

Aus der Klinik für Neurologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. T.F. Münte

Quantifizierung von Tau, Phospho- Tau und  
 $\beta$ - Amyloidfragmenten zur Diagnostik von  
Demenzerkrankungen

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von  
Tina Wendt  
aus Burg  
Lübeck 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Moser
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Maria Rob

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2017

zum Druck genehmigt: Lübeck, den 10.10.2017

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Allgemeine Grundlagen der Demenz .....	1
1.2. Prävalenz der Demenz .....	2
1.3. Ätiologie häufiger dementieller Erkrankungen.....	3
1.3.1. Alzheimer-Krankheit .....	4
1.3.1.1. Geschichtlicher Hintergrund der Alzheimer Demenz.....	4
1.3.1.2. Pathologie der Alzheimer Demenz.....	6
1.3.2. Frontotemporale Demenz .....	7
1.3.3. Lewy- Körperchen Demenz .....	8
1.4. Demenzdiagnostik .....	9
1.4.1. Diagnostikpfad für die Diagnosestellung.....	9
1.4.2. Liquordiagnostik .....	11
1.4.2.1. Neurodegenerationsmarker .....	11
1.4.2.2. Sensivität und Spezifität der Liquorproteine.....	13
1.4.2.3. Demenzkategorisierung.....	13
1.4.2.4. Probleme in der Diagnosestellung .....	15
1.5. Fragestellung.....	16
<b>2. Materialien und Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1. Untersuchungsmaterialien .....	18
2.1.1. Reagenzien .....	18
2.1.2. Innotest Kits.....	18
2.1.3. Geräte .....	20
2.1.4. Hilfsmittel und Einmalartikel.....	21
2.2. Methoden .....	21
2.2.1. Votum der Ethik-Kommission.....	21
2.2.2. Patienten .....	21
2.2.2.1. Aufklärung der Patienten .....	22
2.2.3. Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials .....	22
2.2.3.1. Lumbalpunktion .....	22
2.2.3.2. Experimentreihe A und B.....	23
2.2.3.3. Experimentreihe C und D .....	24
2.2.4. Versuchsabläufe der einzelnen Experimentreihen .....	24
2.2.4.1. Experimentreihe A .....	25
2.2.4.2. Experimentreihe B.....	27
2.2.4.3. Experimentreihe C.....	28
2.2.4.4. Experimentreihe D.....	30

2.2.5.	Gefriertrocknung.....	32
2.2.6.	Enzyme- linked- immunosorbent assay (ELISA) .....	32
2.3.	Statistik.....	33
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.1.	Experimentreihe A und B.....	35
3.1.1.	Experimentreihe A: Probe I (Liquor ohne Zusätze) .....	36
3.1.2.	Experimentreihe A: Probe III (Liquorgemisch plus Natriumacid) .....	39
3.1.3.	Experimentreihe A: Probe IV (Liquorgemisch plus Proteaseinhibitor) .....	42
3.1.4.	Experimentreihe A: Probe V (Liquorgemisch in flüssigen Stickstoff) .....	43
3.1.5.	Experimentreihe B: $\gamma$ -Secretaseinhibitor.....	45
3.2.	Experimentreihe C.....	46
3.3.	Experimentreihe D.....	50
3.3.1.	$\beta$ - Amyloid (1-42) (A $\beta$ ) der untersuchten Gruppen.....	50
3.3.2.	Gesamt- Tau (h-Tau) der untersuchten Gruppen.....	53
3.3.3.	Phospho-Tau 181 (p-Tau) der untersuchten Gruppen .....	55
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>58</b>
4.1.	Experimentreihe A und B.....	58
4.1.1.	Veränderungen der $\beta$ -Amyloidkonzentrationen (1-42) gesunder Probanden.....	58
4.1.2.	Veränderungen der Gesamt-Tau-Konzentrationen gesunder Probanden ...	63
4.1.3.	Veränderungen der Phospho-Tau 181- Konzentrationen gesunder Probanden.....	67
4.1.4.	Bedeutung für die Interpretation von Biomarkern.....	69
4.2.	Experimentreihe C.....	70
4.3.	Experimentreihe D.....	72
4.3.1.	Die Gruppe der Alzheimer Demenz- Proben.....	72
4.3.2.	Die Gruppe der frontotemporalen Demenz- Proben.....	77
4.3.3.	Die Gruppe der Lewy- Körperchen Demenz- Proben.....	80
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>84</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>86</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>100</b>
7.1.	Informationsblatt und Einwilligungserklärung für die Patienten .....	100
7.2.	Votum der Ethikkommission .....	103
7.3.	Experimentreihe A: tabellarische Ergebnisaufstellung .....	104
<b>8.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>106</b>
<b>9.</b>	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>107</b>

## **1. Einleitung**

---

### **1.1. Allgemeine Grundlagen der Demenz**

Der Begriff "Demenz" stammt aus dem lateinischen und bedeutet soviel wie "weg vom Geist" (de: "weg von" und mens: "Geist"). Die Erkrankung hat sich mittlerweile zu den häufigsten Krankheitssyndromen im Alter entwickelt. Der Demenz zugrunde liegt meist eine diagnostizierbare Erkrankung des Gehirns (z.B. Alzheimer-Krankheit). Typisch ist hierfür die Veränderung oder Zerstörung von Synapsen und Nervenzellen. Der fortschreitende Krankheitsprozess ist charakterisiert durch einen Gedächtnisabbau sowie dem allmählichen Verlust kognitiver, emotionaler und sozialer Fähigkeiten (<https://www.demenz-leitlinie.de/aerzte/Demenz.html>). Im Verlauf kommt es u.a. zur zeitlich-örtlichen Desorientierung, Beeinträchtigung der Kommunikationsfähigkeit sowie der autobiographischen Identität und von Persönlichkeitsmerkmalen (<https://www.dgn.org/leitlinien/3176-leitlinie-diagnose-und-therapie-von-demenzen-2016>). Demenzerkrankte können ihren Alltag im fortschreitenden Krankheitsverlauf nicht mehr alleine bewältigen und entwickeln starke Defizite in ihren alltagspraktischen Fertigkeiten. Im schweren Stadium folgt eine vollständige Hilflosigkeit, in dem ein hoher Betreuungs- und Pflegeaufwand notwendig ist. Es besteht zudem ein erhöhtes Morbiditätsrisiko für andere Erkrankungen und eine verkürzte Lebenserwartung (<https://www.dgn.org/leitlinien/3176-leitlinie-diagnose-und-therapie-von-demenzen-2016>). Deshalb sind Demenzen als schwere Erkrankungen einzustufen, die mit einem hohen Maß an Ängste bezüglich der Erkrankung bei Betroffenen und Angehörigen verbunden sind.

Die Demenz ist ein klinisches Syndrom, welches durch die ICD-10 nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (Dilling, Mombour, & WHO, 2008) folgendermaßen definiert wird.

*ICD-10- Definition-Demenz (F00- F03)*

*Demenz ist ein Syndrom als Folge einer meist chronischen oder fortschreitenden Krankheit des Gehirns mit Störung vieler höherer kortikaler Funktionen, einschließlich Gedächtnis, Denken, Orientierung, Auffassung, Rechnen,*

*Lernfähigkeit, Sprache, Sprechen und Urteilsvermögen im Sinne der Fähigkeit zur Entscheidung. Das Bewusstsein ist nicht getrübt. Für die Diagnose einer Demenz müssen die Symptome nach ICD über mindestens 6 Monate bestanden haben. Die Sinne (Sinnesorgane, Wahrnehmung) funktionieren im für die Person üblichen Rahmen. Gewöhnlich begleiten Veränderungen der emotionalen Kontrolle, des Sozialverhaltens oder der Motivation die kognitiven Beeinträchtigungen, gelegentlich treten diese Syndrome auch eher auf. Sie kommen bei Alzheimer-Krankheit, Gefäßkrankungen des Gehirns und anderen Zustandsbildern vor, die primär oder sekundär das Gehirn und die Neuronen betreffen. (Dilling, Mombour, & WHO, 2008).*

## **1.2. Prävalenz der Demenz**

Als Prävalenz wird die Anzahl der Kranken in der Bevölkerung zu einem bestimmten Zeitpunkt bezeichnet. Gemeinsamen Schätzungen von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und der Alzheimer's Disease International (ADI) zufolge litten 2010 weltweit 35,6 Millionen Menschen an einer Demenz. Diese Zahl, schätzten die Experten, werde sich binnen 20 Jahren verdoppeln. Die einzelnen Weltregionen unterscheiden sich dabei stark. Den höchsten Wert weist mit 7,2% Westeuropa auf, den niedrigsten Wert stellt Westafrika mit 1,2% dar. Das entspricht einer weltweiten durchschnittlichen Demenzhäufigkeit von 3,9% aller mindestens 60-Jährigen. Deutschland liegt unter allen Nationen nach der Gesamtzahl der Kranken auf dem fünften Platz, lediglich übertroffen von China, den USA, Indien und Japan (Ferri, et al., 2005).

In Deutschland wird die Zahl der Demenzkranken auf circa 1,2 Million geschätzt (<https://www.dgn.org/leitlinien/3176-leitlinie-diagnose-und-therapie-von-demenzen-2016>). Aufgrund der Sensivität von Erhebungen beinhaltet diese Zahl möglicherweise eine Unterschätzung leichter Demenzstadien (Ziegler & Doblhammer, 2009). Die Prävalenz ist stark altersabhängig, da die Demenz mit steigendem Alter zunimmt (<https://www.dgn.org/leitlinien/3176-leitlinie-diagnose-und-therapie-von-demenzen-2016>). Frauen erkranken meist häufiger als Männer.

### 1.3. Ätiologie häufiger dementieller Erkrankungen

Ätiologie	relativer Anteil in %	Alterscharakteristik
Alzheimer Demenz	50-60	Inzidenz und Prävalenz mit zunehmendem Alter steigend
Vaskuläre Demenz	5-15	Inzidenz und Prävalenz mit zunehmendem Alter steigend
Gemischte Demenz (Alzheimer + vaskulär)	10-20	Inzidenz und Prävalenz mit zunehmendem Alter steigend
Frontotemporale Demenz	5-10	50-70 Jahre
Lewy-Körperchen Demenz und Parkinson-Demenz	5-10	50-70 Jahre
Kortikobasale Degeneration	5-15	je nach Ätiologie
Metabolische und nutritiv bedingte Demenzen		
Normaldruckhydrozephalus		
Entzündliche Erkrankungen		

**Tabelle 1:** Darstellung der verschiedenen Demenzen nach Ätiologie, prozentualen Anteil und der Alterscharakteristik (Riepe, 2012)

### **1.3.1. Alzheimer-Krankheit**

#### **1.3.1.1. Geschichtlicher Hintergrund der Alzheimer Demenz**

Den Begriff „Alzheimersche Krankheit“ prägt Emil Kraepelin, als er ihn auf Seite 627 der 8. vollständig umgearbeiteten Auflage seines Lehrbuchs 1910 erstmals verwendet : „Die klinische Deutung dieser Alzheimerschen Krankheit ist zur Zeit noch unklar.“ (Maurer & Maurer, 1999, S. 268).

1901 begegnet Auguste D. erstmalig Dr. Alois Alzheimer (1864-1915) in der Irrenanstalt in Frankfurt am Main. Sie fiel ihm auf, da sie mit 51 Jahren eine besonders junge Patientin mit der damaligen allgemein anerkannten Diagnose der „senilen Demenz“ war und zudem mit ihrem schnellen geistigen Verfall seine Aufmerksamkeit erregte. Alzheimer untersuchte sie mehrfach und betreute sie gewissenhaft. Er erhob folgende Anamnese: „Immer gesund, in glücklicher Ehe, einzige Tochter, kein Mißfall. Seit einem halben Jahr verändert. Eifersuchtsideen. Abnehmen des Gedächtnisses, öfters beim Zubereiten des Essens. Zweckloses Herumwirtschaften in der Wohnung. Furcht vor ganz bekannten Leuten. Versteckte alle möglichen Gegenstände, die sie dann nicht mehr finden konnte. Schien sich nicht mehr auszukennen. Bei der Aufnahme völlig ratloses Verhalten. Zeitlich und örtlich völlig desorientiert, außerordentlich widerstrebend.“ (Maurer & Maurer, 1999, S. 195). Dies ließ ihn zu folgender Schlussfolgerung kommen: „Mein Fall Auguste D. bot schon klinisch ein so abweichendes Bild, daß er sich unter keine der bekannten Krankheiten einreihen ließ.“ (Alzheimer, 1907).

Der Krankheitsverlauf stellte sich folgendermaßen dar: „Im weiteren Verlauf treten die als Herdsymptome zu deutenden Erscheinungen bald stärker, bald schwächer hervor. Dagegen macht die allgemeine Verblödung Fortschritte. Nach 4,5 jähriger Krankheitsdauer tritt der Tod ein. Die Kranke war schließlich völlig stumpf, mit angezogenen Beinen zu Bett gelegen, hatte unter sich gehen lassen und trotz aller Pflege Dekubitus bekommen.“ (Alzheimer, 1907). Nach dem Tod von Auguste D. 1906 wird deren Gehirn ausführlich makro- und mikroskopisch von A. Alzheimer in München untersucht. Anatomisch war es gekennzeichnet durch eine Atrophie der Hirnrinde mit massenhaften Zellausfällen und einer eigenartigen Fibrillenerkrankung der Nervenzellen, einer starken Wucherung der faserigen Glia

und einer Bildung zahlreicher stäbchenartiger Gliazellen (Maurer & Maurer, 1999, S. 198). Zusätzlich stellte er fest, dass Ablagerungen eigentümlicher Stoffwechselprodukte in Form von Plaques in der gesamten Hirnrinde nachzuweisen, welche leichte Wucherungserscheinungen an den Gefäßen aufweisen (Maurer & Maurer, 1999, S. 198). In der weiteren Karriere von A. Alzheimer publizierte er 3 weitere ähnlich gestaltete Krankheitsverläufe und deren anatomischen Hirnbefunde (Maurer & Maurer, 1999, S. 215).

Weltweit wird der Begriff der „Alzheimerschen Krankheit“ noch zu Alzheimers Lebzeiten in die medizinische Weltliteratur eingeführt. Dr. Gonzalo R. Lafora, ein Histopathologe aus Madrid, ist der Erste, der einen alzheimerkranken Amerikaner beschreibt und dies 1911 publiziert (Lafora, 1911).

Es fällt jedoch auf, dass die Krankenbezeichnung „Alzheimersche Krankheit“ für junge Erkrankte verwendet wird und für die Alten weiterhin Bezeichnungen wie Greisenblödsinn und Greisenschwachsinn benutzt werden (Maurer & Maurer, 1999, S. 274). Und das obwohl sie histologisch keine Unterscheidungen zulassen, wie 1925 Dr. Ernst Grünthal feststellt (Grünthal, 1926).

1936 stellt Dr. Hanns Pittrich in der Jahresversammlung der Gesellschaft Deutscher Neurologen und Psychiater den Fall eines 70-jährigen Kranken vor, den er mit Diapositiven illustriert (Maurer & Maurer, 1999, S.276). Diesem ordnet er die Diagnose „Alzheimer“ zu, d.h. bei einem senil Dementen. Er macht somit einen Schritt in Richtung einer Vereinheitlichung der Krankheitsbezeichnung (Maurer & Maurer, 1999, S. 279).

Bedingt durch den Zweiten Weltkrieg kehrt in der Folgezeit Ruhe um die Alzheimersche Krankheit ein. Erst in den frühen 60'er Jahren finden sich Schriftstücke, die dokumentieren, dass sich die „Alzheimer“- Bezeichnung bei Kongressen immer mehr durchsetzt (Maurer & Maurer, 1999, S. 279). Mittlerweile befassen sich selbst internationale Kongresse mit dem Thema Demenz. 1967 findet ein Symposium in Lausanne zu dem Thema „Senile Demenz- klinische und therapeutische Aspekte“ statt. Die Teilnehmer kommen aus ganz Europa und referieren über klinische und klassifikatorische Konzepte der senilen Demenz (Maurer & Maurer, 1999, S. 280). Dabei fasst H. Lauter aus der psychiatrischen Universitätsklinik Göttingen seine Ergebnisse folgendermaßen zusammen: „In

Übereinstimmung mit anderen Doktoren betrachten wir die senile Demenz und die Alzheimer Krankheit als eine Krankheitseinheit mit unterschiedlichem Alter bei der Manifestation. Die Bezeichnung ‚Alzheimer-Demenz‘ wird deshalb vorgeschlagen.“ (Lauter & Meyer, 1968).

Alzheimer und ‚Alzheimer‘ sind somit eine doppelte Karriere: Zuerst die Beschreibung für eine Krankheit, die bei Auguste D. und wenigen anderen Fällen zu Beginn des 20. Jahrhunderts auftritt (Maurer & Maurer, 1999, S. 292). Gegen Ende des Jahrhunderts dann eine ‚Ver Alzheimerung‘ und eine Verschmelzung der Begriffe präsenile und senile Demenz.

### **1.3.1.2. Pathologie der Alzheimer Demenz**

#### *ICD-10-Definition Demenz bei Alzheimer-Krankheit*

*Die Alzheimer-Krankheit ist eine primär degenerative zerebrale Krankheit mit unbekannter Ätiologie und charakteristischen neuropathologischen und neurochemischen Merkmalen. Sie beginnt meist schleichend und entwickelt sich langsam, aber stetig über einen Zeitraum vom mehreren Jahren (Dilling, Mombour, & WHO, 2008).*

Im ICD-10 wird die Alzheimer-Krankheit (AD) in vier verschiedene Kategorien unterteilt. Diese unterscheiden nach frühem (F00.0, G30.0) oder spätem Beginn (F00.1, G30.1), Formen der atypischen oder gemischten Form (F00.2, G30.8) und der nicht näher bezeichneten Form (F00.9, G30.9).

Die genaue Ursache der Alzheimer-Krankheit ist bisher noch ungeklärt. Typische Veränderungen im Gehirn bei der Alzheimer Demenz werden jedoch mit der Ablagerung von schädlichen Eiweißen (Amyloid-Plaques) an den Nervenzellen, Bildung neurofibrillärer Bündel und mit einer Übermittlungsstörung von Nervenimpulsen in Verbindung gebracht (Wiltfang, et al., 2001). Mithilfe von Neurotransmittern werden Informationen von Nervenzelle zu Nervenzelle gesendet. Bei einem dieser Neurotransmitter, dem Acetylcholin, wurde eine verminderte Konzentration in der Hirnrinde festgestellt (Blennow & Hampel, 2003). Der daraus resultierende Transmitterüberschuss von Glutamat und zusätzlichen

Eiweißablagerungen, sind wahrscheinlich mit eine der Ursachen für die Nervenzellschädigung im Gehirn.

