 22: ROC-Kurven für die einzelnen Biomarker (Biomarker 1=BDNF, Biomarker 2=IGF-1, Biomarker 3=VEGF, Biomarker 4 =TGF- β , Biomarker 5=MCP-1 und Biomarker 6=IL-18). Die Kurven verlaufen nah an der diagonalen Bezugslinie, die einer zufälligen Verteilung der Werte entspricht.

<i>Biomarker</i>	<i>Fläche unter der Kurve (AUC)</i>
BDNF	0,570
IGF-1	0,497
VEGF	0,494
TGF-β	0,561
MCP1	0,453
IL-18	0,433

Tabelle 17: AUCs für die Biomarker des Panels. Die Werte liegen nahe an 0,5, was auf einen Zufallsprozess hindeutet.

Nach unseren Daten scheint das getestete blutbasierte Biomarker Panel MCI-AD- von MCI-nonAD-Patienten nicht trennen zu können. Auch die einzelnen Biomarker eignen sich nicht für eine signifikante Unterscheidung von MCI-AD- und MCI-nonAD.

Um zu testen, ob die Marker überhaupt mit der Alzheimer-Krankheit zusammenhängen, überprüften wir die Korrelationen mit den bewährten CSF-Biomarkern. Außerdem testeten wir die Blutbiomarker auf Korrelationen mit den erreichten Punktzahlen im MMST und der CDR-SOB als einen möglichen Hinweis auf einen Zusammenhang mit dem kognitiven Abbau. Schließlich bestimmten wir die Korrelationen der Biomarker untereinander, um eine Aussage darüber machen zu können, ob diese Ausdruck desselben Prozesses sein könnten. Wie bereits erwähnt, folgte der Großteil der Daten keiner Normalverteilung, weshalb wir den Korrelationskoeffizienten nach Spearman anwandten.

Die Stärke der Korrelation wurde nach Cohen (1988) eingeteilt in:

- geringe / schwache Korrelation $|r| \geq .10$
- mittlere / moderate Korrelation $|r| \geq .30$
- große / starke Korrelation $|r| \geq .50$

Anzumerken ist, dass es keine strikten Regeln für die Interpretation von Korrelationskoeffizienten gibt. Einige Autoren sprechen erst ab einem Korrelationskoeffizienten von 0,8 von einem starken Zusammenhang (Chan, 2003), andere Autoren interpretieren Korrelationen ab 0,68 als stark bzw. hoch (Taylor, 1990). Die hier verwendete Interpretation nach Cohen ist in der Literatur häufig zu finden. Es sollte jedoch bedacht werden, dass die gleiche Stärke von r von verschiedenen Forschern unterschiedlich benannt wird. Koeffizienten nahe der 1 bzw. -1 bedeuten starke beziehungsweise perfekte Korrelationen, Werte nahe der 0 bedeuten keine oder eine schwache Korrelation (Schober et al., 2018). Die Interpretation der Werte dazwischen sollte mit Vorsicht erfolgen.

Zunächst bestimmten wir die Korrelationen der CSF- und der Blut-Biomarker mit den klinischen Scores (MMST, CDR-SOB; siehe Tabelle 18). Eine signifikante negative Korrelation zeigte sich dabei zwischen MMST und tTau. Nach Cohen handelt es sich hierbei um eine

moderate Korrelation ($|r|=0,305$). Gezeigt werden konnte außerdem eine signifikante negative Korrelation zwischen IGF-1 und CDR-SOB ($|r|=0,281$), wobei diese nach Cohen nur schwach ist.

Die Biomarker im Liquor, A β 42, A β 42/40, t- und pTau, sind der aktuelle Diagnosestandard für die Alzheimer-Krankheit. Da jeder dieser CSF-Marker auf eine Alzheimer-Krankheit hinweist, sollten die Werte der einzelnen Proteine auch miteinander korrelieren. Dies bestätigte sich in unserer Studienpopulation, indem sämtliche CSF-Biomarker untereinander signifikant korrelierten (siehe Tabelle 19).

Da die CSF-Biomarker in der vorliegenden Studie als Vergleichsstandard herangezogen wurden, wurde außerdem geprüft, ob die Proteine des getesteten Biomarkerpanels mit den CSF-Biomarkern korrelieren (siehe Tabelle 20). Eine signifikante Korrelation zeigte sich lediglich bei BDNF und TGF- β mit dem A β 42/A β 40-Quotienten, und zwar einmal eine schwache (BDNF) und einmal eine moderate (TGF- β) negative Korrelation. Höhere Werte dieser Biomarker im Serum gingen in unserer Studie also mit kleineren Quotienten einher (ein Quotient kleiner 0,5 spricht für das Vorliegen der Alzheimer-Krankheit).

Anschließend wurde außerdem geprüft, ob die sechs Biomarker des Panels untereinander korrelieren, um bewerten zu können, ob diese Ausdruck desselben Prozesses sein könnten und sich dabei gleichsam oder gegensätzlich verändern (siehe Tabelle 21). BDNF, VEGF, TGF- β und MCP-1 zeigten eine starke positive Korrelation untereinander (Korrelationen: BDNF und VEGF: $r=0,628$; BDNF und TGF- β : $r=0,930$; BDNF und MCP-1: $0,690$; VEGF und TGF- β : $r=0,682$; VEGF und MCP-1: $r=0,436$; TGF- β und MCP-1: $r=0,710$. P-Wert jeweils $<0,05$).

	<i>MMST</i>	<i>CDR-SOB</i>
<i>Biomarker im Liquor</i>		
<i>Aβ42</i>	r=0,205, p=0,148	r=-0,085, p=0,552
<i>Aβ42/40</i>	r=0,121, p=0,399	r=0,035, p=0,805
<i>tTau</i>	r= - 0,305, *p=0,03	r=0,053, p=0,711
<i>pTau</i>	r= - 0,234, p=0,09	r=0,068, p=0,634
<i>Untersuchte Serum-Biomarker</i>		
<i>BDNF</i>	r=-0,1, p=0,486	r=0,241, p=0,089
<i>IGF-1</i>	r=0,127, p=0,375	r= - 0,281, *p=0,046
<i>VEGF</i>	r=-0,06, p=0,677	r=0,163, p=0,252
<i>TGF-β</i>	r=-0,037, p=0,794	r=0,143, p=0,317
<i>MCP-1</i>	r=-0,021, p=0,881	r=0,176, p=0,218
<i>IL-18</i>	r=0,154, p=0,282	r=-0,074, p=0,603

Tabelle 18: Korrelation der Marker im Liquor und Blut mit den Klinischen Parametern; signifikante Korrelationen fett markiert. Die Biomarker im Liquor sind von denen im Serum getrennt, um zu verdeutlichen, dass erstere zur Klassifizierung (AD ja/nein) genutzt wurden.

	<i>Aβ42</i>	<i>Aβ42/Aβ40- Quotient</i>	<i>tTau</i>	<i>pTau</i>
<i>Aβ42</i>		0,690, *p<0,001	-0,549, *p<0,001	-0,497, *p<0,001
<i>Aβ42/Aβ40- Quotient</i>	0,690, *p<0,001		-0,747, *p<0,001	-0,711, *p<0,001
<i>tTau</i>	-0,549, *p<0,001	-0,747, *p<0,001		0,957, *p<0,001
<i>pTau</i>	-0,497, *p<0,001	-0,711, *p<0,001	0,957, *p<0,001	

Tabelle 19: Korrelationen der CSF-Biomarker untereinander.

	<i>Aβ42</i>	<i>Aβ42/40</i>	<i>tTau</i>	<i>ptau</i>
<i>BDNF</i>	r=-0,259; p=0,064	r= -0,285; *p=,041	r=0,184; p=0,191	r=0,123; p=0,385
<i>IGF-1</i>	r= 0,160; p=0,258	r=-0,008; p=0,955	r=0,054; p=0,706	r=0,051; p=0,719
<i>VEGF</i>	r=-0,173; p=0,219	r=-0,184; p=-0,184	r=0,068; p=0,630	r=0,042; p=0,769
<i>TGF-β</i>	r=-0,218; p=0,120	r= -0,338; *p=,014	r=0,145; p=0,306	r=0,066; p=0,644
<i>MCP-1</i>	r=-0,103; p=0,469	r= -0,095; p=0,502	r=-0,038; p=0,787	r=-0,108; p=0,445
<i>IL-18</i>	r=0,081; p=0,566	r=0,063; p=0,657	r=-0,023; p=0,869	r= 0,011 p=0,940

Tabelle 20: Korrelationen zwischen den CSF- und den Serum-Biomarkern. Signifikante Korrelationen sind fett hinterlegt.

	<i>BDNF</i>	<i>TGF-β</i>	<i>VEGF</i>	<i>MCP-1</i>
<i>BDNF</i>		r=0,930, *p=<0,05	r=0,628, *p=<0,05	r=0,690. *p=<0,05
<i>TGF- β</i>	r=0,930, *p=<0,05		r=0,682, *p=<0,05	r=0,710, *p=<0,05
<i>VEGF</i>	r=0,628, *p=<0,05	r=0,682, *p=<0,05		r=0,436, *p=<0,05
<i>MCP-1</i>	r=0,690, *p=<0,05	r=0,710, *p=<0,05	r=0,436, *p=<0,05	

Tabelle 21: Die Tabelle zeigt die signifikanten Korrelationen der Serum-Biomarker untereinander. IL-18 und IGF-1 sind nicht aufgeführt, da sie keine signifikante Korrelation mit den andern Biomarkern zeigten.

Wie bereits beschrieben¹⁵, liefern Korrelationskoeffizienten nur eine Aussage über einen möglichen linearen Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen. Nicht lineare Zusammenhänge können mit einer logistischen Regressionsanalyse geprüft werden. Diese macht eine Aussage darüber, ob eine der geprüften unabhängigen Variablen (hier: die Serum-Biomarker) einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit hat, dass die abhängige Variable 1, also

¹⁵ Siehe Kapitel 2.8

der Test positiv wird (1= AD positiv). Bei der logistischen Regressionsanalyse wird zunächst mit einem Omnibus Test geprüft, ob das Modell insgesamt signifikant ist.

In unserem Fall waren die unabhängigen Variablen die sechs Serum-Biomarker und die abhängige, binäre Variable das LP-Ergebnis AD ja/nein. Bereits der Omnibus Test der Modellkoeffizienten ergab, dass das Modell als Ganzes nicht signifikant ist ($p = 0,393$).

Auch die eigentliche logistische Regression ergab keinen Zusammenhang zwischen den Biomarkern und der Wahrscheinlichkeit, dass der Test positiv wird, erkenntlich an den p-Werten, die alle weit über 0,05 liegen (siehe Tabelle 22).

<i>Biomarker</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Odds Ratio</i>
<i>IL-18</i>	0.315	0.996
<i>BDNF</i>	0.457	0.913
<i>IGF-1</i>	0.801	0.997
<i>VEGF</i>	0.567	1.002
<i>TGF-β</i>	0.171	1.148
<i>MCP-1</i>	0.071	0.980
<i>Constant</i>	0.245	6.499

Tabelle 22: Logistische Regressionsanalyse. Geprüft wird, ob die Biomarker einen Einfluss darauf haben, dass der Alzheimer-Test positiv (also 1) wird. Anhand des p-Werts, der bei keinem der Biomarker $<0,05$ ist, lässt sich erkennen, dass keiner der Biomarker einen Einfluss auf das Testergebnis hat. Gezeigt ist außer den p-Werten die Odds Ratio, die aufgrund der nicht vorhandenen Signifikanz und der Nähe zu 1 nicht weiter interpretiert wird.

Schließlich zeigt die untenstehende Tabelle sowohl die p-Werte für jeden der Serum-Biomarker als auch für die Marker im Nervenwasser und für das Alter, das Geschlecht und die Ergebnisse der Neuropsychologie (siehe Tabelle 23). Anhand der Tabelle lässt sich erkennen, dass die beiden Gruppen (AD nein und AD ja) sich nicht signifikant in Bezug auf das Alter, das Geschlecht und die Kognition unterscheiden. Signifikante Werte finden sich auch nicht bei den getesteten Biomarkern im Serum.

Der Vollständigkeit halber sind auch die p-Werte der CSF-Biomarker in der untenstehenden Tabelle aufgeführt. Da die Lumbalpunktion mit den resultierenden Liquor-Biomarkern in vorliegender Arbeit als Grundlage für die Einteilung in AD nein und AD ja diente, sind diese p-Werte nicht im Sinne einer Bewertung der Lumbalpunktion zu sehen.

	<i>AD nein</i>	<i>AD ja</i>	<i>p-Wert</i>
Patientencharakteristika			
<i>Alter bei Blutentnahme</i>	62,7 ± 11,43 (47 – 81) M: 62,5	66,8 ± 10,56 (41 – 83) M: 67,5	0,178
<i>Geschlecht</i>	M: 11/20 (55%) W: 9/20 (45%)	M: 16/32 (50%) W: 16/32 (50%)	0,781
<i>MMST</i>	26,5 ± 3,38 (17 – 30) M: 28	26,1 ± 1,99 (21 – 29) M: 26	0,237
<i>CDR global</i>	CDR 0,5: 16 (80%) CDR 1: 2 (10%) CDR 0: 1 (5%)	CDR 0,5: 32 (100%)	0,068
<i>CDR SOB</i>	2,4 ± 1,14 (1- 5) M: 2,5	2,3 ± 0,83 (1 - 4) M: 2	0,813
Kenngrößen im Liquor, die zur Klassifikation (AD ja/nein) verwendet wurden			
<i>Aβ42 (Cut Off-Wert <650 pg/ml)</i>	973,3 ± 226,47 (678 – 1596) M: 956	524,1 ± 146,19 (232 – 844) M: 546,5	<0,001
<i>Quotient Aβ42/40 (Cut off <0,05)</i>	0,1 ± 0,01 (0,07 - 0,09) M: 0,08	0,04 ± 0,01 (0,02 – 0,08) M: 0,04	<0,001
<i>tTau (Cut Off >252 pg/ml)</i>	235,3 ± 65,9 (132 – 354) M:226	672,0 ± 345,19 (149 – 1564) M: 551,5)	<0,001
<i>pTau (Cut off >60 pg/ml)</i>	39,6 ± 7.65 (26 – 53) M: 40	83,6 ± 37,77 (28 – 190) M: 71	<0,001
Untersuchte Serum-Biomarker			
<i>BDNF</i>	7,6 ± 7,64 (0,9 - 29,8) M: 4,6	8,9 ± 6,96 (1,2 – 24,2) M: 7,4	0,397
<i>IGF-1</i>	95,9 ± 38,28 (35,3 – 155,2) M: 94,5	94,8 ± 24,66 (56,9 – 171,7) M: 90,9	0,970
<i>VEGF</i>	100,0 ± 81,1 (15,6 – 330,6) M: 80,8	143 ± 193,38 (16,3 -782) M: 75	0,940
<i>TGF-β</i>	12 ± 9.09 (2,7 – 32) M: 7,8	14,3 ± 10,88 (3,3 - 42,5) M: 9,3	0,463
<i>MCP-1</i>	81,3 ± 54,66 (27, 2 – 224,8) M: 62,2	70,8 ± 45,93 (30,5 – 223,6) M: 59,3	0,573

<i>IL-18</i>	238,2 ± 93,74 (125,7 – 414,3) M: 232,8	219,9 ± 90,77 (109,3 – 640,6) M:201,1	0,419
--------------	--	---	-------

Tabelle 23: Die Tabelle zeigt Mittelwerte ± Standardabweichung, Minimum und Maximum sowie den Median. Angegeben ist außerdem der p-Wert für jeden Parameter. Die Tabelle ist aufgeteilt in Patientencharakteristika, Kenngrößen im Liquor cerebrospinalis, die zur Klassifikation (AD ja/nein) verwendet wurden, sowie die untersuchten Serum-Biomarker.

Die einzelnen Werte der CSF-Biomarker in den zwei Gruppen sind in oben abgebildeten Boxplots graphisch dargestellt (siehe Abbildungen 13-16). In der Tabelle 23 sind hinter den CSF-Biomarkern Grenzwerte („Cut-offs“) erwähnt. Diese Grenzwerte sind die für das Labor der Klinik für Psychiatrie des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München gültigen Werte für die Diagnose einer Alzheimer-Krankheit. Dabei wurden die Cut-offs für Aβ42 und tTau aus früheren Publikationen abgeleitet (Hulstaert et al., 1999), der Cut-off für CSF-pTau wurde intern festgelegt (Goldhardt et al., 2019).

Allgemeingültige exakte Grenzwerte für die einzelnen Parameter existieren heute noch nicht, weshalb die Referenzwerte individueller Labore maßgeblich sind (Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN), Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN), 2016).

4 Publikation

Die Biotechnologie Firma ©Predemtec AG entwarf den aus sechs Proteinen bestehenden, blutbasierten Biomarkertest und testete diesen in einer Validierungsstudie, die oben beschrieben ist.¹⁶ Anschließend wurden Forschungszentren kontaktiert, die als von der Firma unabhängige Institute Daten sammelten, mit denen die Firma schließlich den Test evaluieren und unter Zusammenschluss aller Daten auch publizieren konnte. Diese Publikation ist zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht gedruckt, aber als elektronische Veröffentlichung einsehbar. Dabei ist zu beachten, dass es sich bei der elektronischen Form nicht um die endgültige Version der Arbeit handelt, denn vor der Druckveröffentlichung könnten noch endgültige Änderungen vorgenommen werden. Der Inhalt der Publikation wird hier vollständigshalber trotzdem dargelegt, da er wichtig für die Beurteilung des Biomarkertests ist.

In der Validierungsstudie wurden Patienten mit mittelschwerer Alzheimer-Demenz untersucht (Schipke et al., 2019).

Hier scheint der Biomarkertest eine Trennung von AD-Patienten und Kontrollen zu ermöglichen. Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob der Test auch MCI-AD und MCI-nonAD trennen kann. Dies ist relevant, um beurteilen zu können, ob der Test als Frühdiagnostikum dienen kann. Dazu wurden Daten aus der Charité Universitätsmedizin

¹⁶ Siehe Kapitel 1.7.4.6

Berlin (Kohorte 1) und der Technischen Universität München (Kohorte 2) verwendet. Auch die Studienpopulation aus der Charité Berlin bestand wie die unsere ausschließlich aus MCI-Patienten, also MCI-AD und MCI-nonAD-Patienten, bestätigt durch die Bestimmung der CSF-Marker.

Die Proben wurden verblindet zu ©Predemtec AG geschickt. Dort erfolgten die oben beschriebene Messung der Biomarker mit ELISAs und die Einteilung in AD/nonAD mit dem von ©Predemtec AG entwickelten Algorithmus. Das Ergebnis dieser Testung ist in der vorliegenden Arbeit ausführlich dargelegt.

Für die Testungen, die in der Publikation beschrieben sind, forderte die Firma allerdings die LP-Ergebnisse der Patienten an. Es ist wichtig zu wissen, dass der Firma zum Zeitpunkt dieser Testungen die CSF-basierte Einteilung in AD/nonAD bekannt war, denn durch diese Kenntnis wurde die Verblindung aufgehoben. Eine objektive Beurteilung des Algorithmus ist so nicht möglich, da die Forscher durch die Kenntnis über die CSF-Werte beeinflusst hätten werden können. Wie folgend beschrieben, wurde der Algorithmus zunächst nur an den MCI-AD und dann nur an den MCI-nonAD Proben angewandt, anstatt verblindet an allen Proben gemeinsam. Ein Selektions-Bias ist somit nicht auszuschließen.

Zunächst wurde der Algorithmus an allen MCI-AD Patienten (Kohorte 1 +2) angewandt. Dabei erkannte der Algorithmus von 55 Patienten 47 als AD und 8 fälschlicherweise als Kontrollen. Die Accuracy (=Treffergenauigkeit) war somit bei 86%. Im nächsten Schritt wurden die MCI-AD-Patienten der beiden Kohorten getrennt getestet. Dazu muss man sich in Erinnerung rufen, dass die Fallzahl anders war als in der hier vorliegenden Arbeit, da ©Predemtec AG im Nachhinein noch einige Patienten aufgrund von Ausschlusskriterien und grenzwertigen Ergebnissen ausschloss. Das heißt, anstatt der 32 MCI-AD Patienten wurden 25 getestet. Davon erkannte der Algorithmus 21 richtig als AD, 4 wurden fälschlicherweise als Kontrollen eingestuft. Hier schaffte der Algorithmus eine Accuracy von 85%. In der Berliner Kohorte wurde eine Accuracy von 87% erreicht.

Es folgte die Testung der MCI-nonAD Patienten. Zunächst wieder alle MCI-nonAD Patienten zusammen, wobei der Algorithmus von 25 MCI-nonAD Patienten 20 fälschlicherweise als AD einstufte (siehe Abbildung 24). Von den 18 MCI-nonAD Patienten unserer Kohorte wurden nur 4 richtig erkannt, 14 wurden als „AD“ eingestuft. Ähnlich bei der Kohorte aus Berlin (n=7, davon 6 falsch als AD klassifiziert).

Aufgrund dieser Ergebnisse überprüfte ©Predemtec AG die Häufigkeitsverteilungen und Mittelwerte der Biomarkerkonzentrationen für alle 6 Biomarker in den zwei Gruppen. Dabei zeigte sich nur bezüglich des MCP-1-Werts ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen (MCI-AD/MCI-nonAD). Die MCP-1-Konzentration war bei der MCI-AD-Gruppe im Vergleich zur MCI-nonAD Gruppe signifikant verringert. Außer bei VEGF zeigten sich auch bezüglich der anderen Biomarker Unterschiede zwischen den zwei Gruppen, wobei diese nicht signifikant waren.

Man kann den Biomarkertest von ©Predemtec AG also anhand der vorliegenden Arbeit, der Validierungsstudie und der hier beschriebenen Publikation wie folgt bewerten: Eine Trennung von Patienten mit mittelschwerer Alzheimer-Krankheit und gesunden Kontrollen scheint möglich zu sein (s. Validierungsstudie). Die Anwendung des Algorithmus an den von uns

verblindeten Proben ergab eine Accuracy von nur 57,69%¹⁷, das heißt, eine Trennung von MCI-AD und MCI-nonAD war durch den Algorithmus nicht möglich. Nach Kenntnisgabe der CSF-Einteilung in AD/nonAD konnte ©Predemtec AG mit dem Algorithmus allerdings 84% der MCI-AD Patienten als solche erkennen (21 von 25).

Wenn der Algorithmus bei MCI-nonAD Patienten (validiert anhand der LP-Ergebnisse) angewandt wird, werden 80% dieser Patienten fälschlicherweise in die AD-Gruppe klassifiziert.

Man könnte also argumentieren, dass das Panel nicht die Alzheimer-Pathologie, sondern unspezifisch den kognitiven Abbau widerspiegelt. Die Patienten mit mittelschwerer Alzheimer-Krankheit wurden im Vergleich zu gesunden Kontrollen getestet. Der Algorithmus hat die AD-Patienten erkannt, aber vielleicht auf dem Boden der Neurodegeneration, die die gesunden genauso wenig zu bieten hatten wie eine AD-Pathologie. Patienten mit leichter kognitiver Störung haben fast immer irgendeine Art der Neurodegeneration, es ist nur nicht immer die Alzheimer-Pathologie. Wenn der Test die Neurodegeneration, nicht aber spezifisch die Alzheimer-Pathologie erkennt, wäre er für die Frühdiagnose der Alzheimer-Krankheit ungeeignet. ©Predemtec AG untersuchte daher in einem nächsten Schritt die Verteilungshäufigkeiten der Biomarkerkonzentrationen in den zwei Gruppen (MCI-AD und MCI-nonAD). Dabei zeigten sich Unterschiede der Häufigkeitsverteilungen für alle Marker mit Ausnahme von VEGF, wobei nur der Unterschied in der MCP-1-Konzentration signifikant war. Hier ist allerdings ein alpha-Fehler aufgrund der Vielzahl der untersuchten Korrelationen nicht unwahrscheinlich. Schlussfolgerungen bezüglich der Unterschiede in den Häufigkeitsverteilungen sind somit vorsichtig zu formulieren.

Anzumerken ist schließlich, dass in der Publikation von ©Predemtec AG nur die Accuracy bestimmt wurde, jedoch nicht die Sensitivität und Spezifität. ©Predemtec AG wandte den Algorithmus zunächst nur an den MCI-AD und dann nur an den MCI-nonAD Proben an. Eine Aussage über die Sensitivität und Spezifität ist bei diesem Vorgehen nicht möglich. Eine Anwendung des Algorithmus an allen Proben und der anschließende Vergleich der Ergebnisse (AD ja/nein) mit denen der CSF-Marker hätte eine Aussage über Sensitivität und Spezifität ermöglicht.

Zusammengefasst kann man sagen, dass das Panel der Serum-Biomarker momentan noch nicht für die Frühdiagnose geeignet ist. Da aber Patienten mit mittelschwerer AD-Demenz von Kontrollen getrennt werden konnten und sich die Biomarker-Konzentrationen auch zwischen MCI-AD und MCI-nonAD zu unterscheiden scheinen, könnte sich das Panel für die weitere Forschung nach einem minimalinvasivem, kostengünstigen und validen Biomarker als nützlich erweisen (Schipke et al., 2020).

¹⁷ Siehe Kapitel 3

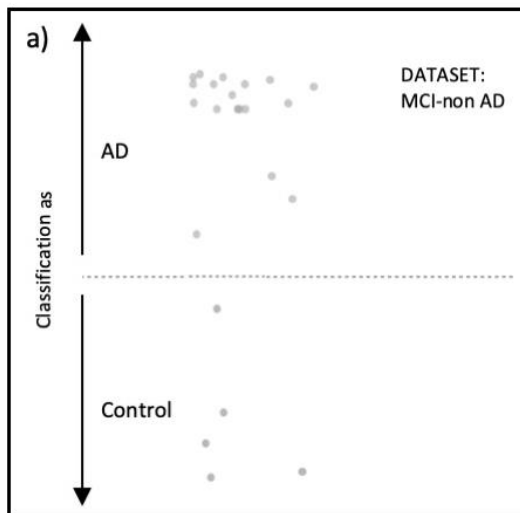


Abbildung 23: Gezeigt ist die Performance des Algorithmus bei Anwendung an den Daten der MCI-nonAD-Patienten (n=25), n=5 wurden als „Control“, n=20 als „AD“ klassifiziert. Die Grafik zeigt den Wert (y-Achse), der nach Anwendung des Algorithmus an den Datensätzen von Patienten mit MCI-nonAD in den jeweiligen Kohorten erhalten wird. Jeder Punkt repräsentiert die Daten eines einzelnen Patienten. Der Klassifikator (gepunktete Linie) zeigt die Trennung zwischen den Gruppen an. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen die Gruppenklassifikation gemäß dem Algorithmus an.

5 Diskussion

In vorliegender Arbeit wurde geprüft, ob sich die Kombination der sechs Serum-Biomarker BDNF, IGF-1, VEGF, TGF- β , MCP-1 und IL-18 bei Patienten mit leichter kognitiver Störung zur Erkennung einer zugrundeliegenden Alzheimer-Krankheit eignet. Dazu wurde die Konzentration der genannten Marker von der Firma ©Predemtec AG im Serum von 32 Patienten mit leichter kognitiver Störung bei Alzheimer-Krankheit und im Serum von 20 Patienten mit leichter kognitiver Störung ohne zugrundeliegender Alzheimer-Krankheit bestimmt.

Unter Ausschluss aller Grenzfälle und Patienten mit Ausschlusskriterien erreichte diese Kombination einen p-Wert von 0,694, unter Einbezug der gesamten Studienpopulation einen p-Wert von 0,795. Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit des α -Fehlers an, also die Wahrscheinlichkeit, dass man die Nullhypothese zugunsten der Alternativhypothese (hier: die 1. Hypothese aus der Zielsetzung) verwirft, obwohl sie gilt. Diese Wahrscheinlichkeit soll unter 5%, also unter 0,05 sein. Hier wäre die Wahrscheinlichkeit für den α -Fehler bei über 70%, weshalb man die Alternativhypothese verwerfen muss.

Unter Einbezug aller untersuchten Patienten errechneten wir eine Sensitivität von 78,13% und eine Spezifität von nur 25%, unter Ausschluss der Grenzfälle und der Patienten mit Ausschlusskriterien eine Sensitivität von 75,68% und eine Spezifität von 29,41%. Das Panel der Biomarker zeigt also eine relativ hohe Sensitivität, die für einen Screening Test als ausreichend zu bewerten wäre. Da die Spezifität aber sehr niedrig ist, wäre die Falsch-Positiv-Rate inakzeptabel hoch, somit der positive Vorhersagewert gering und folglich der Biomarker-Test für ein Screeningverfahren ungeeignet. Auch die Accuracy des Tests war mit 58,7% gering, der Test erkennt also nur etwa jeden zweiten Patienten richtig als AD oder nonAD.

Mit diesen Ergebnissen muss die erste Hypothese dieser Arbeit, die Haupthypothese, verworfen werden. Das untersuchte Panel kann MCI-AD- und MCI-nonAD-Patienten nicht signifikant trennen.

Die weiteren Hypothesen dieser Arbeit müssen nur teilweise verworfen werden. Diese Hypothesen betreffen die getesteten Korrelationen der Biomarker untereinander wie mit den erreichten Punktzahlen in der kognitiven Testung und mit den CSF-Markern. Auf die mögliche Bedeutung der gefundenen Korrelationen wird im Folgenden eingegangen. Der Übersicht halber werden die Marker des Panels in den Unterpunkten getrennt diskutiert.

5.1 Die Wachstumsfaktoren VEGF und BDNF

BDNF und VEGF sind Wachstumsfaktoren.

Die Produktion von Wachstumsfaktoren wie VEGF und BDNF im Gehirn lässt mit zunehmendem Alter nach. Besonders stark ist der Abfall bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit, unabhängig vom Stadium und der Dauer der Erkrankung (Gezen-Ak et al., 2013; Mateo et al., 2007).