Das führende Krankheitssymptom ist eine fortschreitende Abnahme der Gedächtnisleistung. Häufig beginnt die AD im 7. Lebensjahrzehnt. Bei etwa 5% der Erkrankten beginnen die Symptome bereits vor dem 65. Lebensjahr. Bisher sind keine Unterscheidungsmerkmale der früh und der spät beginnenden AD bekannt. Darüber hinaus gibt es eine erbliche Variante der Alzheimer-Krankheit. Bei dieser Form kommt es zu Mutationen auf verschiedenen Genen, die die Krankheitsentstehung begünstigen. Der Anteil der erblichen Fälle unter allen AD-Erkrankten beträgt weniger als 5%. Der Krankheitsbeginn manifestiert sich meist vor dem 65. Lebensjahr. Man kann von einer erblichen Variante ausgehen, wenn ein früher Krankheitsbeginn vorliegt und die Erkrankung ebenfalls in zwei vorhergehenden Generationen früh aufgetreten ist.

### **1.3.2. Frontotemporale Demenz**

Für die Frontotemporale Demenz (FTD) wird in der ICD-10 der Terminus der Pick-Krankheit verwendet.

#### *ICD-10-Definition Demenz bei Pick-Krankheit*

*Eine progrediente Demenz mit Beginn im mittleren Lebensalter, charakterisiert durch frühe, langsam fortschreitende Persönlichkeitsänderung und Verlust sozialer Fähigkeiten. Die Krankheit ist gefolgt von Beeinträchtigungen von Intellekt, Gedächtnis und Sprachfunktionen mit Apathie, Euphorie und gelegentlich auch extrapyramidalen Phänomenen (Dilling, Mombour, & WHO, 2008).*

Die FTD ist eine seltene Form des fortschreitenden intellektuellen Abbaus. Bei der Erkrankung stehen fortschreitende Veränderungen der Persönlichkeit, des Antriebs und der sozialen Verhaltensweisen im Vordergrund (Greck, Lautenschlager, & Kurz, 2000). Die neurodegenerativen Veränderungen beschränken sich meist auf die Hirnrinde. Gelegentlich sind sie aber auch in den Stammganglien oder den motorischen Vorderhornzellen zu finden. Charakteristisch ist ein unspezifischer Nervenzellverlust mit reaktiver Gliavermehrung (Greck, Lautenschlager, & Kurz, 2000).

Man kann drei Unterformen der FTD unterscheiden. Zu einem die frontotemporale Verlaufsform mit führender Wesensveränderung, die primär- progressive Aphasie und die semantische Demenz (<https://www.dgn.org/leitlinien/3176-leitlinie-diagnose-und-therapie-von-demenzen-2016>). Allen Formen gemeinsam ist ein schleichender Beginn und ein allmähliches Fortschreiten der Erkrankung. Die Erkrankung beginnt meist vor dem 65.Lebensjahr, selten nach dem 75. Lebensjahr.

### **1.3.3. Lewy- Körperchen Demenz**

Die Lewy- Körperchen Demenz (LBD) ist in der ICD-10 ohne syndromale Beschreibung benannt (G.31.82).

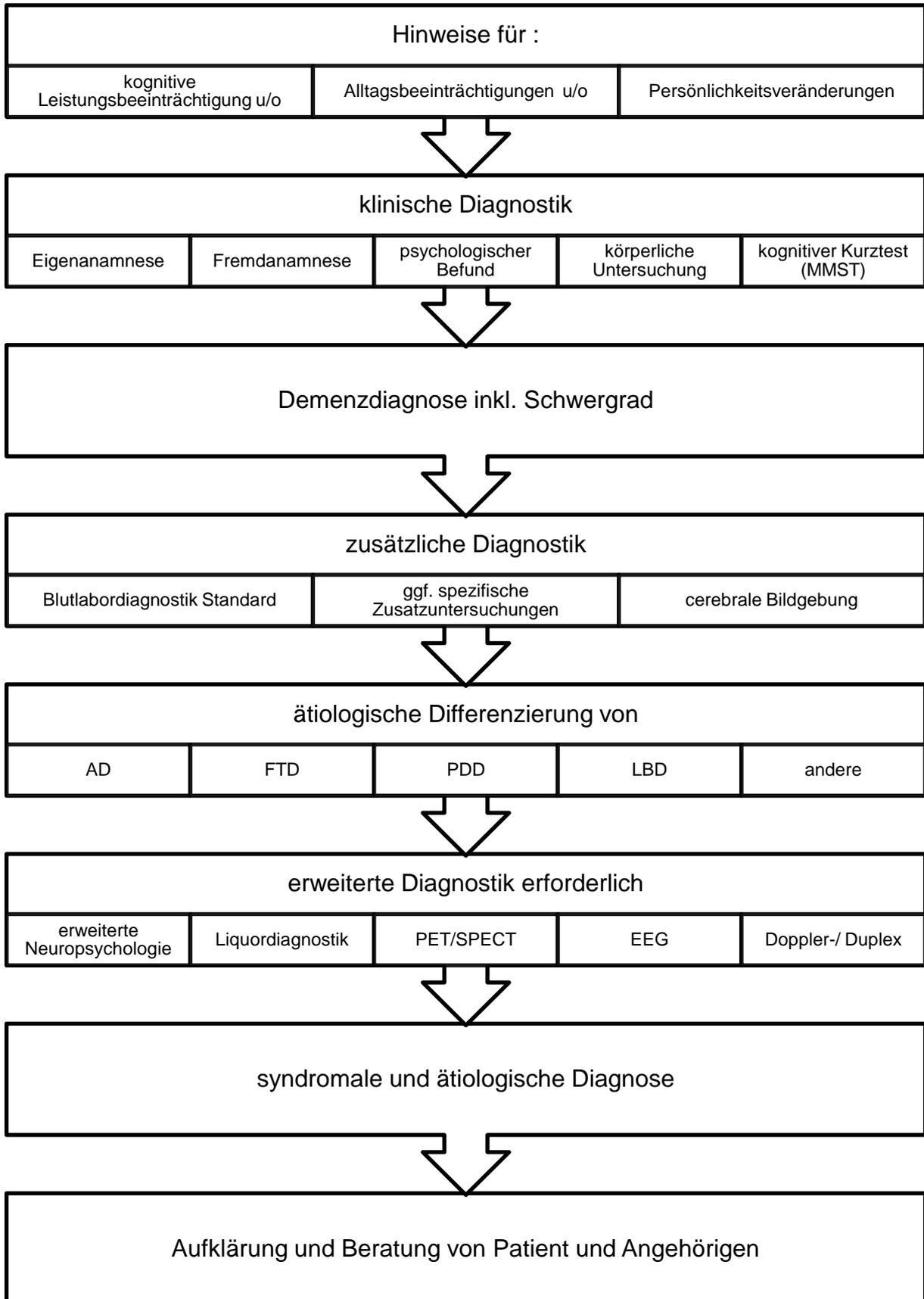
Die LBD ist die zweithäufigste Form der degenerativen Demenzen nach der Alzheimer Demenz (AD). Für die Diagnosestellung existieren Kriterien, die von einem Konsortium auf einem internationalen Workshop für die LBD entwickelt wurden, zuletzt 2005 überarbeitet (McKeith, et al., 2005). Zu den Hauptkriterien zählen fluktuierende kognitive Fähigkeiten, optische Halluzinationen und ein spontaner Parkinsonismus (<https://www.dgn.org/leitlinien/3176-leitlinie-diagnose-und-therapie-von-demenzen-2016>). Die extrapyramidalen Symptome, wie die der Bewegungsverlangsamung, starrer Gesichtsausdruck und der körperlichen Steifheit können in ihrer Ausprägung sehr unterschiedlich sein (Karantzoulis & Galvin, 2013). Insgesamt nehmen die Symptome der LBD im Krankheitsverlauf stetig zu. U.a. treten gehäuft Schlafstörungen und vermehrte Sturzereignisse aufgrund der Bewegungsstörungen auf. Da die LBD einer Parkinson-Erkrankung mit Demenz in ihrer Ausprägung sehr ähnelt, ist eine Unterscheidung beider Entitäten oft schwierig. Typischerweise tritt bei der LBD die Demenz bereits vor der Parkinson-Symptomatik auf und zeigt nur ein geringes Ansprechen auf den Therapieversuch mit L-DOPA. Zudem verläuft die Erkrankung rasch progredient.

## **1.4. Demenzdiagnostik**

Die Diagnostik von Demenzerkrankungen dient dazu, die syndromale und ätiologische Zuordnung der Demenz zu ermitteln. Die alleinige klinische Charakteristik ist für eine ätiologische Zuordnung jedoch nicht ausreichend. Da die Erfassung klinischer Symptome zudem oft untersucherabhängig ist, ist man bemüht objektive Methoden hinzuziehen. Die Entwicklung der Demenzdiagnostik nimmt daher zunehmend den Weg, das Demenzsyndrom durch dessen neurobiologischen und physiologischen Veränderungen zu erkennen. Man erhofft sich dadurch Objektivität, eine verbesserte Früherkennung sowie eine genaue ätiologische Zuordnung der Demenz. Dazu gehören unter anderem die Erfassung eventueller Geruchseinschränkungen, bildmorphologischer Analyseverfahren wie dem kranialen MRT, die Bestimmung von Liquorproteinen sowie die Single-Photon-Emissionscomputertomographie (SPECT) bzw. die Positronenemissionstomographie (PET) (Mahlberg, 2010).

Eine frühzeitige Diagnostik von Demenzerkrankungen sollte im besonderen Maße angestrebt werden. Viele therapeutische und präventive Ansätze können gerade im Frühstadium die Krankheitsbelastung für die Erkrankten und Angehörigen mindern sowie die Pflegebedürftigkeit deutlich verzögern. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Frühdiagnostik einer besonderen Sorgfalt bedarf. Die Gefahr der falsch-positiven Diagnosestellung ist v.a. in frühen Krankheitsstadien erhöht.

### **1.4.1. Diagnostikpfad für die Diagnosestellung**



**Abbildung 1:** schematische Darstellung des Diagnostikpfades für die Diagnosestellung einer Demenz (Abkürzungen: PDD: Parkinson-Disease-Demenz, AD: Alzheimer Demenz, FTD: frontotemporale Demenz, LBD: Lewy-Körperchen-Demenz) (<https://www.dgn.org/leitlinien/3176-leitlinie-diagnose-und-therapie-von-demenzen-2016>)

### **1.4.2. Liquordiagnostik**

Der Liquordiagnostik kommen in der ätiologischen Diagnostik von Demenzerkrankungen zwei Funktionen zu. Sie dient dazu, Erkrankungen, für deren Vorliegen klinische Hinweise bestehen, zu diagnostizieren und auszuschließen, wie zum Beispiel die der entzündlichen Gehirnerkrankungen. Ferner unterstützt sie die Diagnosestellung von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere die der Alzheimer Demenz. Mithilfe der Liquordiagnostik lassen sich Erkrankungen, wie z.B. postvirale Enzephalitiden, Lues, M. Whipple, Neuroborreliose, Neurosarkoidose, die das Symptom der Demenz zeigen können, von der neurodegenerativen Demenz abgrenzen. Dies trifft auch für Vaskulitiden, Metastasen, paraneoplastische Enzephalopathien und die multiple Sklerose zu (<https://www.dgn.org/leitlinien/3176-leitlinie-diagnose-und-therapie-von-demenzen-2016>). Daher sollten im Falle der Liquordiagnostik bei Demenz die Parameter mit erhoben werden, die auf eine solche Erkrankung hinweisen können. Dazu gehören: Zellzahl, Gesamtprotein, Laktatkonzentration, Glukose, Albuminquotient, intrathekale IgG-Produktion und oligoklonale IgG-Banden (<https://www.dgn.org/leitlinien/3176-leitlinie-diagnose-und-therapie-von-demenzen-2016>).

#### **1.4.2.1. Neurodegenerationsmarker**

Trotz der Verfügbarkeit guter diagnostischer klinischer Kriterien, wird die Alzheimer Demenz (AD) noch häufig fehldiagnostiziert (Blennow, 2001). Diese diagnostische Lücke kann durch die Bestimmung verschiedener Liquorproteine, sogenannter Biomarker, erheblich minimiert werden. Aktuell gilt, dass durch die Interpretation von einzelnen Proteinen keine Abgrenzung einer AD von den anderen Demenzformen möglich ist. Eine vernünftige Kombination mehrerer Biomarker erhöhen die Sensivität und Spezifität in der Diagnostik erheblich (Riemenschneider, et al., 2002) (Eschweiler, Leyhe, Klöppel, & Hüll, 2010) (<https://www.dgn.org/leitlinien/3176-leitlinie-diagnose-und-therapie-von-demenzen-2016>).

Im Liquor sind Korrelate der neuropathologischen Veränderungen messbar, die u.a. die Alzheimer-Krankheit definieren. Die aktuell klinisch relevanten Parameter sind  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub> (A $\beta$  1-42), Gesamt-Tau (h-Tau) und Phospho-Tau<sub>(181P)</sub> (p-Tau) (<https://www.dgn.org/leitlinien/3176-leitlinie-diagnose-und-therapie-von-demenzen-2016>).

$\beta$ -Amyloide sind Peptide von 36-43 Aminosäuren. Sie entstehen durch die enzymatische Spaltung des Amyloid- Precursor Protein (APP) durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Secretasen. Studien lassen vermuten, dass es bei der AD durch einen gestörten Abbau der  $\beta$ -Amyloide zu deren Akkumulation kommt (Kang, Vanderstichele, Trojanowski, & Shaw, 2012). Sie polymerisieren zunächst zu löslichen Oligomeren und anschließend zu größeren unlöslichen Polymeren. Diese liegen dann extrazellulär zwischen den Neuronen als Amyloidplaques vor (Kang, Vanderstichele, Trojanowski, & Shaw, 2012).

Die Tau-Proteine sind Hauptbestandteil der intraneuralen Fibrillenbündel. Ursprünglich dienen sie der Stabilisierung der Mikrotubuli und somit dem Zytoskelett. Im Falle einer AD sind die Proteine an Position Threonin 181 vermehrt phosphoryliert, was zu einem Funktionsverlust und letztendlich deren Aggregation führt. Durch diese Veränderungen destabilisiert sich das Zytoskelett und es kommt zu einer Zelldegeneration (Kang, Vanderstichele, Trojanowski, & Shaw, 2012).

Die Messung der Proteinkonzentrationen im Liquor ist möglich durch die Benutzung der ELISA- Technik (Vandermeeren, Mercken, Vanmechelen, Six, & van de Voorde, 1993), die die Quantifizierung der Proteine mithilfe spezifischer Antikörper ermöglicht. Allgemeingültige exakte Grenzwerte für die einzelnen Parameter existieren heute noch nicht (<https://www.dgn.org/leitlinien/3176-leitlinie-diagnose-und-therapie-von-demenzen-2016>). Dies ist bedingt durch die Varianzen durch fehlende Leitlinien in der präanalytischen Handhabung und Verwendung von Analysekits verschiedener Hersteller. Grobe Referenzwerte stehen jedoch zur Verfügung.

Bei den Tau-Proteinen besteht ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Konzentration und dem Alter des Patienten. Daraus haben sich für verschiedene Altersgruppen separate Referenzwerte ergeben. In der Altersgruppe von 21 bis 51 Lebensjahren ist Liquor-Tau- Konzentration von Gesunden <300pg/ml, <450pg/ml für 51 bis 70- jährige und <500 pg/ml in der Gruppe der 71 bis 93 Jahre alten Patienten (Sjögren, et al., 2001). Die  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>- Konzentration ist

altersunabhängig. Hier wird der Referenzwert für Gesunde  $>500\text{pg/ml}$  angesetzt (Sjögren, et al., 2001), (Engelborghs, et al., 2008).

Die Biomarker werden mittlerweile auch zur Abgrenzung der AD von anderen möglichen Ursachen, wie der vaskulären Demenz, Lewy-Körperchen Demenz (LBD) und Frontotemporalen Demenz (FTD) genutzt. Typisch für die AD sind eine Reduktion des  $\beta$ -Amyloids<sub>(1-42)</sub>, steigende h-Tau- und p-Tau-Konzentrationen (Motter, et al., 1995), (Sunderland, et al., 2003), (Blennow und Hampel 2003). Bei der vaskulären Demenz und psychiatrischen Erkrankungen wie der Depression, konnten bisher ausschließlich Konzentrationen innerhalb des Normbereiches von p-Tau festgestellt werden (Sjögren, et al., 2001).

#### **1.4.2.2. Sensivität und Spezifität der Liquorproteine**

Zu den für die Beurteilung der diagnostischen Qualität eines Labortestes maßgeblichen Kriterien zählen in erster Linie die Sensivität und Spezifität. Die Sensivität ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, mit der bei Kranken ein pathologisches (positives) Messergebnis zu erwarten ist (Seelig, 2008). Die Spezifität ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, mit der bei einem Gesunden ein nicht pathologisches (negatives) Messergebnis auftreten wird (Seelig, 2008).

In großen Studien konnten eine hohe Sensivität und Spezifität, insbesondere der kombinierten Messung von Tau und  $\beta$ -Amyloid in der Abgrenzung von Demenzkranken mit Alzheimer Demenz gegenüber gesunden Personen gezeigt werden (Sunderland, et al., 2003). Durch die Analysen der Grenzwerte aus Metaanalysen ergaben sich eine Sensivität von 92% und eine Spezifität von 89% (Sunderland, et al., 2003). Zusätzlich zeigten Untersuchungen, dass die Liquorveränderungen schon im sehr frühen Krankheitsstadium in typischer Weise vorliegen können (Hansson, et al., 2006), (Mattsson, et al., 2009).