5.1.1 VEGF

Im Folgenden wird zunächst auf VEGF, englisch für vascular endothelial growth factor, einen Wachstumsfaktor für Gefäße und Neuronen, eingegangen.

In verschiedenen Studien wurde über die letzten Jahre gezeigt, dass VEGF eng mit dem kognitiven Abbau in Zusammenhang steht (Huang et al., 2013; Mahoney et al., 2019; Mateo et al., 2007).

Oft wurde ein reduzierter VEGF-Spiegel im Serum von Patienten mit früher sowie fortgeschrittener Alzheimer-Krankheit beobachtet (Huang et al., 2013; Mateo et al., 2007).

Im Mausmodell konnte bei mit VEGF behandelten Mäusen ein Stillstand des kognitiven Abbaus erreicht werden (Spuch et al., 2010).

Vor diesem Hintergrund erscheint eine Reduktion des VEGF-Spiegels im Serum bei Patienten mit (Alzheimer-)Demenz plausibel – ein hoher bzw. normaler Spiegel stoppt den kognitiven Abbau, also könnte ein erniedrigter mit einer Demenz in Verbindung stehen. Allerdings ist fraglich, ob VEGF dabei spezifisch bei Alzheimer oder im Rahmen jeglichen kognitiven Verfalls verändert ist.

In der erwähnten Studie von Huang et al. (2013) wurde nicht beschrieben, ob zu den untersuchten MCI-Patienten Ergebnisse einer Lumbalpunktion vorlagen, die eine Einordnung in MCI-AD und MCI-nonAD zuließe. Die Forscher untersuchten die VEGF-Konzentrationen im Serum von Patienten mit bereits manifester Alzheimer-Demenz und von aMCI-Patienten (aMCI=amnesic MCI). Wie bereits erwähnt, geht der AD-Demenz am häufigsten eine leichte kognitive Störung vom amnestischen Typ voraus, wobei die klinische Diagnose einer aMCI nicht ausreicht, um beurteilen zu können, ob der Patient eine Alzheimer-Krankheit oder eine andere neurodegenerative Erkrankung entwickelt. Für die Forschung ist es sinnvoller, MCI Patienten mit einer durch eine Lumbalpunktion oder Bildgebung bestätigter Alzheimer-Krankheit auf die Biomarker zu untersuchen, so wie es in der vorliegenden Arbeit geschehen ist, da nur in diesem Stadium eine frühe Diagnose möglich ist.

Mateo et al. (2007) zeigten ebenfalls reduzierte VEGF-Spiegel im Serum von Patienten mit Alzheimer-Krankheit im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Sie untersuchten Patienten mit leichtgradiger, mittelschwerer und schwerer Alzheimer-Demenz, aber nicht Individuen mit leichter kognitiver Störung (Mateo et al., 2007).

Auch ©Predemtec AG erwartete eine reduzierte Konzentration von VEGF im Serum von Patienten mit Alzheimer-Krankheit und Patienten mit MCI-AD, was in dieser Arbeit allerdings nicht gezeigt werden konnte.

In all den erwähnten Studien, wie auch in der vorliegenden Arbeit, wurde nicht beachtet, dass es sich bei VEGF nicht um einen einzelnen Wachstumsfaktor, sondern um eine ganze Familie an Wachstumsfaktoren handelt. Diese Familie besteht bei Säugetieren aus fünf Liganden, drei Rezeptoren und zwei Co-Rezeptoren (Mahoney et al., 2019; A. M. Moore et al., 2020).

Viele Mitglieder bedeuten auch viele verschiedene Signalwege, die besser verstanden werden müssen, um beurteilen zu können, welche von ihnen relevant für die Neuroprotektion bzw. die Neurodegeneration sind. In einer von Mahoney et al. (2019) publizierten Studie wurden

die Konzentrationen der einzelnen Liganden und Rezeptoren post-mortem im Hirngewebe von gesunden Probanden, AD-Patienten und MCI-Patienten untersucht. Dabei wurden positive Korrelationen zwischen den Konzentrationen einiger der Liganden bzw. Rezeptoren mit der Ablagerung von Amyloid und Tau im Hirngewebe gefunden (Mahoney et al., 2019). Die hier beschriebene Studie zeigt also zu den zuvor erwähnten Arbeiten und zu den von ©Predemtec AG erwarteten VEGF-Veränderungen widersprüchliche Ergebnisse. Das lässt sich zum einen sicher darauf zurückführen, dass in der Studie von Mahoney et al. (2019) keine Serum-, sondern Hirngewebskonzentrationen bestimmt wurden. Allerdings kann der Grund auch darin liegen, dass die zuvor beschriebenen Arbeiten ebenso wie ©Predemtec AG der Tatsache, dass es verschiedene Mitglieder der VEGF-Familie gibt, keine Beachtung schenken. Um in Zukunft zielführender an dem Zusammenhang zwischen VEGF und kognitivem Abbau bzw. der Alzheimer-Pathologie forschen zu können, wäre eine Trennung der Familie und eine separate Untersuchung der einzelnen Liganden und Rezeptoren eventuell zielführender.

5.1.2 BDNF

Der zweite Wachstumsfaktor des Biomarker-Panels dieser Arbeit ist BDNF, englisch für brain derived neurotrophic factor. BDNF ist ein Neurotrophin, das für das Überleben, die Entwicklung und die Funktion der Neurone relevant ist (Acheson et al., 1995).

BDNF wird überwiegend im Hippocampus, im Cortex und im basalen Frontalhirn, also wichtigen Regionen für das Lernen und das Gedächtnis, exprimiert. Hier fördert BDNF die Neurogenese und das Wachstum sowie die Plastizität der Synapsen (Lu et al., 2013).

In Anbetracht des Wissens über die neuroprotektiven Funktionen von BDNF würde man bei neurodegenerativen Erkrankungen eine Reduktion des Spiegels erwarten. Die Studienlage hierzu ist allerdings sehr heterogen. Einige Forschungsgruppen berichteten von erniedrigten (Gezen-Ak et al., 2013; Weinstein et al., 2014), andere von erhöhten Konzentrationen von BDNF im Serum bei Patienten mit AD-Demenz und MCI (Angelucci et al., 2010).

Erniedrigte BDNF-Konzentrationen im Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit zeigten unter anderem Gezen-Ak et al. (2013). Sie fanden eine signifikante Reduktion der BDNF-Serumspiegel bei Patienten mit Early- und Late-Onset-AD im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Ein relevanter Unterschied der Konzentrationen bei Patienten mit MCI und gesunden Kontrollen konnte hier allerdings nicht festgestellt werden (Gezen-Ak et al., 2013).

Angelucci et al. (2010) beschrieben erhöhte BDNF-Serum-Spiegel bei Patienten mit leichtgradiger, mittelschwerer und schwergradiger Alzheimer-Demenz, sowie Patienten mit leichter kognitiver Störung im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Angelucci et al., 2010).

Hier wurde jedoch nicht beschrieben, ob sich BDNF als Biomarker eignet, um MCI-AD von MCI-nonAD zu unterscheiden.

In einer großen Metaanalyse aus dem Jahr 2019 befasste sich eine Forschungsgruppe mit den widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich der BDNF-Konzentrationen bei Patienten mit AD-Demenz und MCI (Ng et al., 2019). In dieser Arbeit wurden das Alter und die MMST-Scores als signifikante Moderatoren identifiziert, die die große Heterogenität in den untersuchten

Studien erklären könnten. Auch Faktoren wie das Studiendesign würden dazu beitragen, dass es uneinheitliche Ergebnisse gebe. Sie stellten außerdem fest, dass einige Studien pro BDNF, also die Vorstufe von BDNF, und andere das mature BDNF, also das reife BDNF, untersuchten. Da diese beiden Formen nicht die gleiche Funktion haben, forderte die Forschungsgruppe die Verwendung von Assays, die nur das reife BDNF messen. Nach Auswertung vieler Studien schlussfolgerten die Autoren der genannten Metaanalyse, dass die Konzentration von BDNF im Serum bei Patienten mit bereits voll ausgebildeter AD-Demenz signifikant reduziert im Vergleich zu gesunden Kontrollen ist, und dass es keinen Unterschied der BDNF-Konzentration bei MCI-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen gibt. Da allerdings einige der in die Metaanalyse eingeschlossenen Studien erhöhte BDNF-Level bei MCI Patienten gezeigt hatten, postulierten die Autoren der Metaanalyse, dass BDNF zu Beginn der Neurodegeneration als Versuch, Neurone und Synapsen zu retten, hochreguliert sein könnte, und im Verlauf der Erkrankung als Ausdruck des versagenden Mechanismus im Rahmen der zunehmenden Neurodegeneration im Serum sinke (Ng et al., 2019).

Auch ©Predemtec AG berichtete im Rahmen der von der Firma durchgeführten Validierungsstudie von reduzierten BDNF-Konzentrationen im Serum von Patienten mit fortgeschrittener Alzheimer-Krankheit. In der erwähnten aktuellen Publikation¹⁸ werden auch erniedrigte BDNF Konzentrationen bei Patienten mit MCI-AD beschrieben, wobei dieser Unterschied nicht signifikant ist. In unserer Stichprobe zeigte sich kein Unterschied der BDNF-Konzentration im Serum von MCI-AD-Patienten im Vergleich zu MCI-nonAD-Patienten ($p=0,397$).

In Bezug auf die genannte Metaanalyse von Ted Zheng Siang et al. (2019) lässt sich anmerken, dass auch in vorliegender Studie kein Unterschied zwischen pro- und mature-BDNF gemacht wurde. Bezüglich der als signifikante Moderatoren angeprangerten Faktoren Alter und MMST-Score kann man jedoch sagen, dass in unserer Studienpopulation kein wesentlicher Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich dieser Faktoren bestand (siehe Tabelle 23).

In vorliegender Arbeit unterschieden sich die zwei Gruppen also weder in Bezug auf VEGF noch auf BDNF. Es konnte jedoch eine positive Korrelation von BDNF zu VEGF, sowie zu den Biomarkern TGF- β und MCP-1, gezeigt werden. Das spricht dafür, dass diese Biomarker Ausdruck desselben Prozesses sind. Jedoch korrelierten diese Biomarker zwar untereinander, aber nicht mit der Schwere der Erkrankung (gemessen an der erreichten CDR-SOB und der Punktzahl im MMST), also mit dem kognitiven Abbau. Eine Korrelation mit den Amyloid-Markern im Nervenwasser zeigte sich lediglich bei BDNF. Hier zeigte sich eine negative Korrelation mit dem A β 42/A β 40-Quotienten. Das könnte dafür sprechen, dass eine Zunahme der BDNF-Konzentration im Serum die Alzheimer-Pathologie widerspiegelt. In der hier getesteten Biomarker-Kombination eignete sich BDNF trotzdem nicht als diagnostischer Marker. Andere Biomarker-Kombinationen sowie die Testung an größeren Stichproben könnten Aufschluss bringen. Bezüglich der Korrelation von BDNF mit VEGF sowie mit den Markern TGF- β und MCP-1 kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Gruppe der Biomarker, die miteinander korreliert, denselben Prozess widerspiegelt, jedoch lässt sich

¹⁸ Siehe Kapitel 4

anhand unserer Daten nicht sagen, ob dieser Prozess die voranschreitende Alzheimer-Pathologie ist, da nur BDNF auch mit den Markern der Alzheimer-Pathologie im CSF korreliert.

5.2 IGF-1

IGF-1, Insulin-Like-Growth-Factor 1, wird durch den Einfluss von Growth Hormone (GH) aus der Hypophyse vor allem in der Leber produziert und steigert bei Ausschüttung unter anderem das Körperwachstum, die Lipolyse, den Anstieg der Blutglucose und die Proteinsynthese. Bei erniedrigten IGF-1-Spiegeln steigt die Insulinresistenz und somit auch das Risiko für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes mellitus. Die Insulin-Resistenz, der Diabetes sowie weitere metabolische Faktoren erhöhen das Risiko einer Alzheimer-Krankheit (Ghareeb et al., 2013). IGF-1 gelangt außerdem durch die Blut-Hirn-Schranke in das Hirngewebe, wo es unter anderem für den Abtransport von β -Amyloid sorgt (Carro & Torres-Aleman, 2006; Trueba-Saiz et al., 2013). Gezeigt werden konnte außerdem, dass IGF-1 die Phosphorylierung des APP (Amyloid-Precursor-Protein) verringert. Die APP-Phosphorylierung stellt einen Schlüsselschritt bei der Förderung der Amyloid-Plaquebildung bei Alzheimer dar (B. Kim et al., 2019).

IGF-1 reguliert zudem die Neurogenese (Åberg et al., 2000), das Wachstum von Dendriten (C. M. Cheng et al., 2003), die Bildung von neuen Synapsen (O'Kusky et al., 2000) und spielt so eine wichtige Rolle für die Kognition und eine normale Hirnfunktion (Saenger et al., 2011).

Eine Reduktion des IGF-Spiegels geht mit einer Beeinträchtigung der kognitiven Funktion und einem verminderten Abtransport des β -Amyloids einher und begünstigt so die Genese neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit (Freude et al., 2009).

Man weiß zusammenfassend also, dass IGF-1 neuroprotektive Funktionen und einen Einfluss auf die neuropathologischen Veränderungen der Alzheimerkrankheit hat. Trotzdem zeigen die meisten Studien über die Blutspiegel von IGF-1 bei AD sehr widersprüchliche Ergebnisse:

Ostrowski et al verglichen in einer Metaanalyse verschiedene Studien zu IGF-1-Spiegeln bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit und stellten fest, dass einige Studien von erhöhten, andere jedoch von erniedrigten IGF-1-Spiegeln berichteten. Sie schlussfolgerten, dass die IGF-1-Konzentration bei Alzheimer individuell verschieden sein könnte (Ostrowski et al., 2016).

In vorliegender Arbeit wurde eine negative Korrelation des IGF-1-Spiegels im Serum mit der Punktzahl in der CDR-SOB gezeigt. Dies könnte bedeuten, dass eine Zunahme kognitiver Defizite durch eine Reduktion des IGF-1-Spiegels im Serum widerspiegelt wird.

Da die mit der CDR bzw. CDR-SOB festgestellten kognitiven Defizite keinesfalls spezifisch für die Alzheimer-Krankheit sind, lässt sich anhand dieser Korrelation nicht beurteilen, ob sich IGF-1 als Biomarker für die Alzheimer-Krankheit eignen könnte. Da der Vergleich der IGF-1-Konzentrationen zwischen den zwei Gruppen keine signifikante Trennung von MCI-AD und MCI-nonAD erreichte (p -Wert 0,970), lässt sich anhand unserer Daten vermuten, dass es sich eher um einen unspezifischen Marker kognitiver Beeinträchtigung als um einen Marker der frühen Alzheimer-Pathologie handeln könnte.

Wie erwähnt, wurde in vielen Studien gezeigt, dass IGF-1 einen direkten Einfluss auf die Alzheimer-Pathologie hat, sodass sich IGF-1 als Biomarker eignen könnte (Carro & Torres-Aleman, 2006; B. Kim et al., 2019; Trueba-Saiz et al., 2013).

Da dies in vorliegender Arbeit nicht gezeigt werden konnte, ist weitere Forschung nötig, um die Rolle des IGF-1 in der Diagnostik der Alzheimer Krankheit beurteilen zu können.

5.3 TGF- β

TGF- β ist ein antiinflammatorisches Zytokin, dem außerdem neuroprotektive Funktionen sowie ein positiver Einfluss auf das Wachstum und die Funktion von Synapsen zugeschrieben werden (Cao et al., 2020; Hu et al., 2018)

Zu den TGF- β -Leveln im Serum bei Alzheimer-Patienten existieren verschiedene widersprüchliche Studien (Chao et al., 1994; Huang et al., 2013; Rodriguez-Rodriguez et al., 2007). So berichteten Chao et al. (1994) von erhöhten, Huang et al. (2013) und Mocali et al. (2004) hingegen von reduzierten Spiegeln im Serum von Patienten mit Alzheimer-Krankheit. In vorliegender Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied der TGF- β -Konzentration bei MCI-AD im Vergleich zu MCI-nonAD festgestellt ($p=0,463$).

In einer Studie von Bernhardt et al wurde die Rolle des TGF- β -Signalwegs in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit und die Konzentration des Proteins bei Erkrankten diskutiert (von Bernhardt et al., 2015). Die Auswertung einiger Studien ergab, dass die TGF- β -Konzentrationen bei Alzheimer Krankheit im Nervenwasser erhöht ist und sich Ablagerungen des Zytokins in den Amyloid-Plaques zeigen (Burton et al., 2002; Elliott & Blobe, 2005).

Auch zuvor wurde TGF- β bereits in den Amyloid-Plaques im Gehirn von Alzheimer-Patienten gefunden (van der Wal et al., 1993). Gezeigt werden konnte auch, dass die Rezeptoren für TGF- β im an Alzheimer erkrankten Gehirn reduziert sind und Signalwege gestört ablaufen, was zu einer gesteigerten Amyloid-Akkumulation und Neurofibrillenformation führt (Tesseur et al., 2006).

TGF- β wirkt also im Grunde antiinflammatorisch und neuroprotektiv, durch den defekten Signalweg im Alzheimer kranken Gehirn kommt es aber durch eben dieses Zytokin zu einer Zunahme der Plaqueentstehung und der Neurodegeneration. Dabei scheint dann das Zytokin selbst in den Plaques zu akkumulieren.

In vorliegender Studie wurde eine negative Korrelation der TGF- β -Werte mit dem A β 1-42/A β 1-40-Quotienten beobachtet. Diese Beobachtung passt zu den Erkenntnissen aus den oben genannten Studien: Es scheint einen Zusammenhang zwischen den TGF- β -Spiegeln und der Amyloid-Pathologie zu geben. Die beobachtete negative Korrelation könnte bedeuten, dass steigende TGF- β -Werte zu einer vermehrten Akkumulation von A β 42 führt, was sich in einer Reduktion des A β 1-42/A β 1-40-Quotienten darstellt. Da TGF- β aber laut oben genannter Studien selbst in den Plaques zu akkumulieren scheint, ist die von uns beobachtete Korrelation eher als widersprüchlich zu diesen Studien zu sehen.

Auch wenn in unserer Stichprobe kein signifikanter Unterschied zwischen den TGF- β -Leveln bei MCI-AD und MCI-nonAD gezeigt werden konnte, so könnten die Ergebnisse aus der Validierungsstudie und der Verifizierungsstudie von ©Predemtec AG doch bedeuten, dass sich das Zytokin als Biomarker eignen könnte. Auch der in verschiedenen Studien gezeigte Zusammenhang zwischen TGF- β und der Amyloid-Pathologie deutet auf eine mögliche Eignung als Biomarker hin. Da die Heterogenität in den bisherigen Studien allerdings noch sehr hoch ist, wird es noch weiterer Forschung bedürfen, bis TGF- β tatsächlich zur Frühdiagnose der Alzheimer-Krankheit eingesetzt werden wird.

5.4 IL-18 und MCP-1

IL-18 und MCP-1 sind proinflammatorische Zytokine. Wie bereits erwähnt, spielt die Neuroinflammation eine relevante Rolle in der Entstehung der Alzheimer-Krankheit (Heneka et al., 2010).

5.4.1 IL-18

IL-18 scheint dabei einen direkten Einfluss auf die Ablagerung des β -Amyloids zu haben. Dies zeigten Sutinen et al., als sie Neuronen ähnliche Zellen mit IL-18 beimpften. Dies führte zu einer Zunahme der β - und, über eine vermehrte Expression von Präsenilin 1 und 2, auch zu einer Zunahme der γ -Sekretase. Da β - und γ -Sekretase Teil der Amyloid-fördernden Prozession des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) sind, entsteht durch den Einfluss des IL-18 mehr A β 42 und es kommt zu einer Zunahme der Plaquebildung. Gezeigt werden konnte außerdem, dass IL-18 die Phosphorylierung des APP fördert, was wiederum die Arbeit der β -Sekretase erleichtert und so ebenfalls den Amyloid-fördernden Signalweg unterstützt (Sutinen et al., 2012).

In Bezug auf diese Erkenntnisse würde man eine Korrelation der IL-18 Level mit der Konzentration des A β -42 und dem A β -42/A β 40-Quotienten erwarten. Dies ließ sich in vorliegender Arbeit jedoch nicht zeigen. Es zeigte sich auch keine Korrelation mit den anderen getesteten Biomarkern und vor allem kein signifikanter Unterschied in der IL-18 Konzentration zwischen den beiden Gruppen (MCI-AD und MCI-nonAD). In der Validierungsstudie von ©Predemtec AG konnten allerdings signifikant erhöhte IL-18-Level bei Patienten mit mittelschwerer AD-Demenz im Vergleich zu gesunden Kontrollen gezeigt werden. Man könnte also postulieren, dass sich die Veränderung der IL-18 Konzentration erst ab einem fortgeschrittenerem Stadium zeigt. Möglicherweise zeigt der Anstieg der IL-18-Level aber auch die zunehmende Neurodegeneration und damit die zunehmende Neuroinflammation an, die nicht spezifisch für die Alzheimer-Krankheit ist. Dazu würde passen, dass sich unterschiedliche Konzentrationen bei AD Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (also Probanden ohne Neurodegeneration), aber nicht bei MCI-AD im Vergleich zu MCI-nonAD zeigten. Patienten mit MCI-nonAD sind im Gegensatz zu gesunden Kontrollen nicht gesund,

denn auch sie haben eine milde kognitive Einschränkung und somit oft eine Form der Neurodegeneration im Rahmen einer anderen Erkrankung als der Alzheimer-Krankheit.

5.4.2 MCP-1

MCP-1, Monocyte chemotactic protein-1, ist ein Chemokin, das wie andere Chemokine an der Inflammation beteiligt ist, in dem es unter anderem Immunzellen wie Monozyten und Lymphozyten zum Ort des Geschehens lockt. Die dadurch geförderten Inflammationsprozesse fördern den Alterungsprozess des Organismus (Chung et al., 2011).

Dabei haben periphere Inflammationsmarker wie MCP-1 nicht nur einen Einfluss auf den peripheren, sondern auch auf den zentralen Alterungsprozess, in dem sie die Neurogenese im Hippocampus behindern (Villeda et al., 2011).

So konnte bei MCP-1 Knockout-Mäusen eine gesteigerte Neurogenese gezeigt werden (S. W. Lee et al., 2013). Durch den hemmenden Einfluss auf die Neurogenese scheint MCP-1 die Neurodegeneration voranzutreiben: höhere MCP-1-Blutkonzentrationen korrelieren mit zunehmendem kognitivem Abbau (W.-J. Lee et al., 2018).

Gezeigt werden konnte auch, dass der Zusammenhang zwischen MCP-1 und der Kognition spezifisch für das episodische Gedächtnis ist (Bettcher et al., 2016).

Das episodische Gedächtnis ist ein Teil des deklarativen Langzeitgedächtnisses. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit zunächst das episodische Gedächtnis gestört ist (Bäckman et al., 2001; Kramer et al., 2003).

Die Assoziation zwischen MCP-1 Blutspiegeln und dem episodischen Gedächtnis könnte bedeuten, dass sich MCP-1 als Biomarker für die frühe AD-Demenz eignet. Mit dieser Hypothese haben sich bereits einige Forschungsgruppen befasst.

Galimberti et al. (2006) konnten dabei erhöhte MCP-1-Serum-Konzentrationen bei Patienten mit leichter kognitiver Störung und zugrundeliegender Alzheimer-Krankheit feststellen. Bei voranschreitender Alzheimer-Krankheit beobachteten sie jedoch sinkende MCP-1-Konzentrationen (Galimberti et al., 2006). Auch in der oben beschriebenen Validierungsstudie von ©Predemtec AG konnten signifikant reduzierte MCP-1-Konzentrationen bei Patienten mit moderater AD-Demenz gezeigt werden (Schipke et al., 2019).

Galimberti et al. (2006) schlussfolgerten aus ihren Beobachtungen folgende Hypothese: bei beginnender Alzheimer-Krankheit (oder womöglich schon lange Zeit davor) sind die MCP-1 Spiegel im Rahmen der gesteigerten Inflammationsprozesse erhöht. Wenn man davon ausgeht, dass die Neuroinflammation Antwort auf die Neurodegeneration und ein Versuch des Gehirns ist, diese aufzuhalten, kann man die sinkenden Spiegel im Verlauf der Krankheit als Versagen des Immunsystems interpretieren. Erhöhte MCP-1 Spiegel korrelieren demnach mit frühen Formen der Alzheimer-Krankheit, erniedrigte MCP-1-Spiegel mit fortgeschrittenen Stadien.

Widersprüchlich zu dieser Hypothese sind allerdings die oben beschriebenen Beobachtungen, dass MCP-1 die Neurogenese hemmt. Ein Versuch des Immunsystems, die Neurodegeneration aufzuhalten, würde kaum die Produktion eines Chemokins beinhalten, das diese vorantreibt.

Die Beobachtungen bezüglich MCP-1 und dessen Einfluss auf neurodegenerative Prozesse sind also noch sehr heterogen, genauso wie die Studien bezüglich der Konzentration von MCP-1 in den verschiedenen Stadien der Alzheimer-Krankheit. Teilweise konnte auch kein Unterschied in der Serumkonzentration von MCP-1 bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit im Vergleich zu Kontrollen festgestellt werden, wie in einer Studie mit Patienten mit moderater Alzheimer-Krankheit im Vergleich gesunden Kontrollen, aber auch in hier vorliegender Arbeit bei MCI-AD- im Vergleich zu MCI-nonAD-Patienten (Fenoglio et al., 2004).

Auch konnte hier keine Korrelation von MCP-1 zu den CSF-Markern gezeigt werden.

Dass MCP-1 eine Rolle in neurodegenerativen Prozessen spielt, wurde in vielen Studien beschrieben. Fraglich ist anhand der Heterogenität der bisherigen Forschungsergebnisse allerdings, ob sich MCP-1 als Biomarker für die Alzheimer-Krankheit handelt. Möglicherweise ist MCP-1 ein unspezifischer Neuroinflammationsmarker und in seiner Konzentration individuell im Krankheitsverlauf unterschiedlich.

5.5 Limitationen der Studie

Die hier beschriebene Studie wurde zusammen mit der Biotechnologie-Firma ©Predemtec AG durchgeführt. Durch diese Zusammenarbeit hat die vorliegende Arbeit einige Limitationen, auf welche im Folgenden genauer eingegangen wird. Am relevantesten ist die Abhängigkeit von der Herstellerfirma.

Die genannte Herstellerfirma hatte den Bluttest entworfen und bereits in einer Pilotstudie mit herausragenden Ergebnissen getestet. Diese Pilotstudie wurde hier nicht dargestellt, da die Firma die Daten aus dieser später verwarf und durch die Ergebnisse aus oben beschriebener Validierungsstudie ersetzte.¹⁹ Zur Evaluation des Bluttests wurden verschiedene Forschungszentren kontaktiert, so auch das Zentrum für kognitive Störungen in München. Die Patientenrekrutierung und die Verarbeitung des Blutes fanden im Zentrum für kognitive Störungen statt. Die Seren wurden nach Abschluss der Probengewinnung verblindet zu ©Predemtec AG gesendet, wo die Testung der Biomarker erfolgte. ©Predemtec AG gab die Werte der Biomarker sowie die Einordnung in AD/nonAD bekannt, nicht jedoch den Prozess, welcher zur Einordnung in die zwei Gruppen erfolgte. Da keine Details über die Testverfahren weitergegeben wurden, waren uns die Grundlagen für ein positives Testergebnis sowie Informationen zur analytischen Performance der eingesetzten Verfahren nicht bekannt. Die Messung der Proben erfolgte im Jahr 2017. Zwei Jahre später publizierte ©Predemtec AG die oben beschriebene Validierungsstudie. In dieser Publikation wurden die eingesetzten Messverfahren, die auch bei den von uns zugesandten Proben Verwendung fanden, beschrieben. Anhand dieser Studie konnten die Messmethoden und der Algorithmus zur Einteilung der Proben in die zwei Gruppen erläutert werden.

Die Abhängigkeit von der Herstellerfirma zeigt sich hier in der Tatsache, dass uns die Kenntnis über die eingesetzten Testverfahren mit deutlicher Verzögerung zuteilwurde.

¹⁹ Siehe Kapitel 1.7.4.6

Zuvor wurden wir über die Ergebnisse der Validierungsstudie nur mündlich und über eine Werbe-PowerPoint-Präsentation der Firma unterrichtet, deren Inhalt später von ©Predemtec AG verworfen und durch die Daten der oben beschriebenen Validierungsstudie ersetzt wurden.

Trotz des nach der Publikation der Validierungsstudie vorhandenen Wissens über die Sensitivität, die Inter- und Intraassay-Variabilität der ELISAs und die Beschreibung des angewendeten Algorithmus ist es eine große Limitation dieser Arbeit, dass die Tests nicht selbst durchgeführt wurden. Dadurch besteht besagte Abhängigkeit von der Herstellerfirma und eine begrenzte Beurteilbarkeit der Testergebnisse. Ob sich ein anderer Algorithmus bzw. andere Testverfahren besser geeignet hätten, lässt sich anhand vorliegender Arbeit folglich nicht beurteilen.