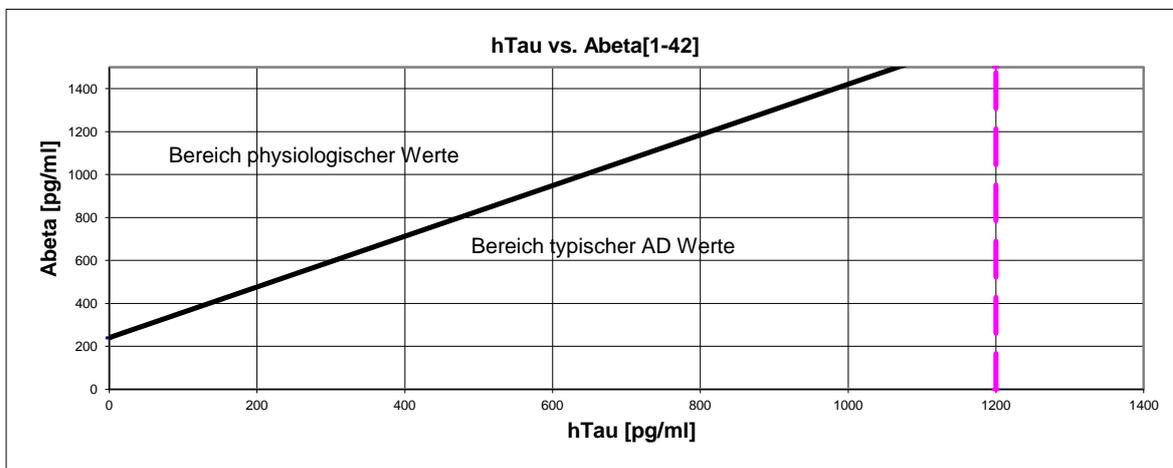
#### **1.4.2.3. Demenzkategorisierung**

Die kombinierte Anwendung von der Tau- und  $\beta$ -Amyloid- Bestimmung im Liquor erlaubt die Möglichkeit einer Unterscheidung zwischen der Alzheimer Demenz (AD) und dem normalen Altern, sowie anderen neurologischen Erkrankungen wie

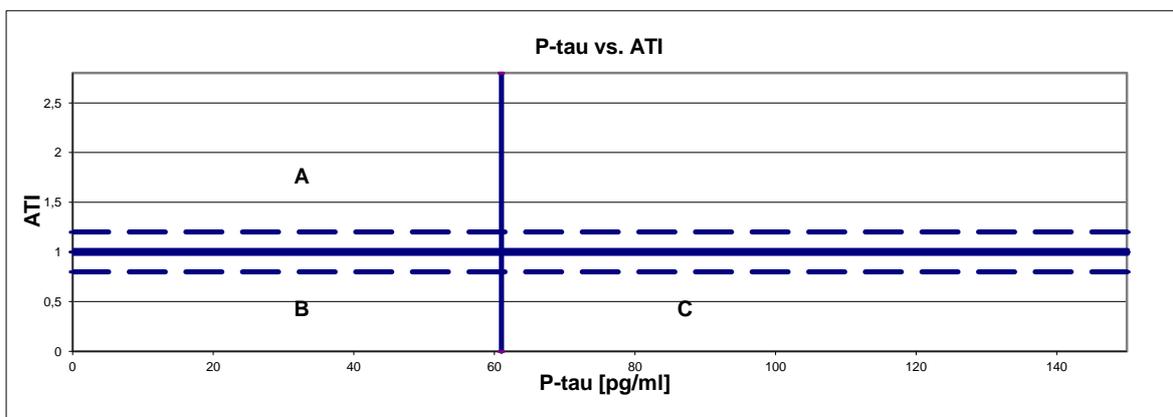
zum Beispiel der Depression. Sie ermöglicht aber auch eine frühe Alzheimer-Demenzdiagnostik. Dies ist unter anderem möglich durch die graphische Darstellung der kombinierten Biomarker und einer anhand dieser ermittelten Diskriminierungslinie in einem Graphen. Zu diesem Zweck werden die quantifizierten Biomarker Tau und  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub> in einem Diagramm aufgetragen (Diagramm 1). Diese Trendlinie wurde innerhalb von Studien ermittelt (Hulstaert, et al., 1999) .

### Diskriminierungslinie

$$\beta \text{ Amyloid} = 240 + 1.18 \text{ Tau}$$



**Diagramm 1:** Gezeigt ist die Gesamt-Tau- Konzentration (h-Tau) und die  $\beta$ -Amyloid-Konzentration (Abeta) in pg/ml; die Diskriminierungslinie trennt das Diagramm in einen Bereich von Alzheimer-Demenz charakteristischer Werte und denen der physiologischen Werte



**Diagramm 2:** Gezeigt ist die Phospho-Tau- Konzentration (P-Tau) in pg/ml und der internationale Amyloid-Tau- Index (ATI); das Diagramm wird in die Bereiche A, B und C unterteilt; A: entspricht Werten Gesunder Patienten, B: Erkrankte anderer Demenzformen, C: Alzheimer- Demenz- Erkrankte oder Patienten mit einer Mild Cognitive Impairment

Um eine erhöhte Testspezifität zu erlangen, sollte zusätzlich p-Tau quantifiziert werden und in Kombination mit dem internationalen Amyloid-Tau Index (IATI) graphisch dargestellt werden (Hampel, et al., 2004).

Die Graphik in Diagramm 2 repräsentiert die kombinierte Auswertung aller 3 Biomarker in einem zweidimensionalen Format durch Auftragen des p-Tau Wertes auf die x-Achse gegen den IATI auf der y-Achse. Der IATI errechnet sich folgendermaßen.

$$IATI = \beta \text{ Amyloid Konzentration} \div (240 + 1,18 \text{ Tau Konzentration})$$

Eine gesunde Kontrollperson mit einer hohen  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>-Konzentration und einer niedrigen Tau-Konzentration liegt bei einem IATI >1. Eine Person mit einem für die Alzheimerische Erkrankung typischen Biomarkerprofil liegt bei einem IATI <1. Ein IATI =1 entspricht exakt der Diskriminierungslinie der Graphik der kombinierten Auswertung von Tau und  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>. Befinden sich die Konzentrationen im Bereich von „C“ ist dies typisch für AD und der Mild Cognitive Impairment (MCI), welches sich zur AD entwickelt (Hulstaert, et al., 1999), (Riemenschneider, et al., 2002). Somit erlaubt der Test eine frühe Alzheimer-Demenzdiagnostik anhand seiner Sensivität und Spezifität von 90% (Riemenschneider, et al., 2002). Der Bereich „A“ entspricht derer von Gesunden und „B“ derer anderer Demenzformen.

#### 1.4.2.4. Probleme in der Diagnosestellung

Durch die Entwicklung potentiell effektiver, den Krankheitsverlauf ändernder Behandlungen, ist die Notwendigkeit für die Entwicklung effizienter Tests für die Differentialdiagnostik vor allem für frühe Demenzformen dringender denn je. Zu diesem Zweck ist es essentiell, dass diagnostische Prozeduren, Probenverarbeitungen und deren Analyse in den jeweiligen Laboren standardisiert werden.

Selbst wenn ein und dieselbe Probe von verschiedenen Laboren hinsichtlich der auf Demenz hinweisenden Liquorproteine untersucht wurde, sind deutliche Schwankungen in den Ergebnissen festgestellt worden. Diese führten unter anderem zu laborabhängigen verschiedenen Grenzwerten der

Proteinkonzentrationen (Hort, Bartos, Pirtila, & Scheltens, 2010). Diese Varianz ergibt sich aus mehreren Faktoren. Das sind beispielsweise die analysierten erkrankten und gesunden Patienten selber, die Art und Weise, wie und in welchem Krankheitsstadium deren Erkrankung diagnostiziert wurde oder aber auch, wie die Analyse der Liquorproben durchgeführt wurde. Zur Konzentrationsbestimmung der Biomarker existieren bisher keine einheitlichen Bestimmungen. Auch wenn präanalytische Bedingungen oft Gegenstand einiger Studien waren, wurden diese bisher nicht ganzheitlich umgesetzt (Sjögren, et al., 2001), (Kaiser, Schonknecht, Thomann, Hunt, & Schroder, 2007), (Sancesario, et al., 2010), (Le Bastard, De Deyn, & Engelborghs, 2015). Dadurch lassen sich Konzentrationsbestimmungen verschiedener Labore oft nicht miteinander vergleichen, so dass Tests gegebenenfalls wiederholt werden müssen, zu Lasten der Patienten und der Krankenkassen.

Ergebnisse vorangegangener Studien empfehlen das Lagern der Liquorproben in Polypropylenbehältnissen (Schoonenboom, et al., 2005), (Lewczuk, Beck, & Esselmann, 2006) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  (Le Bastard, De Deyn, & Engelborghs, 2015). Unabhängig davon, ob es sich hierbei um eine kurzzeitige oder längerfristige Aufbewahrung handelt. Niedrigere Temperaturen scheinen die Proteinkonzentrationen zu beeinflussen (Sancesario, et al., 2010). Eine Fraktionierung der Proben, d.h. das Vermeiden Lagerung größerer Volumina, sei nicht notwendig (Le Bastard, De Deyn, & Engelborghs, 2015). Jedoch ist darauf zu achten eine zeitliche Verzögerung der Probeneinfrierung so gering wie möglich zu halten (Kaiser, Schonknecht, Thomann, Hunt, & Schroder, 2007).

## **1.5. Fragestellung**

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Beurteilung und Verwendung der auf Demenz hinweisenden Liquorproteine mithilfe von ELISA- Tests leisten.

In zahlreichen Studien ist zu lesen, dass Liquorproben gesammelt, aufbereitet und bis zur Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurden (Le Bastard, De Deyn, & Engelborghs, 2015). Dieses Vorgehen ist oft aus zeitlichen Gründen, aber auch aus finanziellen Gründen notwendig. Die zur Analyse genutzten ELISA- Kits sind teuer und es wäre nicht ökonomisch sie zu verwenden, wenn sie nicht vollständig bestückt sind. Die vorliegende Arbeit untersucht dies anhand des Standardtestes

zur Bestimmung der Biomarker INNOTEST  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>, INNOTEST Phospho-Tau<sub>(181P)</sub> und INNOTEST h-Tau Ag.

Dabei wurde folgenden Fragen nachgegangen:

- 1) Verändern sich die Proteinkonzentrationen während der Einlagerung?  
Ist die Konzentration abhängig von der Einlagerungstemperatur?  
Kann man den eventuellen Veränderung gegensteuern?
- 2) Unterscheiden sich Proteinkonzentrationen verschiedener Demenzformen in Ihrer Quantität und im zeitlichen Verlauf?
- 3) Verändern sich die Proteinkonzentrationen der Biomarker durch wiederholte Auftau- und Einfrierzyklen?

Es ist zu ermitteln, welche Bedeutung der o.g. Liquorproteine und ihrer graphischen Auswertung beigemessen werden sollte.

## 2. Materialien und Methoden

---

### 2.1. Untersuchungsmaterialien

#### 2.1.1. Reagenzien

Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
Dinatriumhydrogenphosphat (Puffer)	Merck, Darmstadt
Flüssiger Stickstoff	
Glycerin	Merck, Darmstadt
InSolution™ $\gamma$ -Secretaseinhibitor IX	Calbiochem, Darmstadt
Natriumacid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat (Puffer)	Merck, Darmstadt
Phosphataseinhibitor Cocktail 3 P0044	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Proteaseinhibitor P2714	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trehalose	Merck Millipore, Schwalbach
Ph-Meter Kalibrationslösungen pH 4,01 und pH 6,8	WTW, Weilheim
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt

#### 2.1.2. Innotest Kits

*Innotest Kit für  $\beta$ -Amyloid<sub>1-42</sub>* Innogenetics, Hannover

Beschichtete Platte	Rahmenhalter mit beschichteten Testvertiefungen
Probenverdünnungspuffer	
Phosphatpuffer	mit stabilisierenden Proteinen und 0,1% MIT / 0,1% CAA als Konservierungsmittel
Konjugat 1	Maus-Anti- $\beta$ -Amyloid IgG, markiert mit Biotin in Phosphatpuffer mit stabilisierenden Proteinen und 0,04% MIT/ 0,1% CAA als Konservierungsmittel
Konjugat 2	Peroxidasemarkiertes Streptavidin mit 0,02% MIT und 0,02% Bromnitrodioxan als Konservierungsmittel.
Konjugatverdünner 1	Phosphatpuffer mit stabilisierenden Proteinen und 0,01% MIT / 0,01% CAA als Konservierungsmittel

Konjugatverdünner 2	Phosphatpuffer mit 0,05% Proclin300 als Konservierungsmittel
Substrat TMB	Tetramethylbenzidin aufgelöst in Dimethylsulfoxid
Substratpuffer	Phosphat-Citrat-Puffer mit 0,02% Wasserstoffperoxid
Stopplösung	0,9N Schwefelsäure
Waschlösung	Phosphatpuffer mit 0,01%MIT / 0,09% CAA
Standard	variable Konzentrationen (80 000- 120 000 pg/ml)
Unbeschichtete Polypropylenplatte	
Klebefolien für Mikrotiterplatten	
Minigrip-Kunststoffbeutel	

*Innotest Kit für Phospho-Tau<sub>(181P)</sub>*

Innogenetics, Hannover

Beschichtete Platte	Rahmenhalter mit beschichteten Testvertiefungen
Probenverdünnungspuffer	
Phosphatpuffer	mit stabilisierenden Proteinen und 0,01% MIT / 0,1% CAA als Konservierungsmittel
Standard	Phospho-Tau <sub>181P</sub> in 100 000 pg/ml
Konjugat 1	biotinyliertes anti-Phospho-Tau <sub>181P</sub> in Phosphatpuffer mit stabilisierenden Proteinen und 0,01% MIT/ 0,1%CAA als Konservierungsmittel
Konjugat 2	Peroxidasemarkiertes Streptavidin mit 0,02% MIT und 0,02%Bromnitrodioxan als Konservierungsmittel.
Konjugatverdünner 1	Phosphatpuffer mit stabilisierenden Proteinen und 0,01%MIT / 0,1%CAA als Konservierungsmittel
Konjugatverdünner 2	Phosphatpuffer mit 0,05% Proclin300 als Konservierungsmittel
Substrat TMB 100x	Tetramethylbenzidin aufgelöst in Dimethylsulfoxid
Substratpuffer	Phosphat-Citrat-Puffer mit 0,006% Wasserstoffperoxid
Stopplösung	0,9N Schwefelsäure
Waschlösung	Phosphatpuffer mit 0,01% MIT und 0,09% CAA als Konservierungsmittel
Klebefolien für Mikrotiterplatten	
Minigrip-Kunststoffbeutel	

Beschichtete Platte	Rahmenhalter mit beschichteten Testvertiefungen
Probenverdünnungspuffer	
Phosphatpuffer	mit stabilisierenden Proteinen und 0,05% Proclin 300 als Konservierungsmittel
Konjugat 1	2 monoklonale Anti-h-Tau-Antikörper, markiert mit Biotin in Phosphatpuffer mit stabilisierenden Proteinen und 0,03% Proclin 300 als Konservierungsmittel
Konjugat 2	Peroxidasemarkiertes Streptavidin mit 0,03% Proclin 300 als Konservierungsmittel.
Konjugatverdünner	Phosphatpuffer mit stabilisierenden Proteinen und 0,03% Proclin 300 als Konservierungsmittel
Substrat TMB	Tetramethylbenzidin aufgelöst in Dimethylsulfoxid
Substratpuffer	Phosphat-Citrat-Puffer mit 0,02% Wasserstoffperoxid
Waschlösung	Phosphatpuffer mit 0,15% Proclin 300
h-TAU Standard	lyophilisiertes rekombinantes h-TAU Standard
Klebefolien für Mikrotiterplatten	
Minigrip-Kunststoffbeutel	

### **2.1.3. Geräte**

Sunrise Absorbance Reader Photometer	Tecan, Crailsheim
Washer CM Columbus	Tecan, Crailsheim
Kern 770-60 Elektronische Analysewaage	Kern, Balingen
Knick pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Test Tube Thermostat TCR 100 Heizung	Carl Roth, Karlsruhe
Zentrifuge Heraeus Multifuge 1 S&R	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Reagenzglasschüttler CAT Typ VMV2	Staufen
Kühlschrank +4°C	Bosch, Gerlingen
Tiefkühlschrank -20°C	Liebherr, Bulle
Tiefkühlschrank -80°C Profiline Taurus PLTA 0986	National Lab GmbH, Mölln

#### 2.1.4. Hilfsmittel und Einmalartikel

Eppendorf Reference-Pipetten 10-1000 $\mu$ l	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen Ultratip 100-1000 $\mu$ l	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Pipettenspitzen Ultratip 10-100 $\mu$ l	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Pipettenspitzen ultratip ep T.I.P.S. 0,1- 10 $\mu$ l	Eppendorf, Hamburg
Multiply-Pro 0,2ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nürnberg
Mikro-Röhren 0,5ml PP	Sarstedt, Nürnberg
Mikro-Röhren 1,5ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nürnberg
Schutzgefäß Polypropylen $\varnothing$ 30mm mit Schraubverschluss	Sarstedt, Nürnberg
Reagenzröhren PP 13ml mit Eindrückstopfen	Sarstedt, Nürnberg
Reagenzröhren PP 10ml mit Eindrückstopfen	Sarstedt, Nürnberg
Einmalhandschuhe Vinyl 2000 PF	Meditrade, Kiefersfelden
Laborwecker	

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Votum der Ethik-Kommission

Nach Antragstellung der Studie zur Quantifizierung von Tau, Phospho- Tau und  $\beta$ -Amyloidfragmenten zur Diagnostik von Demenzerkrankungen durch Herrn Prof. Dr. med. Moser und Herrn Prof. Dr. med. Kömpf wurde dieser im Dezember 2009 durch die Ethik- Kommission der Universität zu Lübeck statt gegeben. Das Votum der Kommission ist dem Anhang (Kapitel 7.2.) beigelegt.

### 2.2.2. Patienten

Die Patienten unterlagen in Alter und Geschlecht keinerlei Beschränkungen. Die Teilnehmer wurden während Besuchen in der neurologischen Ambulanz oder während stationären Aufenthalten rekrutiert und aufgeklärt. Alle gaben ihr Einverständnis zur Verwendung ihrer Liquorproben. Die Diagnosen der Alzheimer Demenz (AD), frontotemporalen Demenz (FTD) und Lewy-Körperchen Demenz (LBD) basierten auf aktuellen internationalen klinischen Kriterien (Mc Kaan, et al.,

1984), (Mc Khann, et al., 2001), (Mc Keith, et al., 2000). Bei allen in die Untersuchung eingeschlossenen AD-, FTD- und LBD-Patienten war zum Zeitpunkt der Probenentnahme die Diagnose gestellt und eine spezifische Behandlung eingeleitet. Die laufende Therapie wurde durch die Probenentnahme weder behindert noch beeinträchtigt. Ausschlusskriterien für die Kontrollpatienten der Experimentreihe A und D waren jegliche Art von Schädel-Hirn-Traumen, entzündliche neurologische Prozesse oder demenzielle Erkrankungen.