Nach Abschluss der Probensammlung wurden von der Herstellerfirma Ausschlusskriterien genannt. Zu diesen Kriterien gehörten unter anderem Nieren- und Leberfunktionseinschränkungen sowie Tumorerkrankungen. Zusätzlich definierte ©Predemtec AG nach der Messung der Biomarkerwerte in den Seren noch einige "Grenzfälle", bei denen die Ergebnisse der Biomarker-Testung nicht eindeutig gewesen seien. Weder über die Rationale hinter den Ausschlusskriterien noch über den Hergang der Zuordnung zu der Gruppe "Grenzfälle" wurden wir in Kenntnis gesetzt. Bei der relativ kleinen Stichprobengröße kann der Ausschluss von nur wenigen Patienten einen gravierenden Einfluss auf das Ergebnis haben. Deshalb schickten wir alle Proben, ungeachtet der Ausschlusskriterien, zur Biomarker-Testung und beachteten in der statistischen Auswertung die Grenzfälle und die Patienten mit Ausschlusskriterien nur teilweise, indem für die so veränderte Studienpopulation Kreuztabellen erstellt, Sensitivität, Spezifität und mithilfe des Chi²-Tests der p-Wert berechnet wurden. Alle weiteren Statistischen Tests wurden mit der ursprünglichen Studienpopulation durchgeführt. Erwähnenswert ist, dass auch mit Ausschluss der Grenzfälle und der Patienten mit Ausschlusskriterien kein signifikantes Ergebnis zu erreichen war.

Zusammengefasst ist der Einfluss der Herstellerfirma ©Predemtec AG auf die durchgeführte Studie eine bedeutsame Limitation dieser Arbeit. Trotz dieser Limitation und den Ergebnissen der Herstellerstudien generiert die vorliegende Arbeit eine wichtige Erkenntnis: Der Test liefert nicht das gewünschte Ergebnis. Eine verblindete Testung kann MCI-AD von MCI-nonAD nicht unterscheiden. Zwar konnte der Algorithmus MCI-AD-Patienten mit einer Treffergenauigkeit von 86% erkennen, allerdings wusste die Firma da schon um die CSF-basierte Diagnose Bescheid.²⁰ Das ist im klinischen Alltag nicht möglich. Der Test soll als leicht zugängliches Diagnostikum auch in der Allgemeinarztpraxis durchzuführen sein – eine weitere Diagnostik inklusive einer LP würde sich anschließen, aber sicher nicht vor dem Test geschehen.

Eine weitere Limitation dieser Arbeit ist die kleine Stichprobe. Mit einer kleinen Studienpopulation wie in vorliegender Arbeit muss der Unterschied zwischen den Gruppen sehr groß sein, um ein signifikantes Ergebnis zu erzielen. Es ist nicht auszuschließen, dass eine größere Stichprobe ein signifikantes Ergebnis erbracht hätte. Ursächlich für die kleine

²⁰ Siehe Kapitel 4

Stichprobe sind eine versäumte Fallzahlplanung sowie zeitökonomische Gründe, die eine Begrenzung notwendig machten. Wie im Kapitel „Methoden“²¹ beschrieben, zeigten nur wenige der Probanden normale Amyloid-Marker im Liquor, sodass die Rekrutierung weiterer MCI-nonAD Patienten einen sehr großen zeitlichen Aufwand bedeutet hätte. Natürlich wäre es außerdem wissenschaftlich korrekter gewesen, nicht nur normale Amyloid-Marker, sondern auch normale Tau-Marker für eine Einordnung in die nonAD-Gruppe zu fordern (und sowohl erniedrigte Amyloid- als auch erhöhte p- und t-Tau-Werte für die Einordnung in die Gruppe der MCI-AD-Patienten). Während der Rekrutierung der ersten 30 Patienten zeigte sich allerdings, dass normale Amyloid- und normale Tau-Werte nur bei einem Bruchteil der Patienten mit MCI zu finden waren, sodass wir uns dazu entschieden, die Tau-Werte unbeachtet zu lassen. Wie oben beschrieben, war die Rekrutierung einer ausreichend großen Kontrollgruppe trotzdem nicht in einer Zeit von über zwei Jahren machbar, sodass die Studienpopulation schließlich aus nur 20 MCI-nonAD und 32 MCI-AD Patienten bestand.

Erwähnt werden muss hinsichtlich der Studienpopulation auch, dass nicht alle eingeschlossenen Probanden das Einschlusskriterium „CDR 0,5“ erfüllten. Wie die oben dargestellte Tabelle²² zeigt, gab es bei der Gruppe der AD negativen Patienten 10% mit einer CDR von 1 und 5%, das heißt, einen Patienten, mit einer CDR von 0 (siehe Tabelle 23). Auch hier wurde sich aus zeitökonomischen Gründen dazu entschieden, die Patienten mit der eigentlich nicht passenden CDR trotzdem in die Studie miteinzuschließen. Die Patienten mit CDR=1 können nicht als „leicht kognitiv gestört“, sondern müssen als „leicht dement“ eingestuft werden. Es bestehen also schon weiter fortgeschrittene kognitive Beeinträchtigungen und so eventuell auch eine fortgeschrittene Neurodegeneration. Wie bereits angemerkt, ist es möglich, dass der Test vor allem die Neurodegeneration widerspiegelt und nicht die Alzheimerpathologie, sodass die Patienten mit CDR=1 das Ergebnis beeinflussen könnten. Allerdings hätten die von den Einschlusskriterien abweichenden CDR-Werte in der MCI-nonAD-Gruppe das Testergebnis nicht stören sollen, wenn der Test tatsächlich die Alzheimer-Pathologie messen würde, denn diese Patienten wären dann in jedem Falle AD-negativ gewesen.

Bezüglich der MCI-nonAD-Gruppe ist anzumerken, dass die Patienten in dieser Gruppe nicht weiter diagnostisch abgeklärt wurden. Zwar konnte mithilfe der Lumbalpunktion eine Alzheimer-Krankheit weitgehend ausgeschlossen werden, es wurde aber nicht untersucht, welche Erkrankung sich anstatt dessen hinter den Symptomen der Patienten verbirgt und ob diese möglicherweise einen Einfluss auf die gemessenen Biomarker hat.

Eine weitere Limitation dieser Arbeit ist das multiple Testen. Im Kapitel „Methoden“²³ wurden mehrere Alternativhypothesen formuliert. Die primäre Hypothese musste verworfen werden, denn die beiden Gruppen unterschieden sich in Bezug auf die sechs Biomarker nicht. Die weiteren getesteten Hypothesen zeigten aber zumindest teilweise signifikante Ergebnisse. Allerdings kann das hier angewandte multiple Testen an derselben Stichprobe zufällige Signifikanzen erbringen und es wurde keine Korrektur für multiple Vergleiche vorgenommen.

²¹ Siehe Kapitel 2.2

²² Siehe Kapitel 3

²³ Siehe Kapitel 2

Anzumerken ist schließlich, dass die Güte des Biomarkertests auf Basis der Amyloid-Marker im Liquor beurteilt wurde. Auch die Messung der Alzheimer-Marker $A\beta(1-42)$ und $A\beta(1-42)/A\beta(1-40)$ ist keine Methode mit hundertprozentiger Sensitivität und Spezifität. Um das Biomarker Panel sicher bewerten zu können, wäre ein Vergleich mit der neuropathologischen Diagnostik im Sinne einer Obduktion oder Biopsie notwendig gewesen. Der so evaluierte Test kann also nur maximal so gut sein, wie der Test, mit dem er verglichen wird – der jedoch selbst nicht perfekt ist.

5.6 Bedeutung der Studie

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen trotz der oben genannten Limitationen einige Schlussfolgerungen zu.

Primär konnte gezeigt werden, dass der von ©Predemtec AG entworfene Biomarkertest keine signifikante Trennung von MCI-AD und MCI-nonAD ermöglicht. In der Validierungsstudie von ©Predemtec AG konnten jedoch gesunde Kontrollen von Patienten mit mittelschwerer AD-Demenz getrennt werden. Möglich ist es demzufolge, dass der Test sich nicht als Frühdiagnostikum eignet, aber in späteren Stadien eine Diagnose der Alzheimer-Krankheit erlaubt. Mögliche Therapieoptionen der Alzheimer-Krankheit können jedoch nur die Progredienz stoppen bzw. verlangsamen, sodass ein früher Therapiebeginn und somit eine frühe Diagnose wichtig ist. Ein Test, der die Krankheit erst erkennt, wenn ein selbstständiges Leben nicht mehr möglich ist, wäre folglich nicht relevant für die Diagnostik.

Die Tatsache, dass der Test Alzheimer-Patienten in späten Stadien erkennen zu scheint und die von uns gefundenen Korrelationen einzelner Marker mit dem $A\beta42/A\beta40$ -Quotienten könnten jedoch bedeuten, dass die Biomarker sich doch für die Diagnose der Alzheimer-Krankheit eignen, aber der gewählte Algorithmus oder die Kombination der Biomarker nicht optimal für diesen Zweck ist. Wie bereits im Kapitel „Limitationen“ erwähnt, könnte das nicht signifikante Ergebnis auch an der kleinen Stichprobe unserer Studie liegen. Um abschließend beurteilen zu können, ob sich einzelne oder sogar alle der getesteten Biomarker zur Frühdiagnose der Alzheimer-Krankheit eignen, müssten weitere Kombinationen, andere Algorithmen und größere Studienpopulationen verwendet werden. Momentan kann man dem Biomarkerpanel noch keine Bedeutung für die Diagnostik zuschreiben.

Eine wichtige Botschaft vorliegender Studie ist das Verwenden einheitlicher Studienprotokolle. Bisherige und oben dargestellte Studien zu den Biomarkern lieferten sehr heterogene Ergebnisse, was teilweise daran liegt, dass unterschiedliche Studienprotokolle verwendet wurden und nicht immer Serum, sondern in manchen Studien Vollblut verwendet wurde. Dies macht die Studienergebnisse schwer vergleichbar. In Zukunft sollten Studien zu möglichen Biomarkern anhand der Guideline der „International collaboration of the blood-based biomarker professional interest area (BBB-PIA)“ und der von dieser veröffentlichten SOP (siehe Abbildung 12) durchgeführt werden (O’Bryant et al., 2015). Wie von O’Bryant et al. (2015) dargelegt, ist es für die Reproduzierbarkeit von Studienergebnissen unerlässlich, standardisierte und optimierte Arbeitsschritte anzuwenden.

Ein weiterer Grund für die widersprüchlichen Ergebnisse der Studien könnte darin liegen, dass die genannten Studien ihre Stichprobe nicht auf Individuen mit leichter kognitiver Störung beschränkten, sondern vor allem auch Patienten mit schon voll ausgeprägter Demenz untersucht haben – so wie ©Predemtec AG in der Validierungsstudie. So ist es denkbar, dass einige Biomarker erst in späteren Stadien Veränderungen zeigen und andere nur in frühen Stadien.

Da es im Hinblick auf laufende Medikamentenstudien zur Therapie der Alzheimer-Krankheit aber relevant ist, diejenigen Patienten mit leichter kognitiver Störung zu erkennen, die eine beginnende Alzheimer-Krankheit haben, und diese suffizient von denen zu unterscheiden, die sich zwar mit einer leichten kognitiven Störung vorstellen, aber keine Alzheimer-Krankheit haben, sollte man die Biomarker nicht nur im Vergleich zu gesunden Kontrollen testen, sondern insbesondere dem Unterschied im Spiegel der Marker zwischen MCI-AD und MCI-nonAD Beachtung zu schenken. Dies gilt nicht nur für die in den genannten Studien untersuchten Biomarker, sondern für alle potenziellen Biomarker zur Frühdiagnose der Alzheimer-Krankheit.

In vorliegende Studie wurden ausschließlich Patienten mit leichter kognitiver Störung einbezogen. Ziel war die Beurteilung eines Biomarker-Panels in Hinblick auf dessen Fähigkeit, eine leichte kognitive Störung aufgrund einer beginnenden Alzheimer-Pathologie von einer leichten kognitiven Störung aufgrund einer anderen Ursache unterscheiden zu können.

Zusammenfassend kann man die Bedeutung der Studie wie folgt beschreiben: Eine Frühdiagnose scheint durch das verwendete Biomarkerpanel nicht möglich zu sein, allerdings sind für eine abschließende Beurteilung weitere Studien notwendig, da eine Erkennung der Alzheimer-Krankheit durch das verwendete Panel in späteren Stadien gezeigt werden konnte. Verdeutlicht wurde in dieser Studie außerdem die Bedeutung von einheitlichen Studienprotokollen und die Testung möglicher Biomarker in frühen Stadien der Erkrankung, um die Eignung als Frühdiagnostikum beurteilen zu können. Auch wenn der Test momentan noch keine Anwendung im klinischen Alltag finden wird, so sind die Erkenntnisse aus vorliegender Arbeit dennoch relevant für die weitere Forschung an einem blutbasierten Biomarkertest zur Früherkennung der Alzheimer-Krankheit.

6 Zusammenfassung

In vorliegender Studie wurde geprüft, ob sich das Panel der sechs Biomarker BDNF, IGF-1, VEGF, TGF- β , MCP-1 und IL-18 zur Frühdiagnose der Alzheimer-Krankheit im Stadium der leichten kognitiven Störung (MCI) eignet.

Die Konzentration dieser Biomarker wurde im Serum von 32 Probanden mit leichter kognitiver Störung und zugrundeliegender Alzheimer-Krankheit (MCI-AD) und 20 Probanden mit leichter kognitiver Störung ohne zugrundeliegende Alzheimer-Krankheit (MCI-NonAD) bestimmt.

Alle Patienten wurden neuropsychologisch untersucht und lumbal punktiert. Das Ergebnis der Lumbalpunktion bildete die Grundlage für die Einordnung der Probanden in die zwei Gruppen.

Eine reduzierte Konzentration des A β 1-42 oder ein kleiner A β 1-42/A β 1-40-Quotient führte dabei zur Zuordnung zur MCI-AD-Gruppe.

Das Serum der Probanden wurde standardisiert gesammelt, verarbeitet und anschließend eingefroren.

Die Konzentration der Biomarker im Blut wurde von der Firma ©Predemtec AG bestimmt.

In der statistischen Auswertung zeigte sich unter Einschluss aller untersuchten Probanden eine Sensitivität von 78,13% und eine Spezifität von nur 25%, unter Ausschluss der Grenzfälle und der Probanden mit Ausschlusskriterien eine Sensitivität von 75,86% und eine Spezifität von 29,41%. Der p-Wert des Panels ergab 0,795 (bei Einbezug aller untersuchten Seren).

Anhand dieses Ergebnisses lässt sich schlussfolgern, dass das Panel der Serum-Biomarker keine signifikante Unterscheidung von Patienten mit leichter kognitiver Störung und zugrundeliegender Alzheimer-Krankheit und solchen ohne zugrundeliegender Alzheimer-Krankheit zulässt.

7 Beobachtungsgrundlagen/Persönlicher Beitrag

Diese Arbeit wurde von der Autorin Stella Rubow (SR) unter Aufsicht von Prof. Dr. Timo Grimmer (TG) verfasst.

Die neurokognitive Testung mit Erhebung des MMST und der CDR wurde durch die Ärzte des Zentrums für kognitive Störungen der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Dr. Oliver Goldhardt, Dr. Felix Müller-Sarnovski, Dr. Marion Ortner sowie Prof. Dr. Timo Grimmer (TG), durchgeführt. Die Patienten wurden durch die genannten Ärzte mit Assistenz durch SR lumbalpunktiert. Die anschließende Blutabnahme, die Verarbeitung der Proben sowie die Aufbewahrung und Verschickung der Seren erfolgte durch SR. Die Interpretation der Lumbalpunktions-Ergebnisse und die Einordnung der Patienten in die zwei Gruppen erfolgte ebenfalls durch SR.

Die Bestimmung der Biomarker BDNF, VEGF, IGF-1, MCP-1, TGF- β und IL-18 führte die Firma ©Predemtec AG in Berlin durch. Die Seren wurden verblindet getestet und die Ergebnisse an SR und TG weitergegeben. Die statistische Auswertung erfolgte durch TG und SR. Schließlich wurden die Ergebnisse durch SR interpretiert.

8 Literaturverzeichnis

- Åberg, M. A. I., Åberg, N. D., Hedbäcker, H., Oscarsson, J., & Eriksson, P. S. (2000). Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 20(8), 2896–2903.
- Acheson, A., Conover, J. C., Fandl, J. P., DeChiara, T. M., Russell, M., Thadani, A., Squinto, S. P., Yancopoulos, G. D., & Lindsay, R. M. (1995). A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature*, 374(6521), 450–453.
- Albert, M. S., DeKosky, S. T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H. H., Fox, N. C., Gamst, A., Holtzman, D. M., Jagust, W. J., Petersen, R. C., Snyder, P. J., Carrillo, M. C., Thies, B. & Phelps, C. H. (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. *Alzheimer's & Dementia*, 7(3), 270–279.
- Alzheimer's Association. (2012). 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 8(2), 131–168.
- Alzheimer's Association. (2019). 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 15(3), 321–387.
- Alzheimer's Disease International. (2019). *Alzheimer's Disease International. 2019. World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia. London: Alzheimer's Disease International.*
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (5th ed.).
- Andreasen, N., Hesse, C., Davidsson, P., Minthon, L., Wallin, A., Winblad, B., Vanderstichele, H., Vanmechelen, E., & Blennow, K. (1999). Cerebrospinal fluid β -amyloid((1-42)) in Alzheimer disease: Differences between early- and late-onset Alzheimer disease and stability during the course of disease. *Archives of Neurology*, 56(6), 673–680.
- Angelucci, F., Spalletta, G., Iulio, F. d, Ciaramella, A., Salani, F., Varsi, A. E., Gianni, W., Sancesario, G., Caltagirone, C., & Bossu, P. (2010). Alzheimer's disease (AD) and Mild Cognitive Impairment (MCI) patients are characterized by increased BDNF serum levels. *Current Alzheimer Research*, 7(1), 15–20.
- Bäckman, L., Small, B. J., & Fratiglioni, L. (2001). Stability of the preclinical episodic memory deficit in Alzheimer's disease. *Brain*, 124(1), 96–102.
- Barth, S., Schönknecht, P., Pantel, J., & Schröder, J. (2005). Neuropsychologische Profile in der Demenzdiagnostik: eine Untersuchung mit der CERAD-NP-Testbatterie. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 73(10), 568–576.
- Bettcher, B. M., Fitch, R., Wynn, M. J., Lalli, M. A., Elofson, J., Jastrzab, L., Mitic, L., Miller, Z. A., Rabinovici, G. D., Miller, B. L., Kao, A. W., Kosik, K. S. & Kramer, J. H. (2016). MCP-1 and eotaxin-1 selectively and negatively associate with memory in MCI and Alzheimer's disease dementia phenotypes. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, 3, 91–97.
- Blennow, K. (2004). Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx*, 1(2), 213–225.
- Blennow, K., & Hampel, H. (2003). CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 2(10), 605–613.
- Bowen, R. A. R., Hortin, G. L., Csako, G., Otañez, O. H., & Remaley, A. T. (2010). Impact of blood collection devices on clinical chemistry assays. *Clinical Biochemistry*, 43(1–2), 4–

25.

- Buckingham, S. D. (2003). *Proteases, amyloid precursor protein and Alzheimer's disease*. Nature Publishing Group. Retrieved February 15, 2018, from https://www.nature.com/horizon/proteases/background/figs/ripping_f3.html
- Burton, T., Liang, B., Dibrov, A., & Amara, F. (2002). Transforming growth factor- β -induced transcription of the Alzheimer β -amyloid precursor protein gene involves interaction between the CTCF-complex and Smads. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295(3), 713–723.
- Cai, Z., Hussain, M. D., & Yan, L.-J. (2014). Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *International Journal of Neuroscience*, 124(5), 307–321.
- Cao, B. B., Zhang, X. X., Du, C. Y., Liu, Z., Qiu, Y. H., & Peng, Y. P. (2020). TGF- β 1 Provides Neuroprotection via Inhibition of Microglial Activation in 3-Acetylpyridine-Induced Cerebellar Ataxia Model Rats. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 187.
- Carro, E., & Torres-Aleman, I. (2006). Serum insulin-like growth factor I in brain function. *The Keio Journal of Medicine*, 55(2), 59–63.
- Chan, Y. (2003). Biostatistics 104: Correlational Analysis. *Singapore Med J*, 44 (12), 614-619.
- Chao, C. C., Hu, S., Frey, W. H., Ala, T. A., Tourtellotte, W. W., & Peterson, P. K. (1994). Transforming growth factor beta in Alzheimer's disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1(1), 109–110.
- Chen, J.-M., Jiang, G.-X., Li, Q.-W., Zhou, Z.-M., & Cheng, Q. (2014). Increased serum levels of interleukin-18, -23 and -17 in chinese patients with Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 38(5–6), 321–329.
- Cheng, C. M., Mervis, R. F., Niu, S.-L., Salem Jr, N., Witters, L. A., Tseng, V., Reinhardt, R., & Bondy, C. A. (2003). Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth. *Journal of Neuroscience Research*, 73(1), 1–9.
- Cheng, L., Doecke, J. D., Sharples, R. A., Villemagne, V. L., Fowler, C. J., Rembach, A., Martins, R. N., Rowe, C. C., Macaulay, S. L., Masters, C. L. & Hill A. F. (2015). Prognostic serum miRNA biomarkers associated with Alzheimer's disease shows concordance with neuropsychological and neuroimaging assessment. *Molecular Psychiatry*, 20(10), 1188–1196.
- Chouraki, V., Beiser, A., Younkin, L., Preis, S. R., Weinstein, G., Hansson, O., Skoog, I., Lambert, J. C., Au, R., Launer, L., Wolf, P. A., Younkin, S., & Seshadri, S. (2015). Plasma amyloid- β and risk of Alzheimer's disease in the Framingham Heart Study. *Alzheimer's and Dementia*, 11(3), 249-257.e1.
- Chung, H. Y., Lee, E. K., Choi, Y. J., Kim, J. M., Kim, D. H., Zou, Y., Kim, C. H., Lee, J., Kim, H. S., Kim, N. D., Kim, J. H., Jung, J. H. & Yu, B.P. (2011). Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases. *Journal of Dental Research*, 90(7), 830–840.
- Cohen, J. (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (2nd ed.). Hillsdale, NJ: Erlbaum.
- Combarros, O., Infante, J., Llorca, J., & Berciano, J. (2004). No evidence for association of the monocyte chemoattractant protein-1 (- 2518) gene polymorphism and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 360(1–2), 25–28.
- Creavin, S. T., Wisniewski, S., Noel-Storr, A. H., Trevelyan, C. M., Hampton, T., Rayment, D., Thom, V. M., Nash, K. J. E., Elhamoui, H., Milligan, R., Patel, A. S., Tsivos, D. V., Wing, T., Phillips, E., Kellman, S. M., Shackleton, H. L., Singleton, G. F., Neale, B. E., Watton, M. E. & Cullum, S. (2016). Mini-Mental State Examination (MMSE) for the detection of dementia in clinically unevaluated people aged 65 and over in community and primary

- care populations. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1.
- Cunningham, E. L., McGuinness, B., Herron, B., & Passmore, A. P. (2015). Dementia. *Ulster Med J.*
- DeFelipe, J. (2016). Phospho-Tau and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. Commentary: Tau in physiology and pathology. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10, 44.
- Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN) Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN). (2016). *S3-Leitlinie "Demenzen" (Langversion – Januar 2016)*.
- Deutzmann, R., Netzker, R., Rassow, J., & Hauser, K. (2012). *Duale Reihe Biochemie* (1. Auflage). Georg Thieme Verlag.
- Dinarello, C. A. (1999). IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(1), 11–24.
- Du, Y., Wu, H.-T., Qin, X.-Y., Cao, C., Liu, Y., Cao, Z.-Z., & Cheng, Y. (2018). Postmortem brain, cerebrospinal fluid, and blood neurotrophic factor levels in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Molecular Neuroscience*, 65(3), 289–300.
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Cummings, J. L., DeKosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Delacourte, A., Frisoni, G., Fox, N. C., Galasko, D., Gauthier, S., Hampel, H., Jicha, G. A., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Sarazin, M., de Souza, L. C., Stern, Y., Visser, P. J. & Scheltens, P. (2010). Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *The Lancet Neurology*, 9(11), 1118–1127.
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., DeKosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, Stern, Y., Visser, P. J. & Scheltens, P. (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *The Lancet Neurology*, 6(8), 734–746.
- Dunger, D. B., Ong, K. K. L., & Sandhu, M. S. (2003). Serum insulin-like growth factor-I levels and potential risk of type 2 diabetes. *Hormone Research in Paediatrics*, 60(Suppl. 3), 131–135.
- Elliott, R. L., & Blobe, G. C. (2005). Role of transforming growth factor beta in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23(9), 2078–2093.
- Fenoglio, C., Galimberti, D., Lovati, C., Guidi, I., Gatti, A., Fogliarino, S., Tiriticco, M., Mariani, C., Forloni, G., Pettenati, C., Baron, P., Conti, G., Bresolin, N. & Scarpini, E. (2004). MCP-1 in Alzheimer's disease patients: A-2518G polymorphism and serum levels. *Neurobiology of Aging*, 25(9), 1169–1173.
- Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F. A., & Pillai, R. S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(3), 331–341.
- Folstein, M. F., Folstein, S. E., & McHugh, P. R. (1975). "Mini-mental state": a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*, 12(3), 189–198.
- Freude, S., Schilbach, K., & Schubert, M. (2009). The role of IGF-1 receptor and insulin receptor signaling for the pathogenesis of Alzheimer's disease: from model organisms to human disease. *Current Alzheimer Research*, 6(3), 213–223.
- Galimberti, D., Fenoglio, C., Lovati, C., Venturelli, E., Guidi, I., Corrà, B., Scalabrini, D., Clerici, F., Mariani, C., Bresolin, N., & Scarpini, E. (2006). Serum MCP-1 levels are increased in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 27(12), 1763–1768.
- Gendelman, H. E. (2002). Neural immunity: Friend or foe? *Journal of Neurovirology*, 8(6),

474–479.

- Gezen-Ak, D., Dursun, E., Hanağasi, H., Bilgiç, B., Lohman, E., Araz, Ö. S., Atasoy, I. L., Alaylioğlu, M., Önal, B., Gürvit, H., & Yilmazer, S. (2013). BDNF, TNF α , HSP90, CFH, and IL-10 serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease or mild cognitive impairment. *Journal of Alzheimer's Disease*, 37(1), 185–195.
- Ghareeb, D. A., Mohamed, S., & El-Sayed, M. (2013). *The interrelationship between insulin resistane and Alzheimer development*.
- Giunta, S., Galeazzi, L., & Franceschi, C. (1998). Apo E genotyping in Alzheimer disease (AD): Multidimensional counseling by the geriatric assessment unit (GAU) to properly address scientific and bioethical issues emerging from molecular gerontology to geriatric practice. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 27(1), 49–56.
- Goetzl, E. J., Boxer, A., Schwartz, J. B., Abner, E. L., Petersen, R. C., Miller, B. L., & Kapogiannis, D. (2015). Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease. *Neurology*, 85(1), 40–47.
- Goldhardt, O., Warnhoff, I., Yakushev, I., Begcevic, I., Förstl, H., Magdolen, V., Soosaipillai, A., Diamandis, E., Alexopoulos, P., & Grimmer, T. (2019). Kallikrein-related peptidases 6 and 10 are elevated in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and associated with CSF-TAU and FDG-PET. *Translational Neurodegeneration*, 8(1), 1–13.
- He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 522–531.
- Hebert, L. E., Scherr, P. A., Bienias, J. L., Bennett, D. A., & Evans, D. A. (2003). Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Archives of Neurology*, 60(8), 1119–1122.
- Hemphill, J. F. (2003). Interpreting the Magnitudes of Correlation Coefficients. *American Psychologist*, 58(1), 78–79.
- Heneka, M. T., O'Banion, M. K., Terwel, D., & Kummer, M. P. (2010). Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 117(8), 919–947.
- Heppner, F. L., Ransohoff, R. M., & Becher, B. (2015). Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(6), 358–372.
- Herukka, S. K., Hallikainen, M., Soininen, H., & Pirttilä, T. (2005). CSF A β 42 and tau or phosphorylated tau and prediction of progressive mild cognitive impairment. *Neurology*, 64(7), 1294–1297.
- Hu, Y., Chen, W., Wu, L., Jiang, L., Liang, N., Tan, L., Liang, M., & Tang, N. (2018). TGF- β 1 Restores Hippocampal Synaptic Plasticity and Memory in Alzheimer Model via the PI3K/Akt/Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Journal of Molecular Neuroscience*, 67(1), 142–149.
- Huang, L., Jia, J., & Liu, R. (2013). Decreased serum levels of the angiogenic factors VEGF and TGF- β 1 in Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Neuroscience Letters*, 550, 60–63.
- Hulstaert, F., Blennow, K., Ivanoiu, A., Schoonderwaldt, H. C., Riemenschneider, M., De Deyn, P. P., Bancher, C., Cras, P., Wiltfang, J., Mehta, P. D., Iqbal, K., Pottel, H., Vanmechelen, E., & Vanderstichele, H. (1999). Improved discrimination of AD patients using β -amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology*, 52(8), 1555–1562.
- Iglseder, B. (2014). Sekundäre Demenzen. *Psychopraxis. Neuropraxis*, 17(1), 20–25.
- Ioannidis, J. P. A. (2005). Why most published research findings are false. *PLoS Medicine*, 2(8), e124.
- Jack Jr, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., Holtzman, D. M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J. L., Montine,