#### **2.2.2.1. Aufklärung der Patienten**

Alle Patienten wurden über das Ausmaß der Untersuchung aufgeklärt und gaben ihr mündliches Einverständnis zur wissenschaftlichen Auswertung ihrer Daten und des Probenmaterials. Für die Patienten der Universitätsklinik Schleswig-Holstein Campus Lübeck wurde der Aufklärungsbogen genutzt, der dem Anhang (Kapitel 7.1.) beigelegt ist.

Alle Probanden wurden zudem dahingehend informiert, dass die Resultate der Aufarbeitung ihrer Liquorproben dem Vergleich mit denjenigen anderer Patienten diene, aber für sie selbst keine Auswirkungen haben werde.

#### **2.2.3. Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials**

Das gewonnene Probenmaterial wurde in 4 verschiedenen Experimentreihen genutzt und aufgeteilt. Diese werden im nachfolgenden Text Experimentreihe A-D benannt.

##### **2.2.3.1. Lumbalpunktion**

Die Entnahme des Liquors wurde am sitzenden Patienten mit maximal gebeugten Rücken durchgeführt. Nach großflächiger dreifacher Hautdesinfektion und gegebenenfalls einer interspinalen Lokalanästhetikagabe, wurde der Interspinalraum von L3/L4 oder L4/L5 mit einer Spinalkanüle mit Quincke-Schliff punktiert (Braun & Dormann, 2010, S. 39). Die mit einem sehr viel höheren Komplikationsrisiko belastete Subokzipitalpunktion wurde nicht angewendet. Diese

findet Anwendung, wenn Verdacht auf eine Meningitis besteht, lumbal kein Liquor erhältlich ist oder eitrige Prozesse in der Lumbalregion eine Lumbalpunktion verbieten. Die Lumbalpunktion wird meist am sitzenden, eventuell auch am liegenden Patienten unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Erhöhter Hirndruck stellt die wichtigste Kontraindikation dar. Vor jeder Liquorpunktion sollte deshalb der Augenfundus nach einer Stauungspapille untersucht werden. Bei einer Thrombozytopenie unter 5000/ml darf keine Lumbalpunktion durchgeführt werden. Bei Thrombozytopenien unter 20.000/ml und bei Antikoagulierten muss die Indikation sehr streng gehandhabt werden. Komplikationen durch eine Lumbalpunktion sind insgesamt selten (Peskind, et al., 2005). Bei einer intrakraniellen Raumforderung mit erhöhtem Hirndruck kann es nach einer Liquorentnahme zu einer Einklemmung von Hirnabschnitten im Tentoriumsschlitz oder im Foramen occipitale magnum kommen. Bei einer intraspinalen Raumforderung kann eine Verschlechterung einer vorbestehenden Querschnittssymptomatik resultieren. Das ständige Nachsickern von Liquor durch den Einstichkanal im Durasack kann zu einem Liquorunterdruck-Syndrom mit orthostatischem Kopfschmerz führen. Weitere mögliche Folgen einer Liquorpunktion sind eine iatrogene Infektion oder ein Hämatom im Epiduralraum, das ein Kauda-Syndrom nach sich ziehen kann (Mumenthaler & Mattle, 2006, S. 84-86).

#### **2.2.3.2. Experimentreihe A und B**

Die Gewinnung des Probematerials erfolgte jeweils zwischen 8 und 13 Uhr im Mai 2011 und Oktober 2011. Ob die Patienten nüchtern waren oder bereits gegessen hatten, konnte außer Acht gelassen werden, da dies nachweislich keinen Einfluss auf die Konzentration der zu messenden Liquorproteine hat (Vanderstichele, Bibl, et al. 2012). Die Punktion wurde mit einer 19G Spinalnadel von Becton Dickinson (BD) durchgeführt. Der Liquor wurde in Reagenzröhren aus Polypropylen von Sarstedt® aufgefangen. Die ausschließliche Verwendung von Polypropylengefäßen ist unabdingbar, da bekannt ist, dass sich  $\beta$ -Amyloid an die Reaktionsgefäßwand anlagert und somit eine falsch niedrige Konzentration gemessen wird (Bjerke, et al., 2010). Nach der Punktion, die in diesen Fällen stets atraumatisch erfolgte, d.h. es waren makroskopisch keine Verunreinigungen mit

Blut zu erkennen, wurden die Proben in einer Styroporbox auf Eis bei +4°C zwischengelagert. Innerhalb von 2 Stunden wurden die Proben mit der Heraeus Multifuge 1 S&R einzeln bei 4000g, +4°C für 10 min zentrifugiert.

### **2.2.3.3. Experimentreihe C und D**

Alle Proben, die uns die Universitätsklinik Magdeburg und die Klinik für Neurologie Neustadt bereitgestellt hatten, wurden spätestens 30 min nach Punktion verarbeitet. Der Liquor wurde bei 14000 U/min für 10 min mit einer Eppendorf Tischzentrifuge 5417R zentrifugiert und anschließend bei -80°C eingelagert. Für die routinemäßige Ermittlung von Zellzahl, Laktat und Eiweißstatus wurde direkt nach der Zentrifugation die benötigte Menge abgenommen und analysiert. Standardmäßig ist der Liquor ausschließlich in Reagenzgefäßen aus Polypropylen aufgefangen, zentrifugiert und eingelagert worden.

### **2.2.4. Versuchsabläufe der einzelnen Experimentreihen**

Die Analyse der Biomarker  $\beta$ -Amyloid(1-42), Phospho-Tau(181P) und h-Tau wurde mit dem entsprechenden Innotest Kit von Innogenetics® durchgeführt. Zur Waschung der Proben während der Analysen, kam der Washer CM Columbus von TECAN® zum Einsatz. Die photometrische Bestimmung der Proteine geschah mit dem ELISA Reader von TECAN® bei einer Absorptionsrate von 450nm, einer Referenzwellenlänge von 620nm und einer Schütteldauer von 5 min. Für jedes Protein wurde eine Dreifachbestimmungen angefertigt. Wenn Proben eingefroren waren, wurden die Aliquots am Tag der Analyse aus dem Tiefkühlschrank beziehungsweise aus dem Kühlschrank entnommen und bei Raumtemperatur langsam aufgetaut. Die weitere Verarbeitung fand erst statt, nachdem sich der Liquor selbstständig in den flüssigen Aggregatzustand zurück versetzt hatte.

### 2.2.4.1. Experimentreihe A

Am 18. Mai 2011 wurde der Liquor in der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, von 5 Patienten gewonnen. Durch den zuvor festgelegten Versuchsaufbau war das benötigte Zielvolumen des Liquor bekannt. Hierfür war das Poolen von 5 Liquorproben letztendlich ausreichend.

2 Patienten waren zum Zeitpunkt stationär in Behandlung, 3 Patienten in ambulanter Behandlung. Von den 5 Patienten waren 3 weiblich und 2 männlich. Das Durchschnittsalter betrug 51,2 Jahre (Median 63 Jahre). Die Punktionen fanden im Rahmen der Diagnostik für den dortigen Aufenthalt statt. Es waren zu diesem Zeitpunkt weder neurodegenerative Erkrankungen bekannt, noch lagen Anhaltspunkte für eine Erkrankung dieser Art vor.

Der Liquor wurde ausschließlich für die Quantifizierung der Liquorproteine  $\beta$ -Amyloid (1-42), Gesamt-Tau und Phospho-Tau (181) genutzt. Andere Laborparameter sind im Rahmen dieses Versuches nicht bestimmt worden. Nach der Zentrifugation wurden die einzelnen Liquores gepoolt, mit unten beschriebenen Zugaben versetzt und in die Mikro-Röhren 1,5ml von Sarstedt® aliquotiert. Anschließend fand eine erstmalige Bestimmung der Biomarker  $\beta$ -Amyloid(1-42), Phospho-Tau(181P) und Gesamt-Tau statt, welche im Weiteren als Nullwerte der Proben I bis VI bezeichnet werden. Im Anschluss wurde das verbleibende Probenmaterial bei +4°C, -20°C oder -80°C eingelagert. Die Analysen wurden an Tag 5, Tag 20, Tag 90 und für Probe I zusätzlich an Tag 140 wiederholt.

Ziel des Versuches war es die Konzentrationsentwicklung der Liquorproteine unter verschiedenen Lagerungsbedingungen über einen längeren Zeitraum darzustellen. Zudem wurde versucht auf die Proteinkonzentration durch Zugabe verschiedener Reagentien Einfluss zu nehmen.

Probe I bestand ausschließlich aus dem gepoolten Liquor, so dass pro Reaktionsgefäß 525 $\mu$ l Liquor enthalten waren. Insgesamt konnten 12 Reaktionsgefäße entsprechend befüllt werden.

Probe II-VI wurde ein Dinatrium-Hydrogenphosphat- / Natriumdihydrogenphosphat-Puffer von Merck® pH 7,4, 250mM zugegeben. Der Liquor wurde im Verhältnis 1:10 gepuffert. Pro Reaktionsgefäß wurden somit

525µl Liquor mit 58,3µl Puffer verdünnt. Probe II ergab 10 Reaktionsgefäße zu je 583,3µl.

Probe III wurde zusätzlich Natriumacid von Sigma-Aldrich® im Verhältnis 1:100 zugefügt, somit war eine Zugabe von 5,89µl Natriumacid notwendig. Dies ergab 7 Reaktionsgefäße mit je 589,19µl Liquor-Puffer-Natriumacid-Gemisch.

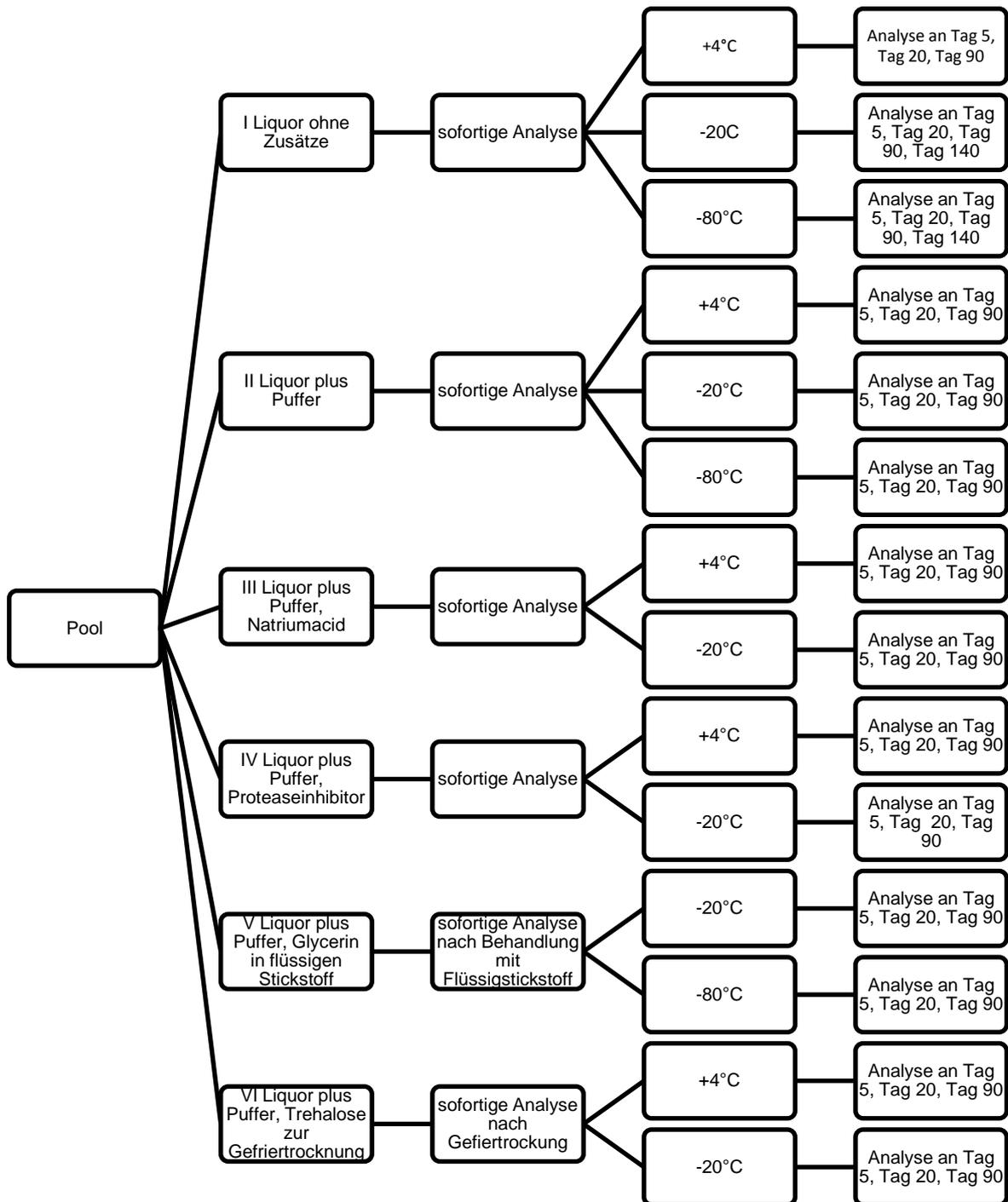
In Probe IV kam der Proteaseinhibitor P2714 von Sigma-Aldrich® zum Einsatz. Je 583µl Liquor-Puffer-Gemisch wurden 5,89µl Proteaseinhibitor zugegeben. Daraus ergaben sich ebenfalls 7 Reaktionsgefäße zu jeweils 589,19µl.

Probe V wurde initial mit Puffer und Glycerin verdünnt und mittels Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Menge des hinzugegebenen Glycerin entsprach 5% des Liquor-Puffer-Gemisches und betrug damit 30,7µl. Schließlich wurden 7 Reaktionsgefäße zu je 614µl Gemisch kurz in flüssigen Stickstoff gehalten.

Die Gefriertrocknung unter Einsatz von Trehalose von Merck Millipore® wurde bei Probe VI angewendet. Da dieser Prozess über Nacht ablief, konnte die Erstanalyse erst am nächsten Morgen durchgeführt werden. Die Trehalose wurde 50mM Konzentration während der Gefriertrocknung hinzugefügt. Zur Analyse eines der 7 Reaktionsgefäße, wurde das Pulver mit 525µl, 25mM Pufferlösung wieder gelöst.

(Die o.g. Probenbezeichnungen „I-VI“ werden im nachfolgenden Text stets weiterverwendet.)

Abbildung 2 verdeutlicht den genauen Versuchsablauf nochmals graphisch.

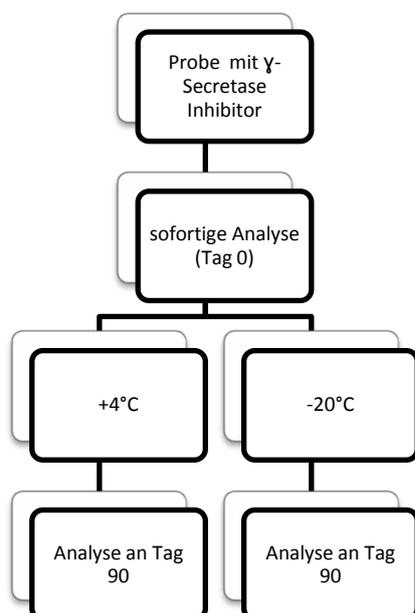


**Abbildung 2:** Versuchsanordnung der Experimentreihe A

#### 2.2.4.2. Experimentreihe B

Für diesen Versuch wurde am 28. Oktober 2011 eine 77-jährige Patientin in der neurologischen Ambulanz des UKSH Lübeck punktiert. Bei ihr waren zu diesem Zeitpunkt keine neurodegenerativen Erkrankungen bekannt.

Für Versuchsreihe B wurde der frisch- aufbereitete Liquor für ein Experiment mit einer  $\gamma$ -Secretase aufgeteilt. Für die Experimentreihe wurden 2 Reaktionsgefäße zu je 525 $\mu$ l Liquor abgefüllt. Der Probe wurde der InSolution™  $\gamma$ -Secretase Inhibitor IX hinzugefügt. Der  $\gamma$ -Secretase Inhibitor sollte in einer 1:1000 Verdünnung angewendet werden, so dass pro 525 $\mu$ l Reaktionsgefäß 0,525 $\mu$ l Inhibitor zugesetzt wurden. Nach Zusatz des Inhibitors wurde die Probe homogen vermischt. Anschließend fand eine Sofortanalyse der Biomarker statt (Tag 0). Danach wurden die verbleibenden Reaktionsgefäße bei +4°C und -20°C für 90 Tage eingelagert. Nach Ablauf der 90 Tage wurden die Proteine  $\beta$ -Amyloid(1-42), Phospho-Tau(181P) und h-Tau erneut bestimmt.

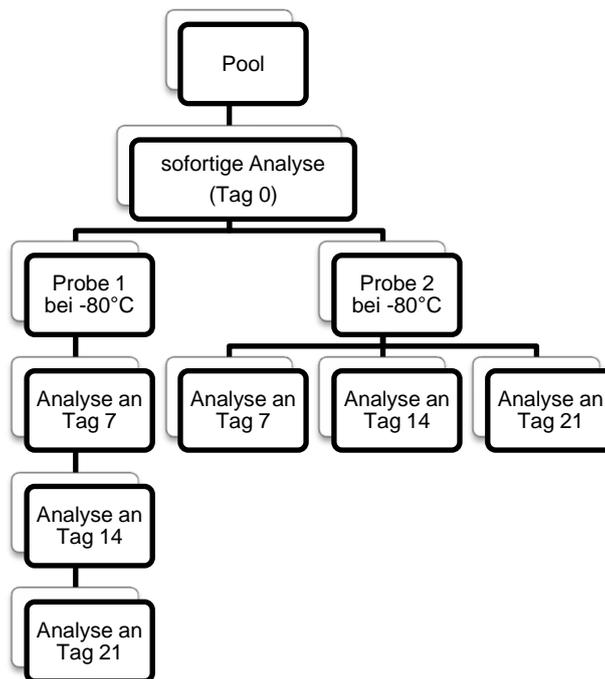


**Abbildung 3:** Versuchsanordnung der Experimentreihe B

### 2.2.4.3. Experimentreihe C

Der Liquor dieser Versuchsreihe wurde uns von PD Dr. Ansgar Thümen der Fachklinik für Neurologie in Neustadt freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Es wurden Proben von 5 Alzheimer Demenz (AD) - Patienten verwendet. 3 dieser Patienten waren weiblich und 2 männlich. Das Durchschnittsalter lag bei 77,4 Jahren (Median 77 Jahre). Die Punktionen fanden im Zeitraum von Februar 2011 bis August 2011 statt.