- T., Phelps, C., Rankin, K. P., Rowe, C. C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder H. M. & Sperling, R. (2018). NIA-AA research framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 14(4), 535–562.
- Jessen, K. R. (2004). Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(10), 1861–1867.
- Jessen, N. A., Munk, A. S. F., Lundgaard, I., & Nedergaard, M. (2015). The glymphatic system: a beginner's guide. *Neurochemical Research*, 40(12), 2583–2599.
- Joshi, S., & Morley, J. E. (2006). Cognitive impairment. *Medical Clinics*, 90(5), 769–787.
- Jung, J., Kim, S., Yoon, K., Moon, Y., Roh, D., Lee, S., Choi, K., Jung, J., & Kim, D. (2015). The effect of depression on serum VEGF level in Alzheimer's disease. *Disease Markers*, 2015.
- Kalaria, R. N., Maestre, G. E., Arizaga, R., Friedland, R. P., Galasko, D., Hall, K., Luchsinger, J. A., Ogunniyi, A., Perry, E. K., Potocnik, F., Prince, M., Stewart, R., Wimo, A., Zhang, Z.-X. & Antuono, P. (2008). Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *The Lancet Neurology*, 7(9), 812–826.
- Karrasch, M., Sinervä, E., Grönholm, P., Rinne, J., & Laine, M. (2005). CERAD test performances in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, 111(3), 172–179.
- Khemka, V. K., Ganguly, A., Bagchi, D., Ghosh, A., Bir, A., Biswas, A., Chattopadhyay, S., & Chakrabarti, S. (2014). Raised serum proinflammatory cytokines in Alzheimer's disease with depression. *Aging and Disease*, 5(3), 170.
- Kim, B., Elzinga, S. E., Henn, R. E., McGinley, L. M., & Feldman, E. L. (2019). The effects of insulin and insulin-like growth factor I on amyloid precursor protein phosphorylation in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 132, 104541.
- Kim, S., Song, J., Han, C., Kim, S., Park, M., Koh, Y., Jo, S. A. & Kim, Y.-Y. (2011). Identification of peripheral inflammatory markers between normal control and Alzheimer's disease. *BMC Neurology*, 11(51), 51.
- Kim, Y. N., & Kim, D. H. (2012). Decreased serum angiogenin level in Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 38(2), 116–120.
- Kowall, N. W., Pendlebury, W. W., Kessler, J. B., Perl, D. P. & Beal, M.F. (1989). Aluminum-induced neurofibrillary degeneration affects a subset of neurons in rabbit cerebral cortex, basal forebrain and upper brainstem. *Neuroscience*, 29(2), 329–337.
- Krämer, G., & Förstl, H. (2008). *Alzheimer und andere Demenzformen: Antworten auf die häufigsten Fragen* (5. Auflage). Georg Thieme Verlag.
- Kramer, J. H., Jurik, J., Sharon, J. S., Rankin, K. P., Rosen, H. J., Johnson, J. K., & Miller, B. L. (2003). Distinctive neuropsychological patterns in frontotemporal dementia, semantic dementia, and Alzheimer disease. *Cognitive and Behavioral Neurology*, 16(4), 211–218.
- Kushkuley, J., Metkar, S., Chan, W. K. H., Lee, S., & Shea, T. B. (2010). Aluminum induces neurofilament aggregation by stabilizing cross-bridging of phosphorylated c-terminal sidearms. *Brain Research*, 1322, 118–123.
- Lanoiselée, H. M., Nicolas, G., Wallon, D., Rovelet-Lecrux, A., Lacour, M., Rousseau, S., Richard, A. C., Pasquier, F., Rollin-Sillaire, A., Martinaud, O., Quillard-Muraine, M., de la Sayette, V., Boutoleau-Bretonniere, C., Etcharry-Bouyx, F., Chauviré, V., Sarazin, M., le Ber, I., Epelbaum, S., Jonveaux, T., Rouaud, O., Ceccaldi, M., Félician, O., Godefroy, O., Formaglio, M., Croisile, B., Auriacombe, S., Chamard, L., Vincent, J.-L., Sauvée, M., Marelli-Tosi, C., Gabelle, A., Ozsancak, C., Pariente, J., Paquet, C., Hannequin, D. &

- Campion, D. (2017). APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Medicine*, *14*(3), e1002270.
- Lautenschlager, N. T., & Förstl, H. (2003). Primäre und sekundäre Demenzen. In *Morbus Parkinson* (3. Auflage). Springer Verlag.
- Lee, S. W., Haditsch, U., Cord, B. J., Guzman, R., Kim, S. J., Boettcher, C., Priller, J., Ormerod, B. K., & Palmer, T. D. (2013). Absence of CCL2 is sufficient to restore hippocampal neurogenesis following cranial irradiation. *Brain, Behavior, and Immunity*, *30*, 33–44.
- Lee, W.-J., Liao, Y.-C., Wang, Y.-F., Lin, I.-F., Wang, S.-J., & Fuh, J.-L. (2018). Plasma MCP-1 and cognitive decline in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a two-year follow-up study. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–8.
- Lista, S., Faltraco, F., & Hampel, H. (2013). Biological and methodical challenges of blood-based proteomics in the field of neurological research. *Progress in Neurobiology*, *101*, 18–34.
- Liu, C., Cui, G., Zhu, M., Kang, X., & Guo, H. (2014). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *7*(12), 8342.
- Lopez-Anton, R., Santabàrbara, J., De-la-Cámara, C., Gracia-García, P., Lobo, E., Marcos, G., Pirez, G., Saz, P., Haro, J. M., Rodríguez-Mañas, L., Modrego, P. J., Dewey, M. E., & Lobo, A. (2015). Mild cognitive impairment diagnosed with the new DSM-5 criteria: Prevalence and associations with non-cognitive psychopathology. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, *131*(1), 29–39.
- Lu, B., Nagappan, G., Guan, X., Nathan, P. J., & Wren, P. (2013). BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(6), 401–416.
- Mahoney, E. R., Dumitrescu, L., Moore, A. M., Cambroner, F. E., De Jager, P. L., Koran, M. E. I., Petyuk, V. A., Robinson, R. A. S., Goyal, S., Schneider, J. A., Bennett, D. A., Jefferson, A. L. & Hohman, T. J. (2019). Brain expression of the vascular endothelial growth factor gene family in cognitive aging and Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, 1–9.
- Masuhr, K., Masuhr, F., & Neumann, M. (2013). *Duale Reihe Neurologie* (7. Auflage). Georg Thieme Verlag.
- Mateo, I., Llorca, J., Infante, J., Rodríguez-Rodríguez, E., Fernández-Viadero, C., Peña, N., Berciano, J., & Combarros, O. (2007). Low serum VEGF levels are associated with Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, *116*(1), 56–58.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., & Stadlan, E. M. (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.
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack Jr, C. R., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J.C., Rossor, M. N., Scheltens, P., Carrillo, M.C, Thies, B., Weintraub, S. & Phelps, C. H. (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. *Alzheimer's & Dementia*, *7*(3), 263–269.
- Memory Clinic Uni Basel. (2015). *Die Neuropsychologische Testbatterie CERAD-Plus*. Retrieved November 15, 2018, from <http://www.memoryclinic.ch/content/view/37/47/>
- Mirza, A., King, A., Troakes, C., & Exley, C. (2017). Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *40*, 30–36.

- Mitchell, A. J. (2009). A meta-analysis of the accuracy of the mini-mental state examination in the detection of dementia and mild cognitive impairment. *Journal of Psychiatric Research*, 43(January 2009), 411–431.
- Mocali, A., Cedrola, S., Della Malva, N., Bontempelli, M., Mitidieri, V. A. M., Bavazzano, A., Comolli, R., Paoletti, F., & La Porta, C. A. M. (2004). Increased plasma levels of soluble CD40, together with the decrease of TGF β 1, as possible differential markers of Alzheimer disease. *Experimental Gerontology*, 39(10), 1555–1561.
- Molano, J., Boeve, B., Ferman, T., Smith, G., Parisi, J., Dickson, D., Knopman, D., Graff-Radford, N., Geda, Y., Lucas, J., Kantarci, K., Shiung, M., Jack, C., Silber, M., Pankratz, V. C. & Peterson, R. (2010). Mild cognitive impairment associated with limbic and neocortical Lewy body disease: a clinicopathological study. *Brain*, 133(2), 540–556.
- Möller, H.-J., Laux, G., & Deister, A. (2015). *Duale Reihe Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie* (6. Auflage). Georg Thieme Verlag.
- Moodley, K. K., & Chan, D. (2014). The hippocampus in neurodegenerative disease. In *The Hippocampus in Clinical Neuroscience* (Vol. 34, pp. 95–108). Karger Publishers.
- Moore, A. M., Mahoney, E., Dumitrescu, L., De Jager, P. L., Koran, M. E. I., Petyuk, V. A., Robinson, R. A., Ruderfer, D. M., Cox, N. J., Schneider, J. A., Bennett, D. A., Jefferson, A. L., & Hohman, T. J. (2020). APOE ϵ 4-specific associations of VEGF gene family expression with cognitive aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 87, 18–25.
- Moore, P. B., Day, J. P., Taylor, G. A., Ferrier, I. N., Fifield, L. K., & Edwardson, J. A. (2000). Absorption of aluminium-26 in Alzheimer's disease, measured using accelerator mass spectrometry. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 11(2), 66–69.
- Morris, John C. (1993). Current vision and scoring rules The Clinical Dementia Rating (CDR). *Neurology*, 43, 2412–2414.
- Morris, John C. (1993). The Clinical Dementia Rating (CDR). *Neurology*, 43(11), 2412--2412-a.
- Murphy, M. P., & LeVine III, H. (2010). Alzheimer's disease and the amyloid- β peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(1), 311–323.
- Nagaraj, S., Laskowska-Kaszub, K., Debski, K. J., Wojsiat, J., Dabrowski, M., Gabryelewicz, T., Kuznicki, J., & Wojda, U. (2017). Profile of 6 microRNA in blood plasma distinguish early stage Alzheimer's disease patients from non-demented subjects. *Oncotarget*, 8(10), 16122–16143.
- Ng, T. K. S., Ho, C. S. H., Tam, W. W. S., Kua, E. H., & Ho, R. C.-M. (2019). Decreased serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in patients with Alzheimer's disease (AD): a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 257.
- Norris, D. R., Clark, M. S., & Shipley, S. (2016). The mental status examination. *American Family Physician*, 94(8), 635–641.
- Nowrangi, M. A., Lyketsos, C. G., & Rosenberg, P. B. (2015). Principles and management of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's dementia. *Alzheimer's Research & Therapy*, 7(1), 12.
- O'Bryant, S. E., Gupta, V., Henriksen, K., Edwards, M., Jeromin, A., Lista, S., Bazenet, C., Soares, H., Lovestone, S., Hampel, H., Montine, T., Blennow., K., Foroud, T., Carrillo, M., Graff-Radford, N., Laske, C., Breteler, M., Shaw, L., Trojanowski, J. Q., Schupf, N., Rissmann, R. A., Fagan, A. M. Oberoi, P., Umek, R., Weiner, M. W., Grammas, P., Posner, H. & Martins, R. (2015). Guidelines for the standardization of preanalytic variables for blood-based biomarker studies in Alzheimer's disease research. *Alzheimer's & Dementia*, 11(5), 549–560.
- O'Bryant, S. E., Lista, S., Rissman, R. A., Edwards, M., Zhang, F., Hall, J., Zetterberg, H.,

- Lovestone, S., Gupta, V., Graff-Radford, N., Martins, R., Jeromin, A., Waring, S., Oh, E., Kling, M., Baker, L. D. & Hampel, H. (2016). Comparing biological markers of Alzheimer's disease across blood fraction and platforms: Comparing apples to oranges. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, 3(1), 27–34.
- O'Bryant, S. E., Mielke, M. M., Rissman, R. A., Lista, S., Vanderstichele, H., Zetterberg, H., Lewczuk, P., Posner, H., Hall, J., Johnson, L., Fong, Y.-L., Luhtman, J., Jeromin, A., Batrla-Utermann, R., Villarreal, A., Britton, G., Snyder, P. J., Henriksen, K., Grammas, P., Gupta, V., Martins, R. & Hampel, H. (2017). Blood-based biomarkers in Alzheimer disease: current state of the science and a novel collaborative paradigm for advancing from discovery to clinic. *Alzheimer's & Dementia*, 13(1), 45–58.
- O'Kusky, J. R., Ye, P., & D'Ercole, A. J. (2000). Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *Journal of Neuroscience*, 20(22), 8435–8442.
- Obulesu, M., & Jhansilakshmi, M. (2014). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: an understanding of physiology and pathology. *International Journal of Neuroscience*, 124(4), 227–235.
- Ojala, J., Alafuzoff, I., Herukka, S.-K., van Groen, T., Tanila, H., & Pirttilä, T. (2009). Expression of interleukin-18 is increased in the brains of Alzheimer's disease patients. *Neurobiology of Aging*, 30(2), 198–209.
- Ostrowski, P. P., Barszczyk, A., Forstenpointner, J., Zheng, W., & Feng, Z.-P. (2016). Meta-analysis of serum insulin-like growth factor 1 in Alzheimer's disease. *PLoS One*, 11(5), e0155733.
- Palmqvist, S., Zetterberg, H., Mattsson, N., Johansson, P., Minthon, L., Blennow, K., Olsson, M. & Hansson, O. (2015). Detailed comparison of amyloid PET and CSF biomarkers for identifying early Alzheimer disease. *Neurology*, 85(14), 1240–1249.
- Pernecky, R., Wagenpfeil, S., Komossa, K., Grimmer, T., Diehl, J., & Kurz, A. (2006). Mapping scores onto stages: mini-mental state examination and clinical dementia rating. *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 14(2), 139–144.
- Petersen, R. C. (2004). Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *Journal of Internal Medicine*, 256(3), 183–194.
- Petersen, R. C., Caracciolo, B., Brayne, C., Gauthier, S., Jelic, V., & Fratiglioni, L. (2014). Mild cognitive impairment: a concept in evolution. *Journal of Internal Medicine*, 275(3), 214–228.
- Plassman, B. L., Havlik, R. J., Steffens, D. C., Helms, M. J., Newman, T. N., Drosdick, D., Phillips, C., Gau, B. A., Welsh-Bohmer, K. A., Burke, J. R., Guralnik, J. M. & Breitner, J.C. (2000). Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology*, 55(8), 1158–1166.
- Porcellini, E., Ianni, M., Carbone, I., Franceschi, M., & Licastro, F. (2013). Monocyte chemoattractant protein-1 promoter polymorphism and plasma levels in Alzheimer's disease. *Immunity & Ageing*, 10(1).
- Rai, A. J., & Vitzthum, F. (2006). Effects of preanalytical variables on peptide and protein measurements in human serum and plasma: implications for clinical proteomics. *Expert Review of Proteomics*, 3(4), 409–426.
- Reisberg, B., Ferris, S. H., de Leon, M. J., Franssen, E. S. E., Kluger, A., Mir, P., Borenstein, J., George, A. E., Shulman, E., Steinberg, G. & Cohen, J. (1988). Stage-specific behavioral, cognitive, and in vivo changes in community residing subjects with age-associated memory impairment and primary degenerative dementia of the Alzheimer type. *Drug Development Research*, 15(2–3), 101–114.

- Reith, W., & Mühl-Benninghaus, R. (2015). Differential diagnostics of dementia type diseases. *Der Radiologe*, *55*(5), 378–385.
- Rentz, C. A. (2003). Creutzfeldt-Jakob disease: two case studies. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*[®], *18*(3), 171–180.
- Ritchie, K., & Lovestone, S. (2002). The dementias. *The Lancet*, *360*(9347), 1759–1766.
- Rodríguez-Rodríguez, E., Sánchez-Juan, P., Mateo, I., Llorca, J., Infante, J., García-Gorostiaga, I., Berciano, J., & Combarros, O. (2007). Serum levels and genetic variation of TGF- β 1 are not associated with Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, *116*(6), 409–412.
- The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group (1998). Consensus report of the working group on: "Molecular and biochemical markers of Alzheimer's disease." *Neurobiology of Aging*, *19*(2), 109–116.
- Rowe, C. C., & Villemagne, V. L. (2013). Amyloid imaging with PET in early Alzheimer disease diagnosis. *Medical Clinics*, *97*(3), 377–398.
- Saenger, S., Goeldner, C., Frey, J. R., Ozmen, L., Ostrowitzki, S., Spooren, W., Ballard, T. M., Prinssen, E., Borroni, E., & Metzger, F. (2011). PEGylation enhances the therapeutic potential for insulin-like growth factor I in central nervous system disorders. *Growth Hormone & IGF Research*, *21*(5), 292–303.
- Samuels, S. C., Silverman, J. M., Marin, D. B., Peskind, E. R., Younki, S. G., Greenberg, D. A., Schnur, E., Santoro, J., & Davis, K. L. (1999). CSF beta-amyloid, cognition, and APOE genotype in Alzheimer's disease. *Neurology*, *52*(3), 547.
- Sandhu, M. S., Heald, A. H., Gibson, J. M., Cruickshank, J. K., Dunger, D. B., & Wareham, N. J. (2002). Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance: a prospective observational study. *The Lancet*, *359*(9319), 1740–1745.
- Satoh, J., Kino, Y., & Niida, S. (2015). MicroRNA-Seq data analysis pipeline to identify blood biomarkers for Alzheimer's disease from public data. *Biomarker Insights*, *10*, BMI--S25132.
- Schipke, C. G., Günter, O., Weinert, C., Scotton, P., Sigle, J.-P., Kallarackal, J., Kabelitz, D., Finzen, A., & Feuerhelm-Heidl, A. (2019). Definition and quantification of six immune- and neuroregulatory serum proteins in healthy and demented elderly. *Neurodegenerative Disease Management*, *9*(4), 193–203.
- Schipke, C. G., Menne, F., Rubow, S., Sigle, J.-P., Peters, O., & Grimmer, T. (2020). Value of a Panel of 6 Serum Biomarkers to Differentiate between Healthy Controls and Mild Cognitive Impairment Due to Alzheimer Disease. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, *Publish Ahead Of Print*. Retrieved September 20, 2020, from <https://doi.org/10.1097/wad.0000000000000397>
- Schmidt, H. D., & Duman, R. S. (2010). Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models. *Neuropsychopharmacology*, *35*(12), 2378–2391.
- Schmidt, H. D., Shelton, R. C., & Duman, R. S. (2011). Functional biomarkers of depression: diagnosis, treatment, and pathophysiology. *Neuropsychopharmacology*, *36*(12), 2375–2394.
- Schober, P., Boer, C., & Schwarte, L. (2018). Correlation Coefficients. *Anesthesia & Analgesia*, *126*(5), 1763-1768.
- Sheinerman, K. S., Tsivinsky, V. G., Abdullah, L., Crawford, F., & Umansky, S. R. (2013). Plasma microRNA biomarkers for detection of mild cognitive impairment: biomarker validation study. *Aging (Albany NY)*, *5*(12), 925.

- Shinagawa, S., Ikeda, M., Fukuhara, R., & Tanabe, H. (2006). Initial symptoms in frontotemporal dementia and semantic dementia compared with Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 21(2), 74–80.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., & Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359(6398), 843–845.
- Skorga, P., & Young, C. F. (2015). Mini-mental state examination for the detection of Alzheimer disease and other dementias in people with mild cognitive impairment. *Clinical Nurse Specialist*, 29(5), 265–267.
- Snyder, H. M., Carrillo, M. C., Grodstein, F., Henriksen, K., Jeromin, A., Lovestone, S., Mielke, M. M., O'Bryant, S., Sarasa, M., Sjøgren, M., Soares, H., Teeling, J., Trushina, E., Ward, M., West, T., Bain L. J., Shineman, D. W., Weiner, M. & Fillit, H. M. (2014). Developing novel blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 10(1), 109–114.
- Solito, E., & Sastre, M. (2012). *Microglia function in Alzheimer's disease*. *Front. Pharmacol.* 3, 14.
- Song, J.-H., Yu, J.-T., & Tan, L. (2015). Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease: risk, mechanisms, and therapy. *Molecular Neurobiology*, 52(3), 1477–1493.
- Sotaniemi, M., Pulliainen, V., Hokkanen, L., Pirttilä, T., Hallikainen, I., Soininen, H., & Hänninen, T. (2012). CERAD-neuropsychological battery in screening mild Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, 125(1), 16–23.
- Spuch, C., Antequera, D., Portero, A., Orive, G., Hernández, R. M., Molina, J. A., Bermejo-Pareja, F., Pedraz, J. L., & Carro, E. (2010). The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Biomaterials*, 31(21), 5608–5618.
- Su, F., Bai, F., & Zhang, Z. (2016). Inflammatory cytokines and Alzheimer's disease: a review from the perspective of genetic polymorphisms. *Neuroscience Bulletin*, 32(5), 469–480.
- Suárez-Calvet, M., Belbin, O., Pera, M., Badiola, N., Magrané, J., Guardia-Laguarta, C., Muñoz, L., Colom-Cadena, M., Clarimón, J., & Lleó, A. (2014). Autosomal-dominant Alzheimer's disease mutations at the same codon of amyloid precursor protein differentially alter A β production. *Journal of Neurochemistry*, 128(2), 330–339.
- Sutinen, E. M., Pirttilä, T., Anderson, G., Salminen, A., & Ojala, J. O. (2012). Pro-inflammatory interleukin-18 increases Alzheimer's disease-associated amyloid- β production in human neuron-like cells. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 1–14.
- Tan, L., Yu, J.-T., Liu, Q.-Y., Tan, M.-S., Zhang, W., Hu, N., Wang, Y.-L., Sun, L., Jiang, T., & Tan, L. (2014). Circulating miR-125b as a biomarker of Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 336(1–2), 52–56.
- Taylor, R. (1990). Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. *Journal Of Diagnostic Medical Sonography*, 6(1), 35-39.
- Tesseur, I., Zou, K., Esposito, L., Bard, F., Berber, E., Van Can, J., Lin, A. H., Crews, L., Tremblay, P., Mathews, P., Mucke, L., Masliah, E., & Wyss-Coray, T. (2006). Deficiency in neuronal TGF- β signaling promotes neurodegeneration and Alzheimer's pathology. *Journal of Clinical Investigation*, 116(11), 3060–3069.
- Toledo, J. B., Shaw, L. M., & Trojanowski, J. Q. (2013). Plasma amyloid beta measurements—a desired but elusive Alzheimer's disease biomarker. *Alzheimer's Research & Therapy*, 5(2), 8.
- Tomljenovic, L. (2011). Aluminum and Alzheimer's disease: after a century of controversy, is there a plausible link? *Journal of Alzheimer's Disease*, 23(4), 567–598.

- Trueba-Saiz, A., Cavada, C., Fernandez, A. M., Leon, T., Gonzalez, D. A., Ormaechea, J. F., Lleó, A., Del Ser, T., Nunez, A., & Torres-Alemán, I. (2013). Loss of serum IGF-I input to the brain as an early biomarker of disease onset in Alzheimer mice. *Translational Psychiatry*, 3(12), e330--e330.
- van der Wal, E. A., Gómez-Pinilla, F., & Cotmarv, C. W. (1993). Transforming growth factor- β 1 is in plaques in alzheimer and down pathologies. *NeuroReport*, 4(1), 69–72.
- Vega, J. N., & Newhouse, P. A. (2014). Mild cognitive impairment: diagnosis, longitudinal course, and emerging treatments. *Current Psychiatry Reports*, 16(10), 490.
- Vigo-Pelfrey, C., Seubert, P. P., Barbour, R., Blomquist, C., Lee, M., Lee, D., Coria, F., Chang, L., Miller, B., Lieberburg, I., & Schenk, D. (1995). Elevation of microtubule-associated protein tau in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurology*, 45(4), 788–793.
- Vilatela, M. E. A., López-López, M., & Yescas-Gómez, P. (2012). Genetics of Alzheimer's disease. *Archives of Medical Research*, 43(8), 622–631.
- Villeda, S. A., Luo, J., Mosher, K. I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T. M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., Lucin, K. M., Czirr, E., Park, J.-S. Couillard-Després, S., Aigner, L., Li, G., Peskind E. R., Kaye, J. A., Quinn, J. F., Galasko, D. R., Xie, X. S., Rando, T. A. & Wyss-Coray, T. (2011). The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*, 477(7362), 90–94.
- von Bernhardt, R., Cornejo, F., Parada, G. E., & Eugenín, J. (2015). Role of TGF β signaling in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(OCTOBER), 426.
- Walker, K. A., Ficek, B. N., & Westbrook, R. (2019). *Understanding the role of systemic inflammation in Alzheimer's disease*. ACS Publications.
- Walker, Z., Possin, K. L., Boeve, B. F., & Aarsland, D. (2015). Lewy body dementias. *The Lancet*, 386(10004), 1683–1697.
- Walton, J. R. (2006). Aluminum in hippocampal neurons from humans with Alzheimer's disease. *Neurotoxicology*, 27(3), 385–394.
- Walton, J. R. (2013). Aluminum involvement in the progression of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 35(1), 7–43.
- Weinstein, G., Beiser, A. S., Choi, S. H., Preis, S. R., Chen, T. C., Vorgas, D., Au, R., Pikula, A., Wolf, P. A., DeStefano, A. L., Vasan, R. S. & Seshadri, S. (2014). Serum brain-derived neurotrophic factor and the risk for dementia: the Framingham Heart Study. *JAMA Neurology*, 71(1), 55–61.
- Westwood, A. J., Beiser, A., DeCarli, C., Harris, T. B., Chen, T. C., He, X., Roubenoff, R., Pikula, A., Au, R., Braverman, L. E., Wolf, P. A., Vasan, R. S. & Seshadri, S. (2014). Insulin-like growth factor-1 and risk of Alzheimer dementia and brain atrophy. *Neurology*, 82(18), 1613–1619.
- Zhang, F., & Jiang, L. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 11, 243.

9 Anhang

*nahelby
dgr
30.1.16*


Technische Universität München

Technische Universität München - Fakultät für Medizin - Ethikkommission
Ismaninger Str. 22 | 81675 München - Germany

Klinikum rechts der Isar
Technische Universität München
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
PD Dr. med. Timo Grimmer
Ismaninger Str. 22

81675 München

München, 10.03.2016

Unser Zeichen: 11/16 S - Bearbeiter: A (bitte bei Schriftwechsel angeben)

Beratung nach § 15 Berufsordnung für Ärzte in Bayern

Studientitel:
Evaluation eines Bluttestes zur Diagnose der Alzheimer-Krankheit im Stadium der Leichten Kognitiven Störung.

Sehr geehrter Herr Dr. Grimmer,

die Ethikkommission hat Ihren Antrag vom 07.12.2015 (Eingang 15.12.2015) geprüft und in der Sitzung am 12.01.2016 beraten. Die zusätzlich angeforderten Informationen sind am 08.02.2016 (Antrag vom 25.01.2016) eingegangen.

Die Ethikkommission erhebt keine Einwände gegen die Durchführung der Studie.

Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt bei Ihnen. Änderungen des Protokolls sind zur erneuten Prüfung (Studie in Schriftform und elektronischer Form) vorzulegen. Das Studienergebnis ist anzuzeigen, ein Kurzbericht über das Ergebnis der Studie ist vorzulegen.

Die Ethikkommission empfiehlt die Eintragung des Forschungsprojektes in ein WHO-
anerkanntes Register.

Mit freundlichen Grüßen


Prof. Dr. Georg Schmidt
Vorsitzender der Ethikkommission

Prof. Dr.
Georg Schmidt
Vorsitzender

Prof. Dr.
Kurt Ulm
Stellvertretender Vorsitzender

Ismaninger Str. 22
81675 München
Germany

Tel +49 89 4140 4371
Fax +49 89 4140 4199

ethikkommission@mn.tum.de
www.ek.med.tum.de



Einwilligungserklärung

Klinikum rechts der Isar
Anstalt des öffentlichen Rechts

Klinik und Poliklinik für Psychiatrie
und Psychotherapie
BioBank (bbppTUM)

Ismaninger Straße 22
81675 München

Patient: _____
(Name, Vorname)

Geb.-Datum: _____

Ich bin damit einverstanden, dass meine Biomaterialien, z.B. Blut, Urin oder Liquor (Nervenwasser) zusammen mit krankheitsbezogenen Daten, ggf. auch Bildgebungsdaten (Kernspintomographie, PET) wie in der Informationsschrift beschrieben, an die BioBank der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Technischen Universität München (TUM) am Klinikum rechts der Isar gegeben und für medizinische Forschungszwecke verwendet werden. Dies betrifft unter Umständen auch die Weitergabe für Forschungsprojekte im Ausland. Das Eigentum an den Biomaterialien übertrage ich an die oben genannte Biobank.

Ich hatte ausreichend Gelegenheit, Fragen zu stellen.

Ich weiß, dass meine Teilnahme freiwillig ist und ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen kann. Daraus entstehen mir keine Nachteile.

Datenschutzerklärung

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Technischen Universität München (TUM) am Klinikum rechts der Isar wie in der Information beschrieben

- personenbezogene Daten von mir erhebt und speichert,
- weitere Angaben über meine Gesundheit aus meinen Krankenunterlagen entnimmt,
- die Daten gemeinsam mit meinen Biomaterialien pseudonymisiert (das heißt verschlüsselt) an die BioBank der o.g. Klinik für medizinische Forschungsvorhaben weitergibt.



Die Biomaterialien und Daten, ggf. auch Bildgebungsdaten (Kernspintomographie, PET), dürfen unbefristet für medizinische Forschungsprojekte verwendet werden. In pseudonymisierter, verschlüsselter Form dürfen sie Universitäten, Forschungsinstituten und forschenden Unternehmen, ggf. auch im Ausland, zur Verfügung gestellt werden.

Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich meine Einwilligung gegenüber der Biobank ohne Angabe von Gründen jederzeit widerrufen kann. Beim Widerruf werden auf mein Verlangen die verbliebenen Biomaterialien und die erhobenen Daten vernichtet bzw. gelöscht oder anonymisiert. Daten aus bereits durchgeführten Analysen können nicht mehr entfernt werden.

Die Patienteninformation und eine Kopie der Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Das Original verbleibt bei der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Technischen Universität München (TUM) am Klinikum rechts der Isar.

Ich möchte keine zukünftige Kontaktaufnahme durch Mitarbeiter der Klinik für Psychiatrie, z.B. zur weiteren Datenerhebung oder zur Information über neue Behandlungsmöglichkeiten oder Medikamentenstudien (bitte ggf. ankreuzen)

Name des Patienten in Druckbuchstaben

Ort, Datum (vom Patienten einzutragen)

Unterschrift des Patienten

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung des Patienten eingeholt.

Name des Arztes in Druckbuchstaben, Ort, Datum und Unterschrift