Das Liquormaterial wurde zur Pool-Bildung genutzt. Bei Raumtemperatur tauten die Proben auf und sind anschließend gepoolt und homogen vermischt worden. Nachfolgend konnten die Proteinkonzentrationen der Biomarker bestimmt werden. Die Ergebnisse wurden Tag 0 zugeordnet. Das gesamte Material ist danach für 2 verschiedene Versuchsabläufe in Probe 1 und Probe 2 aufgeteilt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren worden. Dreimal, im Abstand von 7 Tagen wiederholte sich die Quantifizierung beider Proben (Tag 7, Tag 14, Tag 21). Probe 1 wurde dabei zu jeder wöchentlichen Analyse vollständig aufgetaut und bis zur nächsten Bestimmung erneut eingefroren. Probe 2 hingegen, wurde in kleinere Reagenzgefäße aliquotiert, so dass immer nur die zur Analyse benötigte Menge Liquor aufgetaut werden musste. Dieser Versuch vergleicht die Proteine der Proben, die vier Auftau-Einfrier-Zyklen mitgemacht hatten (Probe 1) mit Proben, die nach Erstanalyse keiner erneuten Kühlkettenunterbrechung unterlagen (Probe 2).



**Abbildung 4:** Versuchsanordnung der Experimentreihe C

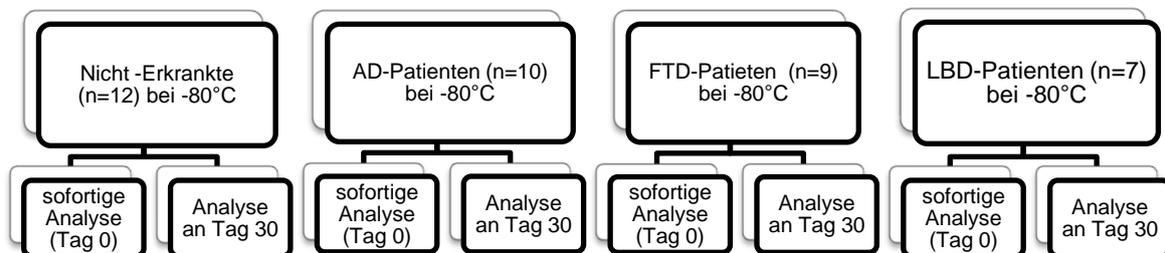
#### 2.2.4.4. Experimentreihe D

Experimentreihe D wurde zum Vergleich zu Experimentreihe A entwickelt. Mit der Absicht beziehungsweise der Fragestellung, ob sich die Liquorproteine von erkrankten Patienten gleichartig im Konzentrationsverlauf darstellen und wiefern sie sich zwischen den Krankheitsentitäten unterscheiden.

Der Liquor wurde uns für diesen Zweck freundlicherweise vom Liquor-Labor der Universitätsklinik in Magdeburg zur Verfügung gestellt. Die Punktionen zur Liquorgewinnung fanden zwischen Oktober 2009 und August 2012 statt. Insgesamt wurden uns 38 Liquorproben überlassen. Im Einzelnen erhielten wir 10 Liquorproben von Patienten mit Alzheimer Demenz (AD), 9 Proben von Patienten mit einer diagnostizierten frontotemporalen Demenz (FTD), 7 Proben von Patienten mit einer Lewy-Körperchen Demenz (LBD) und 12 Proben von Patienten ohne neurodegenerative oder neuroentzündliche Erkrankungen. Von den an AD erkrankten Patienten waren 6 Probanden weiblich und 4 Probanden männlich. Das Durchschnittsalter betrug 76,1 Jahre (Median 79 Jahre). 5 weibliche und 4 männliche Patienten litten unter einer FTD. Das Durchschnittsalter dieser Probanden lag bei 62,1 Jahren (Median 63 Jahre). Die an LBD erkrankten Patienten teilten sich in 1 weibliche und 6 männliche Probanden auf. Das Durchschnittsalter lag hier bei 76,1 Jahren (Median 77 Jahre). Die Proben der Patienten ohne neurodegenerative oder neuroentzündliche Erkrankungen stammen von 4 weiblichen und 8 männlichen Probanden. Das mittlere Alter lag bei 68,1 Jahren (Median 70 Jahre).

Die neurologische Klinik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg stellte uns 2 Reaktionsgefäße zu je 1ml Liquor zur Verfügung. Gewonnen von einem Patienten während einer Lumbalpunktion. Bis zum Abruf lagerten die Proben bei -80°C. Die Liquores wurden uns auf Anforderung, über Nacht via Expressversand geliefert. Während des Versandes waren die Proben auf Trockeneis, bei einer ungefähren Temperatur von -74°C gelagert. Da ein konstantes Temperaturniveau während des Transportes auf diese Weise nicht sichergestellt werden konnte, muss man hier von einer Unterbrechung der Kühlkette ausgehen. Von einer Veränderung des Probenmaterials muss hingegen nicht ausgegangen werden, da unterschiedliche Studien nachweisen konnten, dass ein einmaliges Auftauen von

- 80°C und gegebenenfalls erneutes Einfrieren keinen Einfluss auf die Konzentration der Liquorproteine hat (Vanderstichele, Bibl, et al. 2012), (Le Bastard, De Deyn, & Engelborghs, Importance and Impact of Preanalytical Variables on Alzheimer Disease Biomarker Concentrations in Cerebrospinal Fluid, 2015). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden wiederholt auch zwei Reagenzgefäße eines Patienten gleichzeitig versendet. Da in diesem Fall nur eine Probe zur Analyse benötigt wurde, ist die zweite jeweils wieder bei -80°C eingelagert worden. Diese Unterbrechung der Kühlkette, betraf 2 Proben von Nicht-Erkrankten Patienten, 9 der FTD-Patienten, 7 der LBD-Patienten und 4 der AD-Patienten (n=22). Die restlichen 16 Proben wurden in 2 zeitversetzten Sendungen übermittelt. Nach Ankunft der Proben in unserem Labor, sind die Liquores bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend analysiert worden. Die Analyse beinhaltete die Bestimmung der Konzentrationen der Proteine  $\beta$ -Amyloid(1-42), Phospho-Tau(181P) und Gesamt-Tau. Dieser Zeitpunkt wurde als Tag 0 beziehungsweise als Tag x bezeichnet. Genau 30 Tage später ist die zweite Probe der Liquores analysiert worden, das entspricht Tag x+30. Das in Abbildung 3 dargestellte Diagramm veranschaulicht diesen Ablauf nochmals.



**Abbildung 5:** Versuchsanordnung der Experimentreihe D (Abkürzungen: n: Anzahl)

### **2.2.5. Gefriertrocknung**

Die Gefriertrocknung, welche in der Experimentreihe A, Probe VI Anwendung findet, wurde freundlicherweise von Dr. Jeroen R. Mesters aus dem Institut für Biochemie der Universität zu Lübeck durchgeführt.

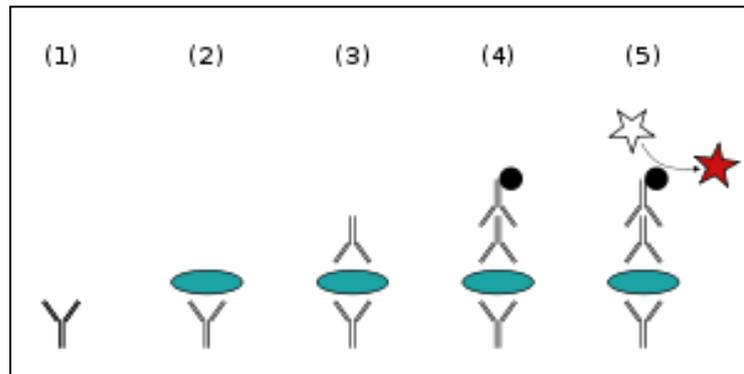
### **2.2.6. Enzyme- linked- immunosorbent assay (ELISA)**

Der von uns verwendete ELISA stammte von der Firma Innogenetics®, seit 2010 über Fujirebio Europe erhältlich. Das Unternehmen bietet jeweils ein INNOTEST® Kit zur Detektion der Proteine  $\beta$ -Amyloid<sub>(1-42)</sub>, Phospho-Tau<sub>(181P)</sub> und hTau-Ag an. Diese funktionieren nach dem Prinzip eines Sandwich-ELISA's.

Ein Sandwich-ELISA quantifiziert ein Antigen durch Bindung zweier verschiedener spezifischer Antikörper, dem sogenannten Capture- und dem Detection-Antikörper. Das zu messende Antigen muss mindestens 2 antigene Epitope besitzen, welche in der Lage sind Antikörper zu binden. Die im Sandwich-ELISA verwendeten Antikörper sind entweder monoklonal oder polyklonal. Monoklonale Antikörper erkennen ein einzelnes Epitop, was somit eine sehr genaue Detektion und Quantifizierung kleiner unterschiedlicher Antigene ermöglicht. Polyklonale Antikörper werden oft als Capture- Antikörper eingesetzt, um so viel wie möglich Antigene zu binden. Der Vorteil eines Sandwich- ELISA ist, dass die zu analysierende Probe vorher nicht aufbereitet bzw. gereinigt werden muss und der Test sehr sensitiv ist.

Alle INNOTEST® Kits sind in ihrem Ablauf identisch, abgesehen von den jeweiligen spezifischen Antikörpern. Die jeweiligen Proteine werden als erstes durch monoklonale Antikörper, wie dem AT 120, HT7 und dem 21F12, nach Zugabe des Liquors gebunden. Nach einer vorgeschriebenen Inkubationszeit werden die Detektor- Antikörper (biotinylierte monoklonale Antikörper, wie HT7bio und BT2bio, 3D6bio, AT270) dazu gegeben. Die biotinylierten Antikörper zeichnen sich aus durch ihre außergewöhnlich hohe Affinität zu Streptavidin. Zwischen jeden der einzelnen Schritte werden die Proben mit einer milden Lösung gewaschen, um unspezifische Proteine oder nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Der bisher entstandene Antigen- Antikörper Komplex wird nun durch

ein mit Peroxidase markiertes Streptavidin Peptid detektiert und gebunden. Nach Zugabe einer Lösung, entwickelt diese durch eine enzymatische Reaktion der Peroxidase eine Farbe. Die Farbintensität ist nun Anhaltspunkt für den Konzentrationsgehalt des jeweiligen Proteins. Diese wird im Anschluss photometrisch ermittelt. Die unten aufgeführte Grafik verdeutlicht die Funktionsweise nochmals (Quelle: Innogenetics Handbuch).



**Abbildung 6:** Funktionsweise des Sandwich-ELISA (<http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/sandwich-elisa>)

### 2.3. Statistik

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Programm SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), Version 20.

Die Darstellung der Werte erfolgte mit Hilfe von Tabellen, Graphiken und Diagrammen des Tabellenkalkulationsprogrammes Microsoft Excel 2007 und GraphPad Prism, Version 4.03.

Für Experimentreihe B, C und D wurden die gemittelten Konzentrationswerte initial auf eine vorliegende Normalverteilung überprüft. Dies geschah mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests. Dieser Test wurde gewählt, da er sich auch für kleinere Fallzahlen gut eignet. Anschließend wurde die Homogenität der Varianzen geprüft. Dafür wurden die Mittelwerte der Proteinkonzentrationen innerhalb und zwischen den verschiedenen Krankheitsbildern untersucht. Für

diesen Zweck wurde die einfaktorielle Varianz-Analyse genutzt (englisch: analysis of variance, „ANOVA“).

Es folgte die Signifikanztestung. Als statistisch signifikant wurden Testwerte angesehen, für deren Eintreten die Wahrscheinlichkeit bei kleiner 5% lag ( $p < 0,05$ ). Für den Vergleich von unabhängigen Stichproben, d.h. Konzentrationswerte von 2 unterschiedlichen Erkrankungen (beispielsweise Alzheimer Demenz und frontotemporaler Demenz), wurde folgendes Verfahren angewendet: Ist keine Varianzhomogenität nachzuweisen, wurde der Welch-Test angewendet. Dieser eignet sich für den Vergleich zweier normalverteilter unabhängiger Stichproben. Im Falle einer bestehenden Varianzhomogenität und Normalverteilung fand der t-Test nach Student Anwendung.

Für die Signifikanztestung zweier verbundener und normalverteilter Stichproben wurde der Differenzen-t-Test verwendet, d.h. wenn beispielsweise Tag x und Tag x+30 einer Erkrankung miteinander verglichen werden sollten. Der Wilcoxon- Test wurde bei nicht- normalverteilten Stichproben angewendet.

### **3. Ergebnisse**

---

#### **3.1. Experimentreihe A und B**

Zur besseren Übersicht sind die Diagramme auf der x-Achse logarithmisch zur Basis 2 ( $\log_2$ ) und auf der y-Achse linear dargestellt. Werden Proben verglichen, das heisst die „Probe- ohne- Substanz“, wird stets auf den Verlauf und die Zahlenwerte der Probe I Experimentreihe A bei gleicher Lagerungstemperatur Bezug genommen.

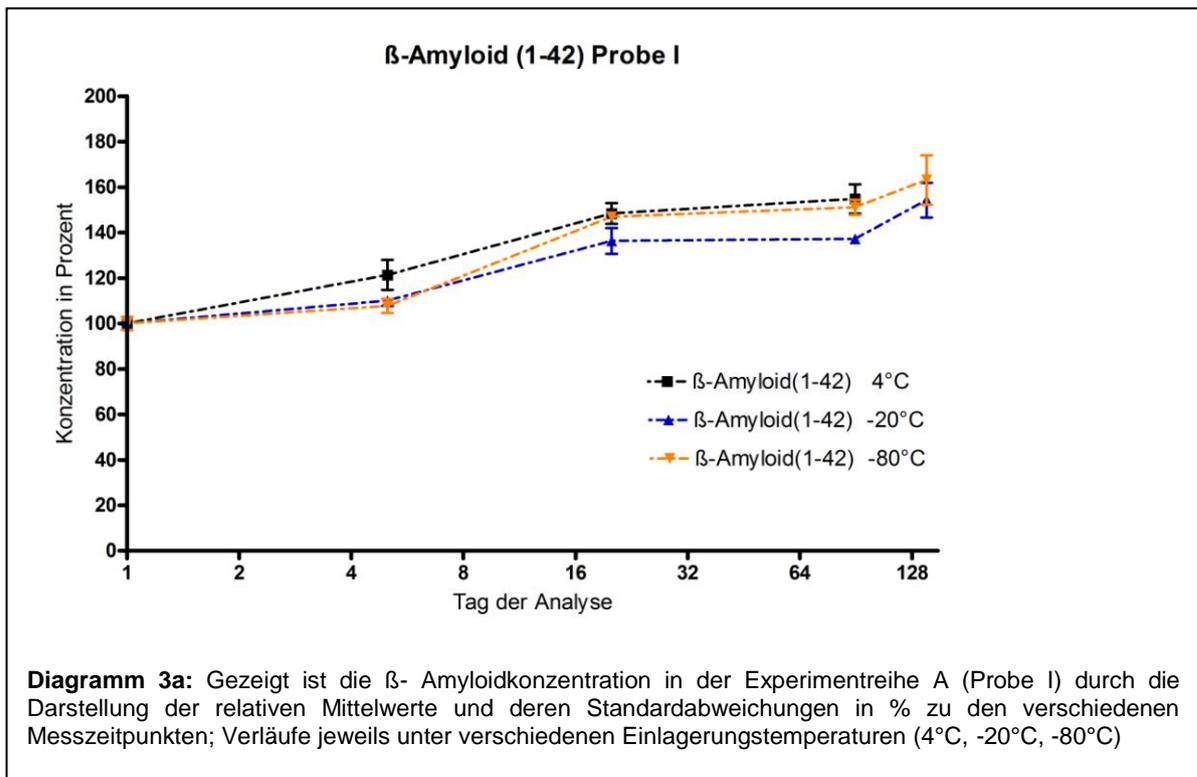
Das in dieser Arbeit gemessene Tauprotein (h-Tau) umfasst das gesamte, also das phosphorylierte sowie das nicht- phosphorylierte Tauprotein. Zudem findet die spezifische Quantifizierung des Phospho- Tau (p-Tau) statt, welches an Threonin 181 phosphoryliert vorliegt. Alle im Text erwähnten Ergebnisse entsprechen den relativen Biomarker- Konzentrationen (%)  $\pm$  relativen Standardabweichung (%). Der Mittelwert wurde aus der dreifachen Bestimmung der Proteinkonzentrationen ermittelt.

Für Experimentreihe A werden die Ergebnisse der Proben I, III, IV, V in verschiedenen Lagerungstemperaturen im folgenden detailliert aufgeführt. Eine Darstellung der relativen Proteinkonzentrationen und deren relativen Standardabweichung der übrigen Proben, ist im Anhang (Kapitel 7.3.) aufgeführt. Diese Werte zeigten keine erwähnenswerten Veränderungen und signifikante Effekte auf, so dass sie in Tabellenform kurz dargestellt werden.

### 3.1.1. Experimentreihe A: Probe I (Liquor ohne Zusätze)

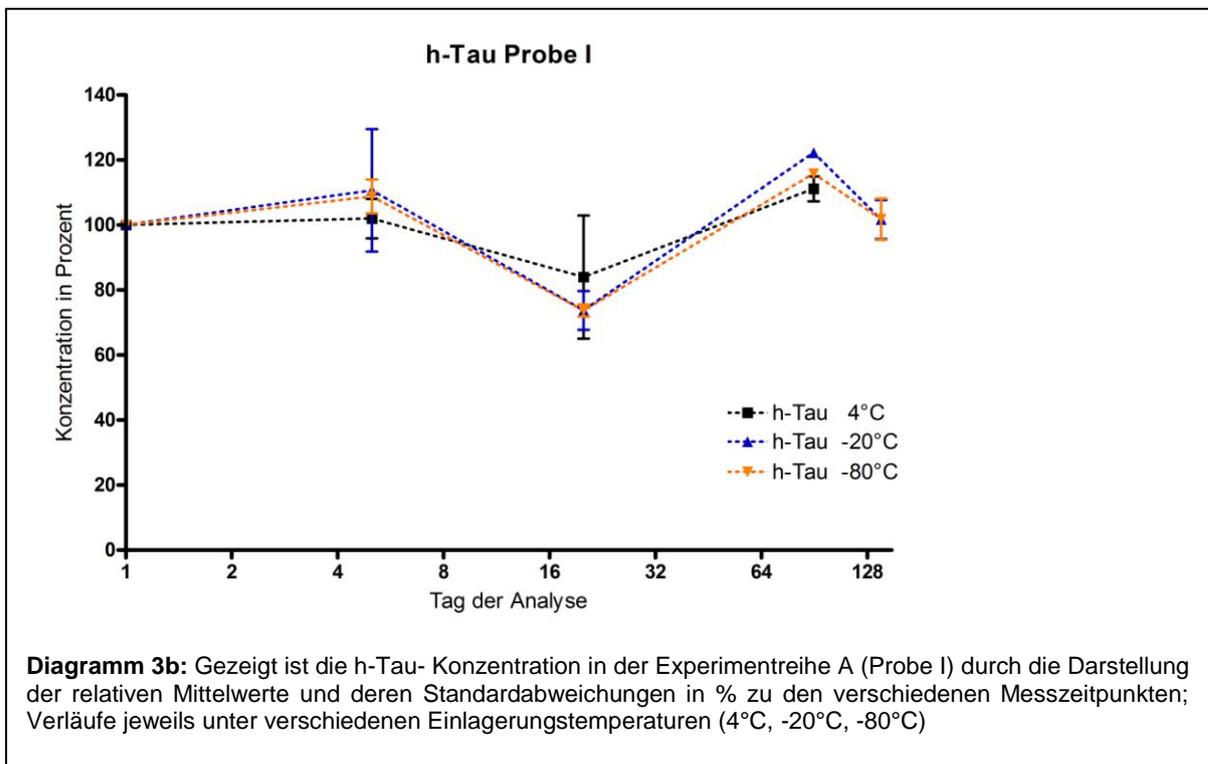
#### $\beta$ -Amyloid (1-42)

Der Verlauf der Konzentration des  $\beta$ -Amyloidproteins(1-42) ( $A\beta$ ) ohne Zusätze ist im Diagramm 3a dargestellt. Ausgangswert aller Graphen ist die gemessene Konzentration an Tag 0, angenommen als 100 %-Wert zum besseren Vergleich mit den folgenden Konzentrationen. Dieser entsprach beim  $A\beta$ -Protein 723,56 pg/ml ( $\pm 21,01$  pg/ml). Die Liquorprobe, welche bei 4°C eingelagert wurde, erfährt einen kontinuierlichen Konzentrationsanstieg. Dieser zeigt bei Tag 90 sein Maximum mit 154,78% ( $\pm 6,42\%$ ). Die -20°C- Probe, wie auch die Liquorprobe von -80°C haben einen ähnlichen Verlauf, die bei Tag 140 ihren maximalen Wert erreichen. Für die -20°C- Probe entspricht das 154,29% ( $\pm 7,65\%$ ) und der Probe bei -80°C 163,14% ( $\pm 10,83\%$ ). Alle drei Graphen stellen eine kontinuierliche, temperaturunabhängige Konzentrationszunahme von  $\beta$ -Amyloid (1-42) im untersuchten Zeitintervall von maximal 140 Tagen dar.



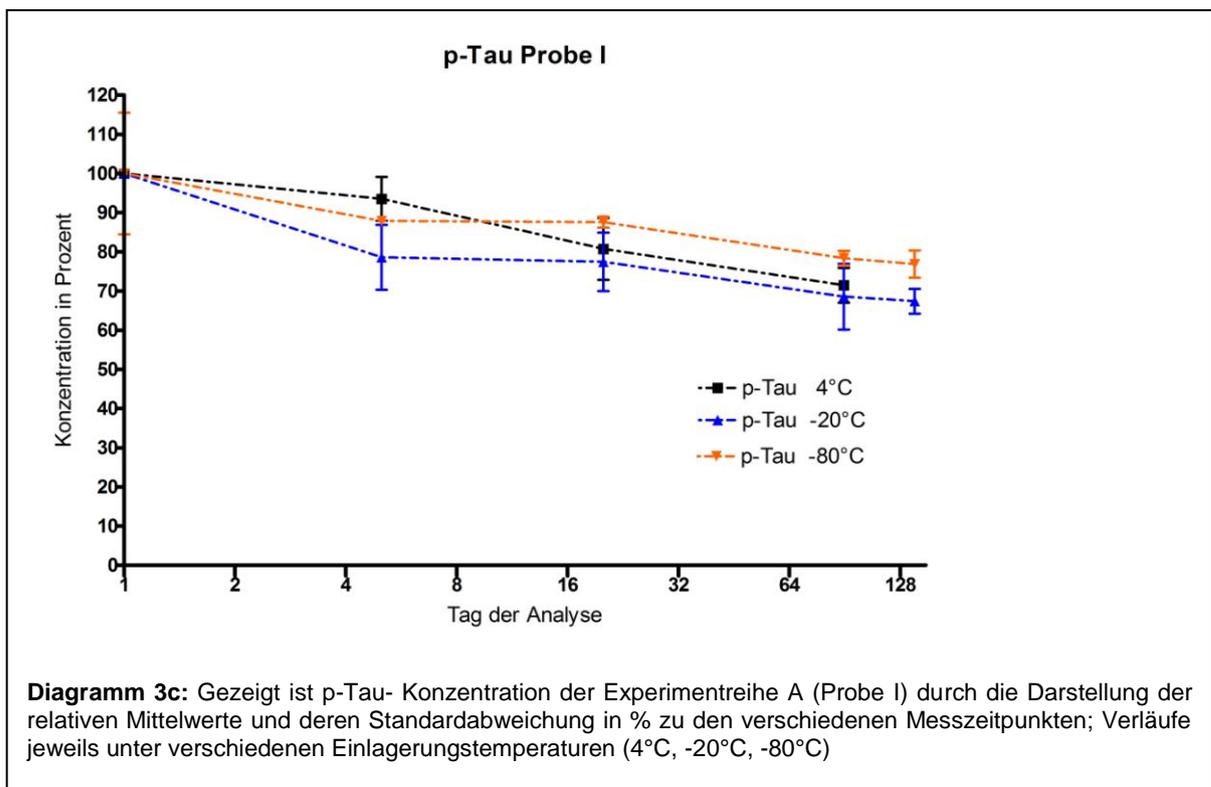
### Gesamt-Tau (h-Tau)

Für Probe I wurde im Liquor das h-Tau-Protein im Zeitverlauf ohne Zusätze bei den Lagerungstemperaturen 4°C, -20°C und -80°C beobachtet (Diagramm 3b). Die initial gemessene Konzentration betrug 233,67 pg/ml ( $\pm 2,52$  pg/ml). Für das h-Tau-Protein ist ein temperaturunabhängiger, stetig schwankender Verlauf über einen Zeitraum von maximal 140 Tagen zu verzeichnen. An Tag 5 sind leichte Konzentrationsanstiege zu sehen, welche an Analysetag 20 aber wieder auf das niedrigste Niveau von 73,70% ( $\pm 1,86\%$ ) bei -80°C absinken. 122,28% ( $\pm 0,84\%$ ) ist der Maximalwert für das Protein an Tag 90 bei -20°C. An Tag 140 pendeln sich die Konzentrationen wieder um ihren Ausgangspunkt ein. Die Proben aus den drei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen haben im Rahmen ihrer Standardabweichung einen ähnlichen Verlauf.



## Phospho-Tau 181 (p-Tau)

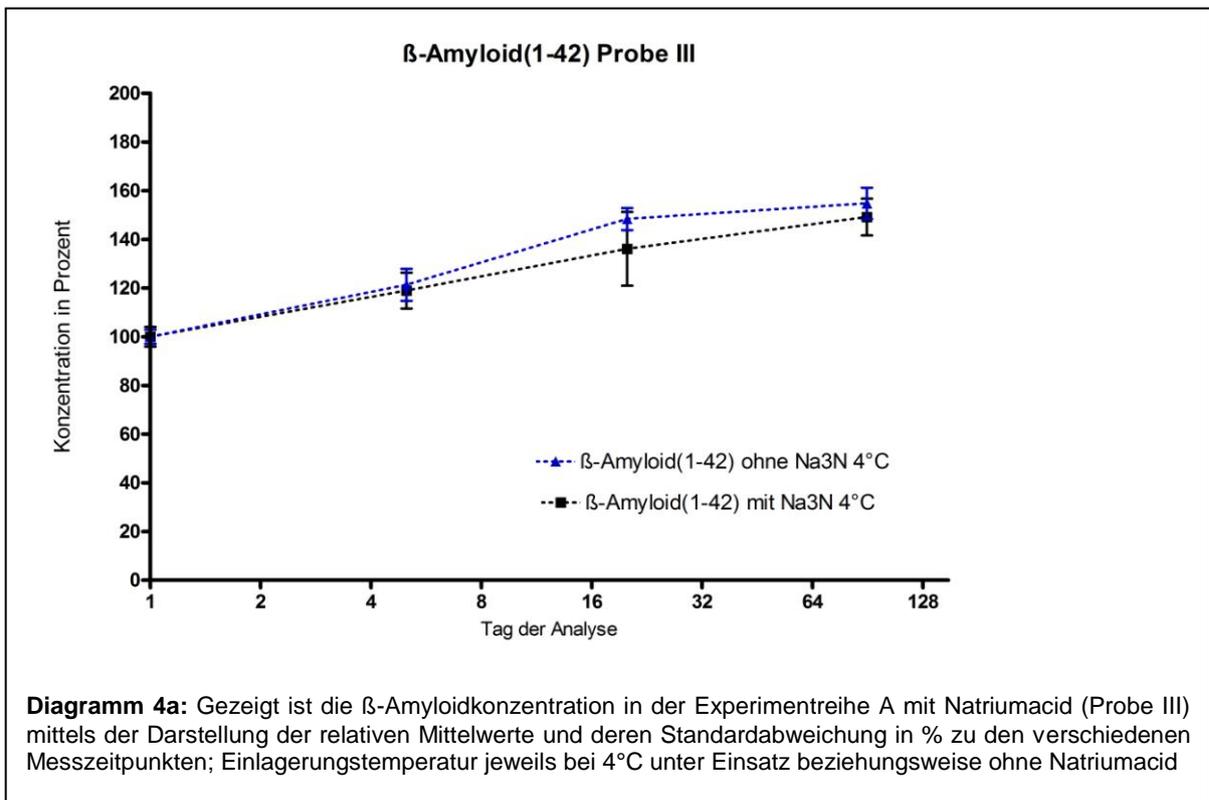
Die Konzentration des p-Tau-Proteins an Tag 0 liegt bei 66,58 pg/ml ( $\pm 10,32$  pg/ml) und entspricht dem Startwert von 100%. Bis zu Tag 5 sind bei allen Proben Konzentrationsverluste zu verzeichnen, wobei den stärksten Verlust die Probe aus  $-20^{\circ}\text{C}$  mit 78,61% ( $\pm 8,28\%$ ) zeigt. 15 Tage später sind weitere Konzentrationsabfälle zu sehen. Bei den Proben aus  $-20^{\circ}\text{C}$  und  $-80^{\circ}\text{C}$  sind diese minimal, bei der Probe aus  $4^{\circ}\text{C}$  hingegen ist der Konzentrationsverlust deutlich und erreicht ein Niveau von 80,76% ( $\pm 7,90\%$ ). An Tag 90 setzt sich dieser Trend fort, wobei die Probe aus  $-20^{\circ}\text{C}$  dabei den niedrigsten Wert anzeigt. Die  $4^{\circ}\text{C}$ -Probe erreicht einen Endwert von 71,47% ( $\pm 4,45\%$ ). Beobachtet man die Proben aus  $-20^{\circ}\text{C}$  und  $-80^{\circ}\text{C}$  weiter bis zu Tag 140 stagniert der Konzentrationsabfall nahezu und die Verluste sind nur noch gering. Die Probe aus  $-20^{\circ}\text{C}$  hat einen Gesamtkonzentrationsverlust von ca. 33%, dem gegenüber steht ein Verlust von ca. 24% bei der Probe aus  $-80^{\circ}\text{C}$ . Dargestellt sind die beschriebenen Verläufe in Diagramm 3c.



### 3.1.2. Experimentreihe A: Probe III (Liquorgemisch plus Natriumacid)

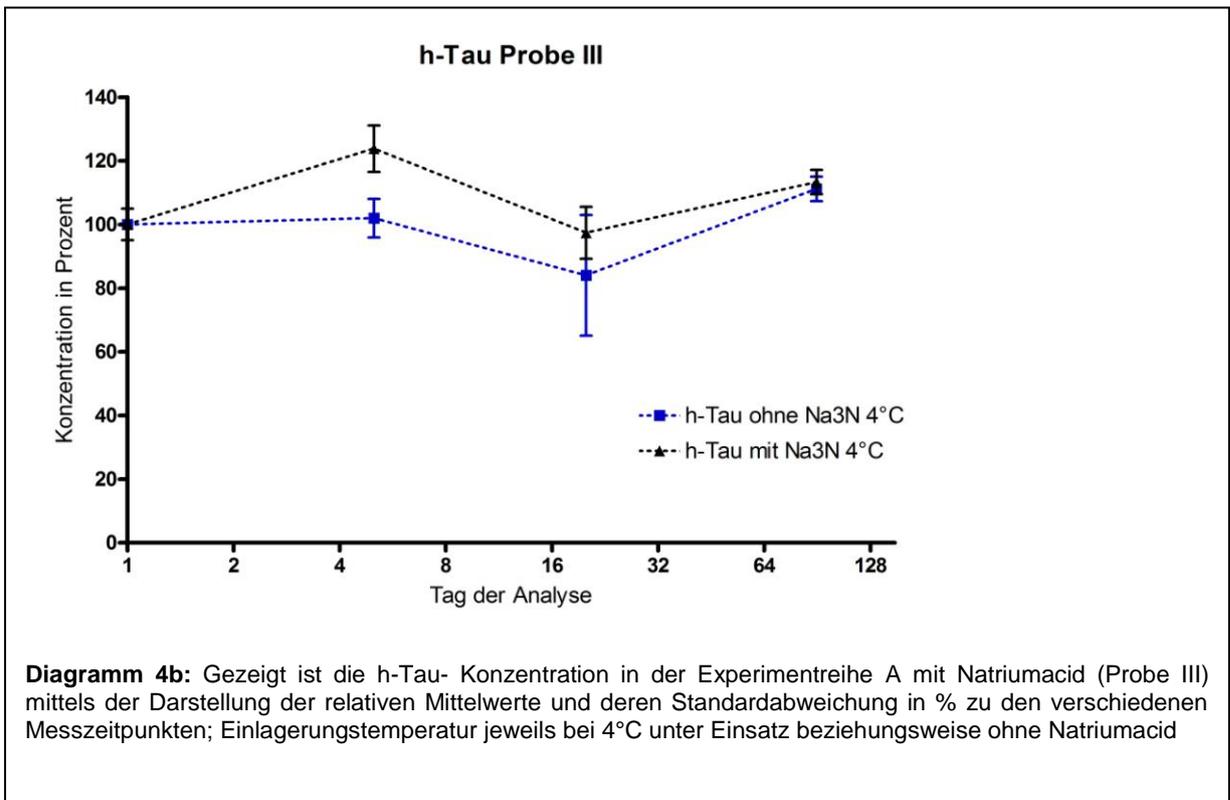
#### $\beta$ -Amyloid (1-42) (A $\beta$ )

Der Experimentversuch, bei dem Natriumacid ( $\text{Na}_3\text{N}$ ) zugegeben wird, ist im Diagramm 4a zu sehen. Die Konzentrationsverläufe zeigen ein ähnliches Bild, wie die der Probe I in Diagramm 3a. An Tag 90 wird ein maximaler Wert von 149,18% ( $\pm 7,57\%$ ) erreicht, wenn die Probe mit Natriumacid versetzt wird. Dies entspricht im Rahmen der Standardabweichung einem ähnlichen Wert, wie der Probe ohne Natriumacid. Beide Konzentrationsverläufe zeigen einen identischen Anstieg in einem Zeitrahmen von 90 Tagen.



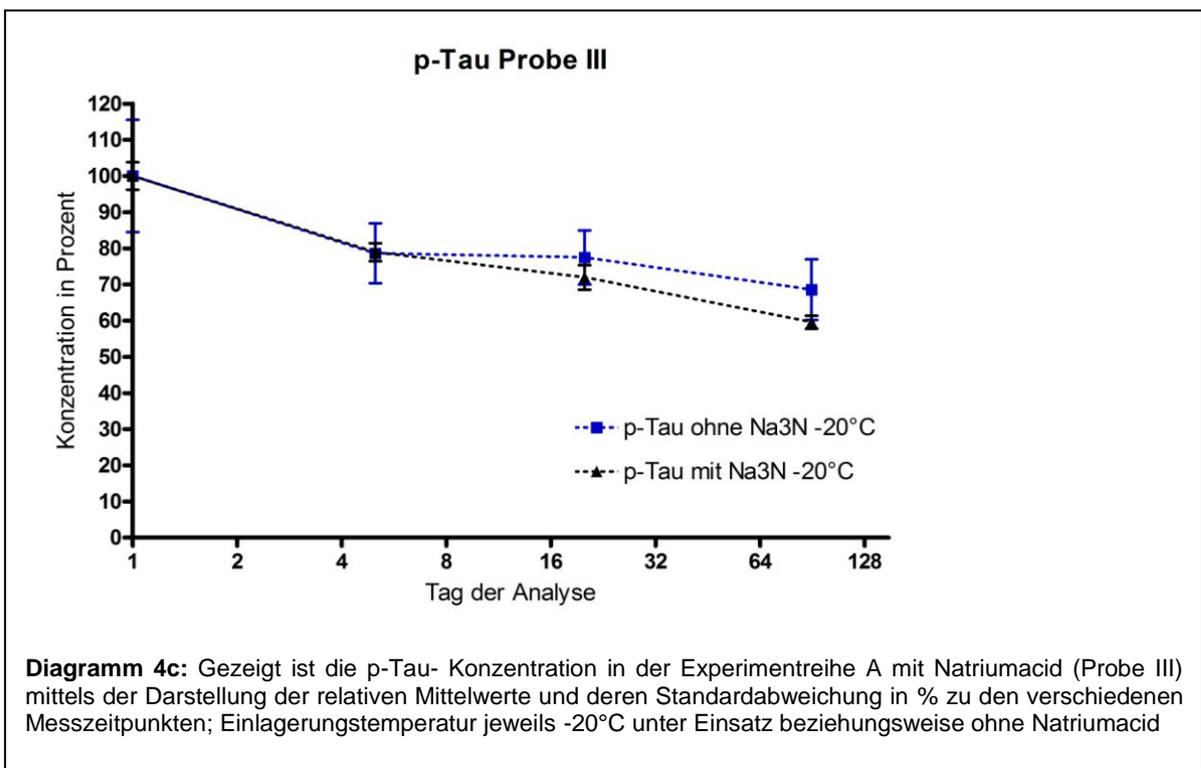
## Gesamt - Tau (h-Tau)

In Diagramm 4b ist der Verlauf der relativen Proteinkonzentration bei 4°C mit und ohne Na<sub>3</sub>N zu sehen. Im Vergleich hat die Probe mit dem Na<sub>3</sub>N stets ein höheres Konzentrationsniveau, als die Probe ohne Na<sub>3</sub>N. Die Tendenz beider Kurven im Konzentrationsverlauf ist dabei gleich. Initial kommt es bei der Probe mit Na<sub>3</sub>N nach 5 Tagen zu einem Konzentrationsanstieg (123,83% ± 7,31), dem wiederum folgt ein Konzentrationsabfall an Tag 20 auf 97,42% (± 8,15%). Daraufhin folgt an Tag 90 erneut eine Konzentrationszunahme auf 113,34% (± 3,81%).



## Phospho- Tau 181 (p-Tau)

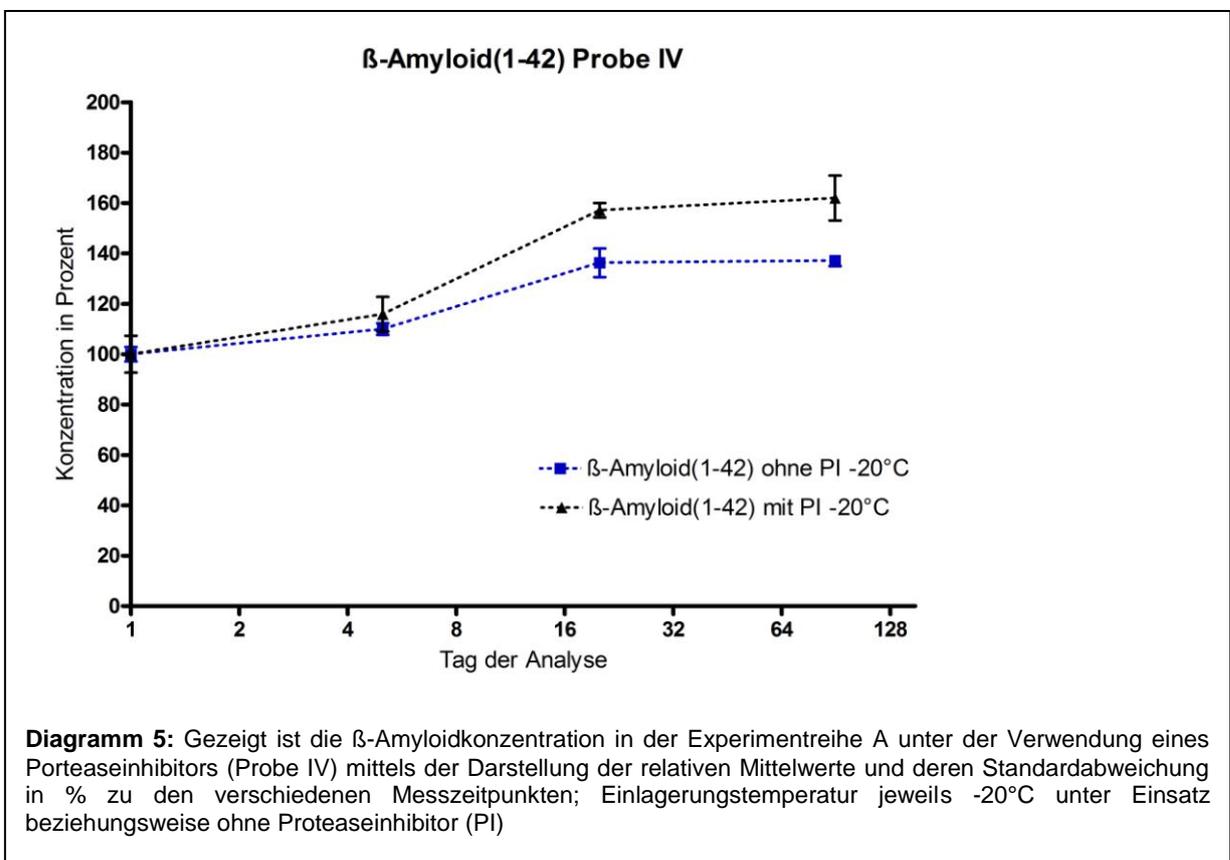
Vergleicht man nun das p-Tau-Protein der  $-20^{\circ}\text{C}$ -Proben unter Verwendung des  $\text{Na}_3\text{N}$ , ist auch hier ein Abwärtstrend der Konzentrationen zu erkennen. Die Verluste beider Proben an Tag 5 sind nahezu identisch und betragen ca. 12% vom Ausgangswert. Auch die Werte an Tag 20 unterscheiden sich nicht wesentlich. An Tag 90 erreicht die Probe mit  $\text{Na}_3\text{N}$  schließlich einen Endwert von 59,58% ( $\pm 1,81\%$ ). Dieser ist ca. 10% niedriger, im Vergleich zu dem der Probe ohne  $\text{Na}_3\text{N}$ . Die relative Konzentration der Probe ohne  $\text{Na}_3\text{N}$  liegt somit an Tag 90 bei 68,56% ( $\pm 8,38\%$ ).



### 3.1.3. Experimentreihe A: Probe IV (Liquorgemisch plus Proteaseinhibitor)

#### $\beta$ -Amyloid (1-42) (A $\beta$ )

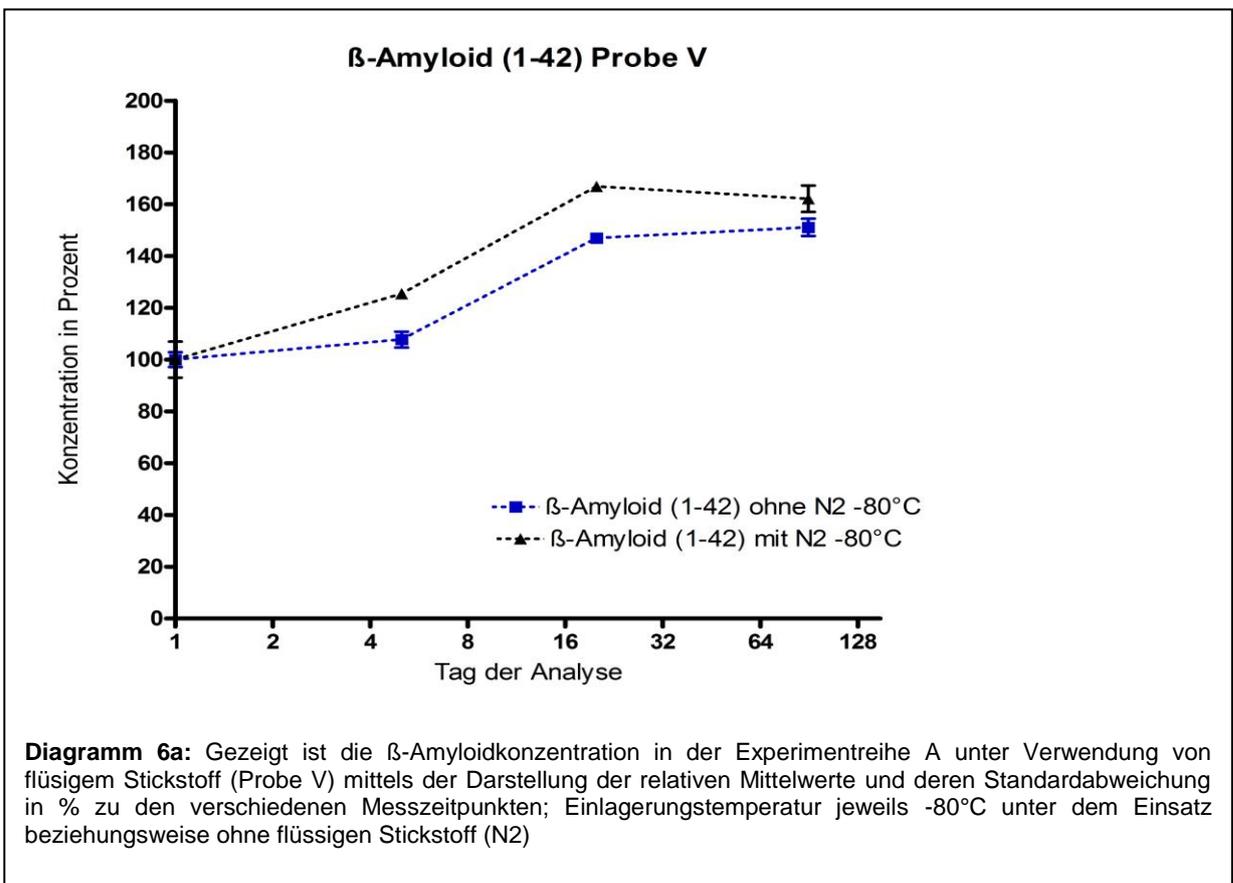
Unter dem Einsatz des Proteaseinhibitors P2714 (PI), eines Serin-/ Cystein-/ Aspartat- und Metalloproteaseinhibitors, zeichnet sich eine Konzentrationszunahme ab. Diese ist in Diagramm 5 dargestellt. Während die Probe ohne PI an Tag 90 einen 137,13% ( $\pm$  2,16%)- Wert erreicht, ist die Probe mit PI bereits auf 161,97% ( $\pm$  8,93%) angestiegen. Es ist ein stärkerer Konzentrationsanstieg bei der Probe mit PI zu erkennen.



### 3.1.4. Experimentreihe A: Probe V (Liquorgemisch in flüssigem Stickstoff)

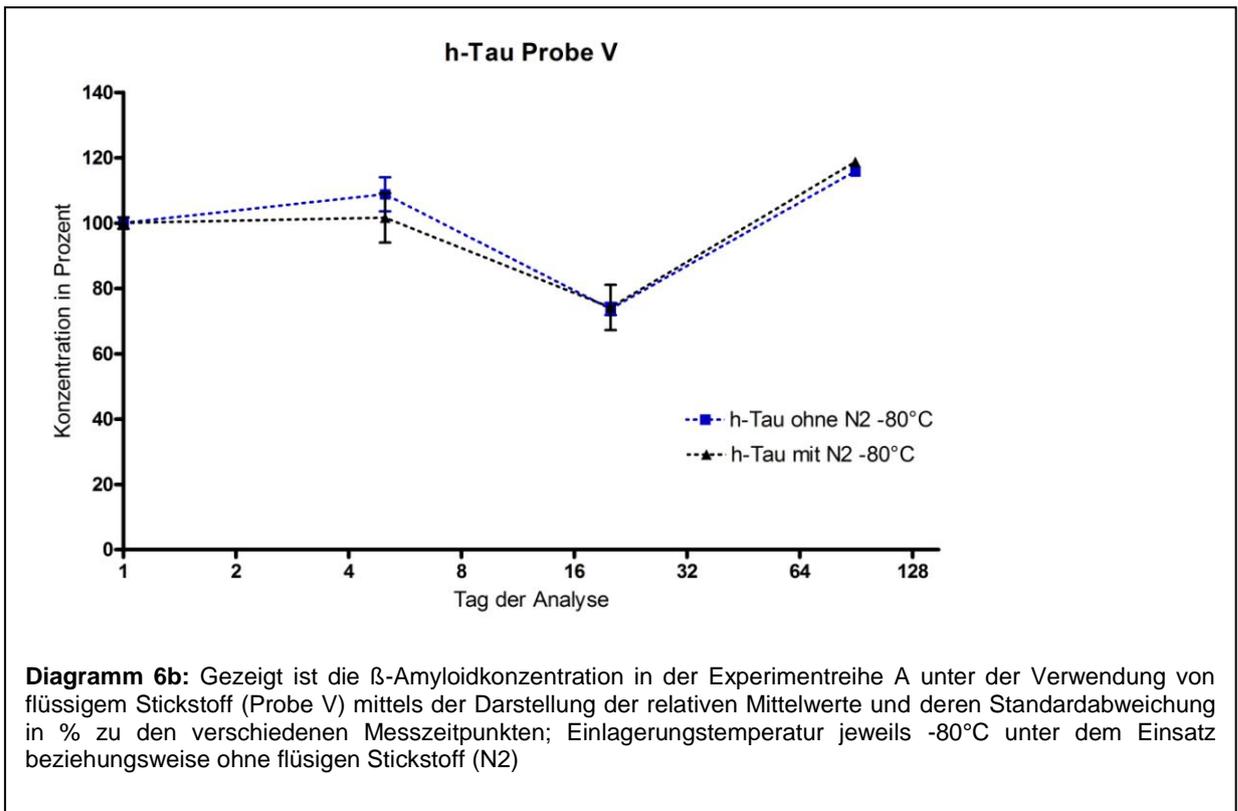
#### $\beta$ -Amyloid (1-42)

Im Diagramm 6a ist die zeitliche Konzentrationsveränderung des  $\beta$ -Amyloids unter Verwendung von flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>) dargestellt. Die Kurve mit N<sub>2</sub> zeigt einen Anstieg, der an Tag 90 mit einer Konzentration von 162,09% ( $\pm$  5,09%) sein Maximum erreicht. Die relative Endkonzentration der Probe ohne N<sub>2</sub> liegt bei 151,08% ( $\pm$  3,33%). Bei der Probe mit N<sub>2</sub> ist ein größerer Anstieg zu erkennen, der sich bereits an den Analysetagen 5 und 20 feststellen lässt.



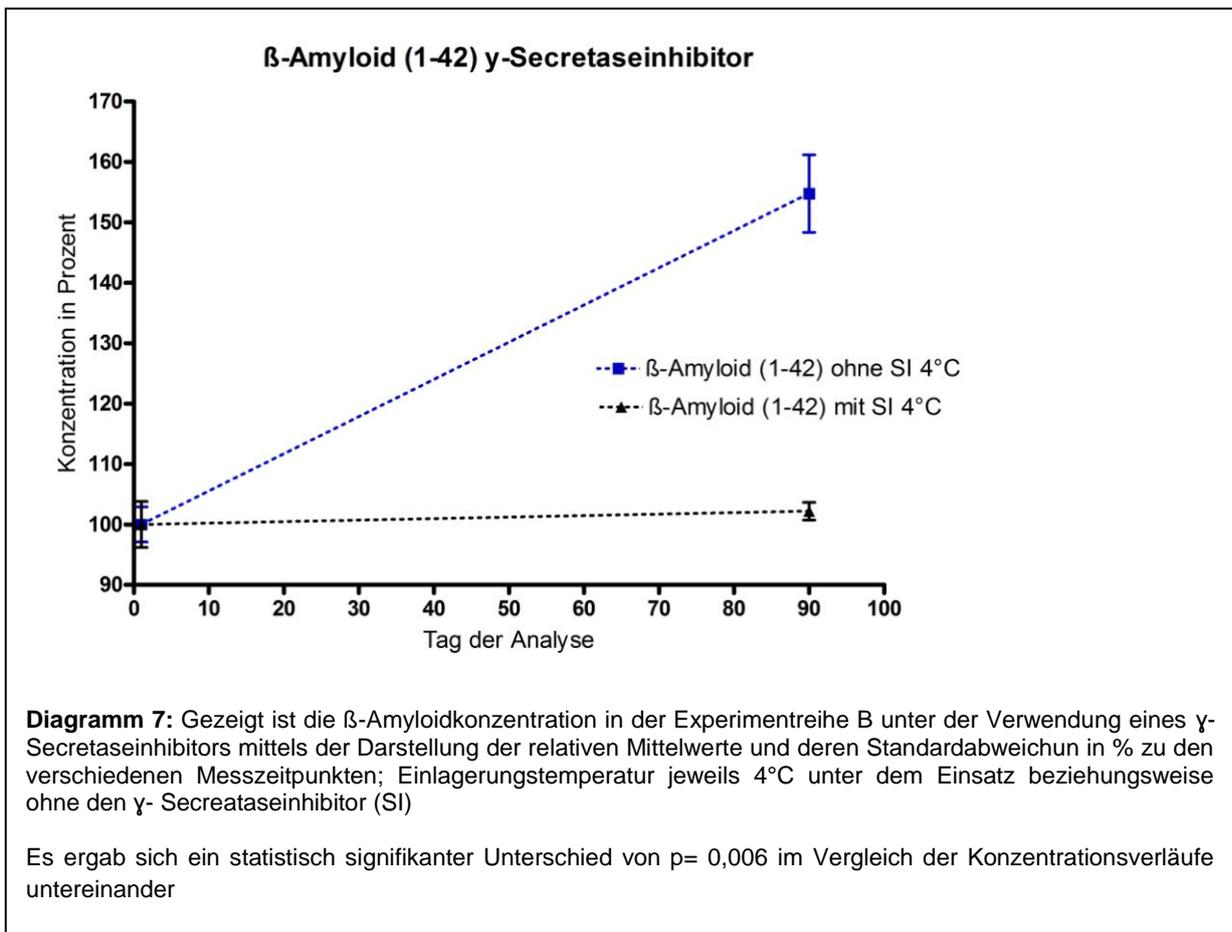
### Gesamt- Tau (h-Tau)

Wird die Probe vor Analyse und Einlagerung schockgefroren (N2), ändert dies nichts Wesentliches an der Tendenz des Konzentrationsverlaufes (Diagramm 6b) im Vergleich zu der Probe ohne N2. Von Tag 0 auf Tag 5 ist nur eine minimale Konzentrationsänderung, im Sinne eines Anstieges, zu erkennen. Im weiteren Verlauf und 15 Tage später ist die Konzentration der Probe mit N2 auf 74,14% ( $\pm 6,92\%$ ) abgefallen. An Tag 90 ist die Konzentration wieder auf 118,81% ( $\pm 0,79\%$ ) angestiegen.



### 3.1.5. Experimentreihe B: $\gamma$ -Secretaseinhibitor

Ein weiterer Versuch der Experimentreihe B ist in Diagramm 7 dargestellt. Hierbei wurde die Konzentrationsveränderung des  $\beta$ -Amyloid (1-42) unter Zugabe einer  $\gamma$ -Secretaseinhibitors (SI) betrachtet. Dies geschah über einen Zeitraum von 90 Tagen. Der Konzentrationsverlauf wurde mit der Probe I aus der Experimentreihe A bei gleicher Lagerungstemperatur verglichen. Bei der Probe I kam es zu einem Konzentrationsanstieg auf 154,78% ( $\pm$  6,42%). Unter der Verwendung des Inhibitors ist eine Konzentrationszunahme auf lediglich 102,20% ( $\pm$  1,46%) innerhalb von 90 Tagen zu sehen. Die Werte der jeweiligen Proben unterscheiden sich an Tag 90 signifikant voneinander mit  $p= 0,006$  (berechnet über T-Test für unabhängige Stichproben).



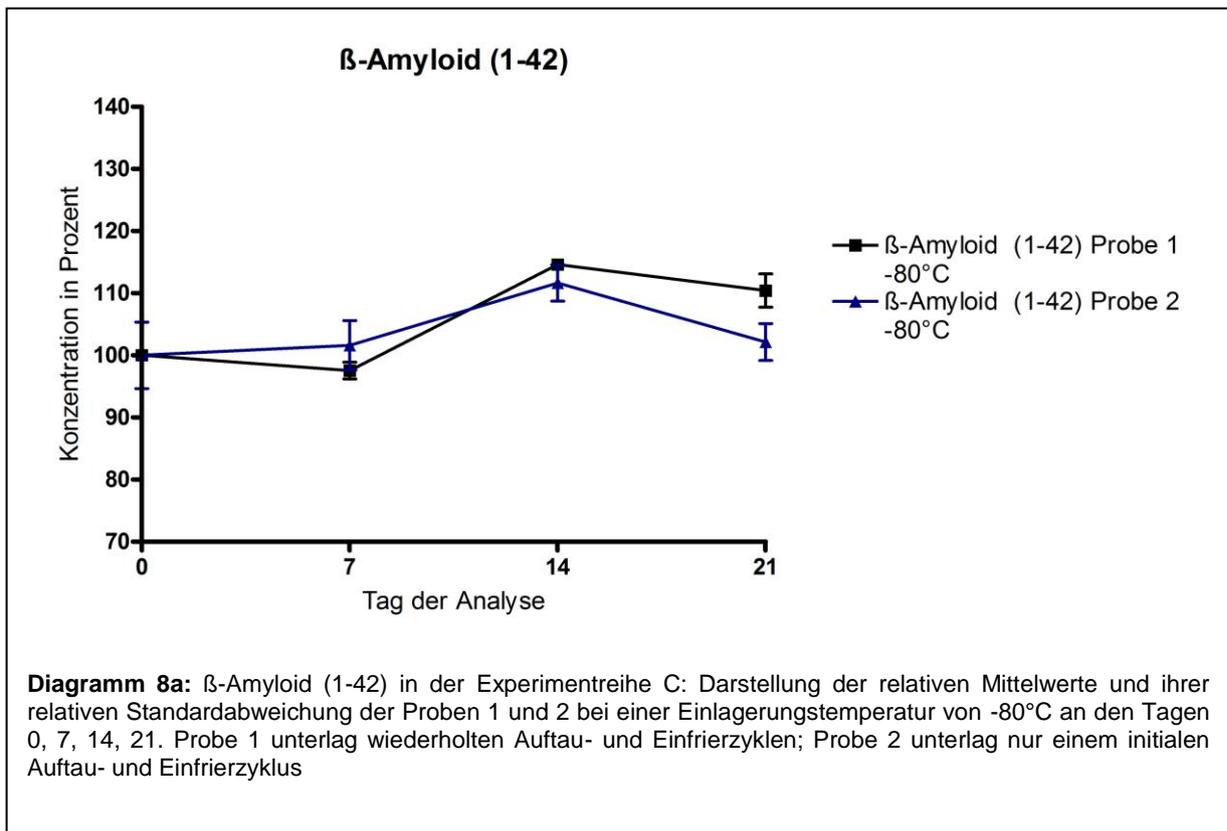
### 3.2. Experimentreihe C

Alle im Text erwähnten Ergebnisse entsprechen den relativen Biomarker-Konzentrationen (%)  $\pm$  relativen Standardabweichung (%), als Signifikanzschwelle wurden die üblichen  $p < 0,05$  verwendet. Der Mittelwert wurde aus der dreifachen Bestimmung der Proteinkonzentrationen ermittelt. Das in dieser Arbeit gemessene Tauprotein (h-Tau) umfasst das gesamte Tau, also das phosphorylierte sowie das nicht- phosphorylierte Tauprotein. Zudem findet die spezifische Quantifizierung des Phospho- Tau (p-Tau) statt, welches an Threonin 181 phosphoryliert vorliegt.

Für diesen Versuchsaufbau wurde ein Liquorpool von Alzheimer Demenz (AD)-Patienten gebildet. Die Menge wurde anschließend halbiert und den zwei experimentellen Zyklen zugeführt. Es werden die relativen Konzentrationen der Proteine  $\beta$ -Amyloid (1-42), h-Tau und p-Tau nach einem Einfrierzyklus (Probe 2) mit denen nach zwei, drei und vier Einfrier-/ Auftauzyklen (Probe 1) verglichen. Die Einlagerung fand bei  $-80^{\circ}\text{C}$  statt. Die Proben wurden jeweils an Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 analysiert.

### $\beta$ -Amyloid (1-42)

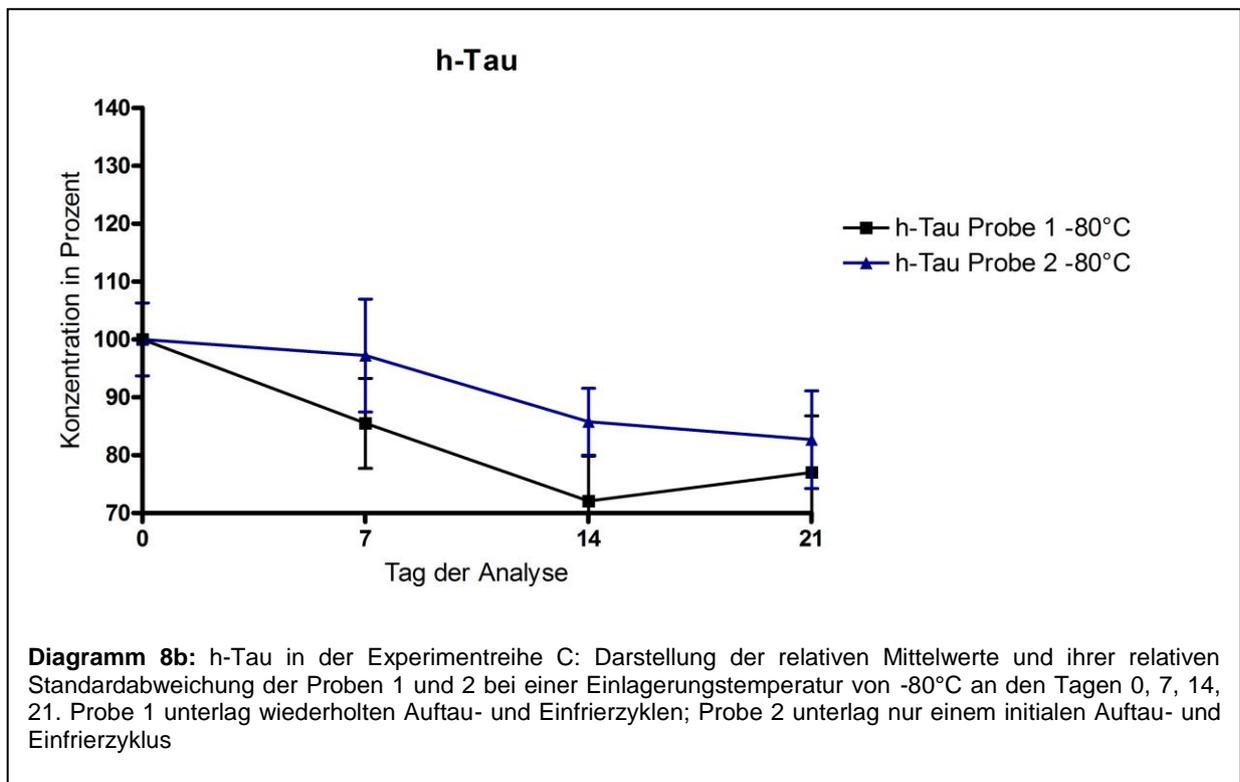
Der absolute Ausgangswert des  $\beta$ -Amyloid (1-42) beträgt 642,43 pg/ml ( $\pm$  34,40 pg/ml). Dieser wird der relativen Startkonzentration von 100% gleichgesetzt. Beobachtet man nun Probe 1 über einen maximalen Zeitraum von 21 Tagen kann man von einem generellen Konzentrationsanstieg sprechen. Von Tag 0 zu Tag 7 ist ein minimaler Konzentrationsabfall auf 97,55% ( $\pm$  1,34%) zu erkennen. Anschließend folgt eine Konzentrationszunahme auf 114,60% ( $\pm$  2,68%). Der Endwert an Tag 21 beträgt 110,40% ( $\pm$  2,68%). Probe 2 steigt bereits zu Tag 7 auf 101,61% ( $\pm$  3,98%) an. Diesem Wert folgt erneut eine Konzentrationszunahme um ca. 10%. An Tag 21 beläuft sich die Konzentration des  $\beta$ -Amyloid auf 102,12% ( $\pm$  2,97%).



### Gesamt-Tau (h-Tau)

Die 100% Konzentration des h-Tau entspricht an Tag 0 883,73 pg/ml ( $\pm 55,77$  pg/ml). Bei Probe 1 fällt an Analysetag 7 direkt auf 85,50 % ( $\pm 7,76\%$ ) ab und sinkt sieben Tage später weiter auf 72,10% ( $\pm 7,76\%$ ). Zu Tag 21 erholt sich die h-Tau Konzentration wieder ein wenig und steigt auf 77,00% ( $\pm 9,79\%$ ) an.

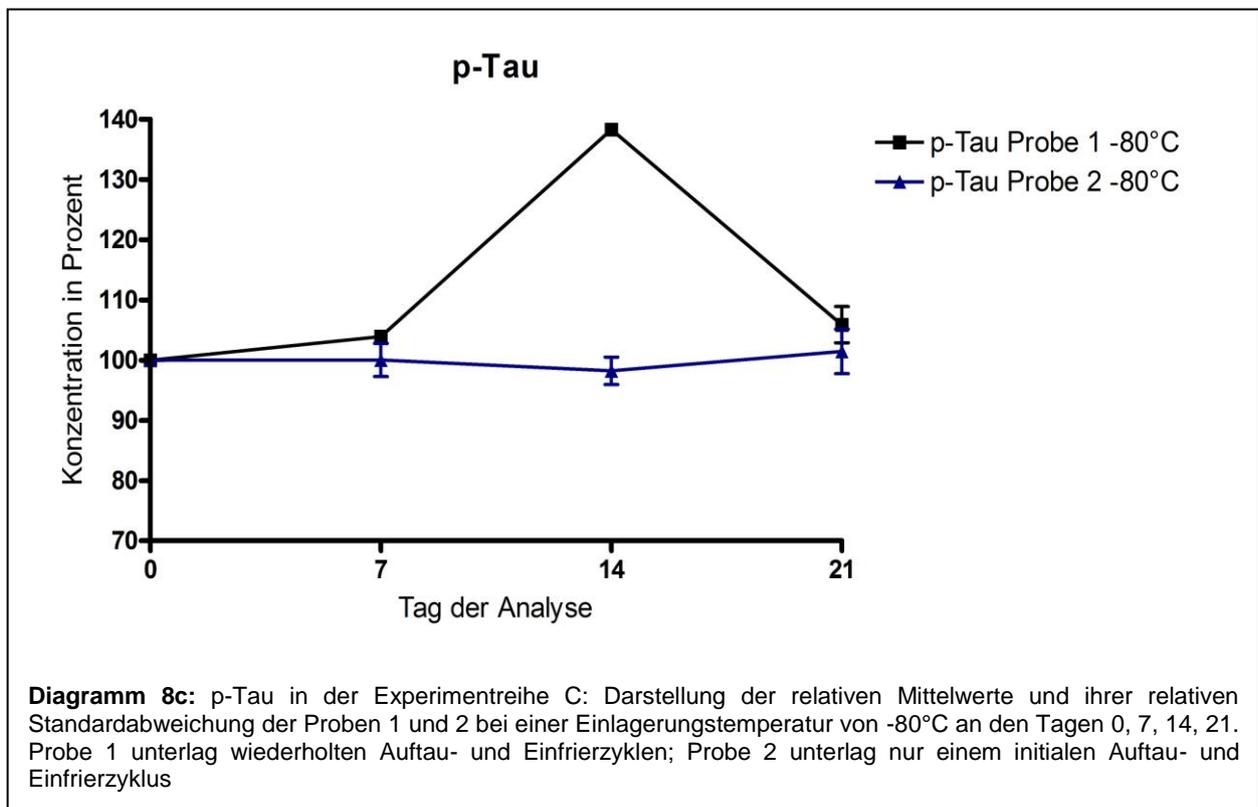
Auch bei Probe 2 ist ein Konzentrationsverlust über die 21 Tage zu verzeichnen. Er ist aber wesentlich weniger stark ausgeprägt. In den ersten sieben Tagen sinkt die h- Tau- Konzentration auf 97,21% ( $\pm 9,77\%$ ). An Tag 14 ist eine weitere Abnahme um weitere ca. 12% zu erkennen. Die Endkonzentration der Messreihe an Tag 21 beträgt 82,68% ( $\pm 8,45\%$ ).



### Pospho- Tau 181 (p-Tau)

Die p-Tau- Konzentration an Tag 0 beträgt 158,61 pg/ml ( $\pm 0,94$  pg/ml). Bei Probe 1 ist in den ersten sieben Tagen ein minimaler Anstieg auf 103,91% ( $\pm 0,96\%$ ) zu erkennen. Anschließend folgt eine maximale Konzentrationszunahme auf 138,31% ( $\pm 0,14\%$ ). Dieser folgt jedoch eine Rückkehr auf des ursprüngliche Konzentrationslevel von 105,89% ( $\pm 3,00\%$ ) an Tag 21.

Probe 2 zeigt im Gesamtverlauf der 21 Tage ein eher konstantes Konzentrationsniveau. Es fällt lediglich an Tag 14 auf 98,23% ( $\pm 2,28\%$ ) etwas ab, steigt an Tag 21 aber wieder auf 101,45% ( $\pm 3,70\%$ ) an.



### 3.3. Experimentreihe D

Es wurden die Einzelparameter  $\beta$ -Amyloid (1-42) (A $\beta$ ), Gesamt- Tau (h-Tau), Phospho- Tau 181 (p-Tau) von 29 Patienten erfasst. Die Analyse fand an Tag x und nochmals 30 Tage (Tag x+30) später statt.

Diagnose	n	Alter als Mittelwert in Jahren	Geschlecht
Kontrollen	7	73,14	m= 5 / w= 2
AD	8	77,88	m= 4 / w= 4
FTD	8	62,25	m= 3 / w= 5
LBD	6	75,83	m= 5 / w= 1

**Tabelle 2:** Fallzahlen der Einzelparameteranalyse (Abkürzungen: AD: Alzheimer Demenz, FTD: Frontotemporale Demenz, LBD: Lewy- Körperchen Demenz, n: Fallzahl, m: männlich, w: weiblich)

#### 3.3.1. $\beta$ - Amyloid (1-42) (A $\beta$ ) der untersuchten Gruppen

Diagnose	n	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrollen	7	783,36	318,09
AD	8	326,38	97,99
FTD	8	560,33	364,21
LBD	6	992,87	123,17

**Tabelle 3:** Anzahl der Patienten, Mittelwerte der  $\beta$ -Amyloid- Konzentrationen in pg/ml und Standardabweichungen in pg/ml an Tag x (Abkürzungen: AD: Alzheimer Demenz, FTD: Frontotemporale Demenz, LBD: Lewy-Körperchen Demenz, n: Fallzahl)

Die Werte aller einzelnen Erkrankungsgruppen an Tag x sind normalverteilt. Diese wurde anhand des Kolmogorov- Smirnov Testes berechnet. Der Kolmogorov- Smirnov Test wurde verwendet, da er deutlich sensibler bei kleineren Stichprobenmengen reagiert. Zur Ermittlung der bestehenden Homogenität der Varianzen wird der Levene- Test verwendet. Da die Proben jedoch keine Varianzhomogenität aufweisen, wird zur Berechnung der Signifikanzunterschiede untereinander, der Welch- Test verwendet.

Die Alzheimer Demenz (AD)- Proben unterscheiden sich signifikant bezüglich der  $\beta$ - Amyloid (1-42) - Konzentration ( $A\beta$ ) von den Proben der Gesunden ( $p= 0,021$ ) sowie, der an Lewy-Körperchen Demenz (LBD)- Erkrankten ( $p= 0,001$ ). Sie nehmen den niedrigsten Konzentrationsrang im Vergleich aller Proben ein. Gegenüber den Kontrollpatienten sind die Werte um das fast zweieinhalbfache geringer und liegen bei unterdurchschnittlichen 326,38 pg/ml. Im Vergleich zu den LBD- Proben sind diese wiederum um das dreifache höher.

Die frontotemporale Demenz (FTD)- Proben unterscheiden sich signifikant von den LBD- Werten ( $p= 0,041$ ). Im Vergleich zu den anderen Gruppen ergeben sich keine weiteren signifikanten Unterschiede bezüglich der  $A\beta$ - Konzentration. Jedoch liegt hier die größte Streubreite (Standardabweichung) von allen Gruppen vor, gefolgt von der Gruppe der Gesunden.

Signifikante Unterschiede ergeben auch im Vergleich der LBD- Proben mit den AD- ( $p= 0,001$ ) und FTD- Proben. Der Mittelwert der  $A\beta$ - Konzentration erreicht hier die Maximalkonzentration aller Gruppen von 992,87 pg/ml.

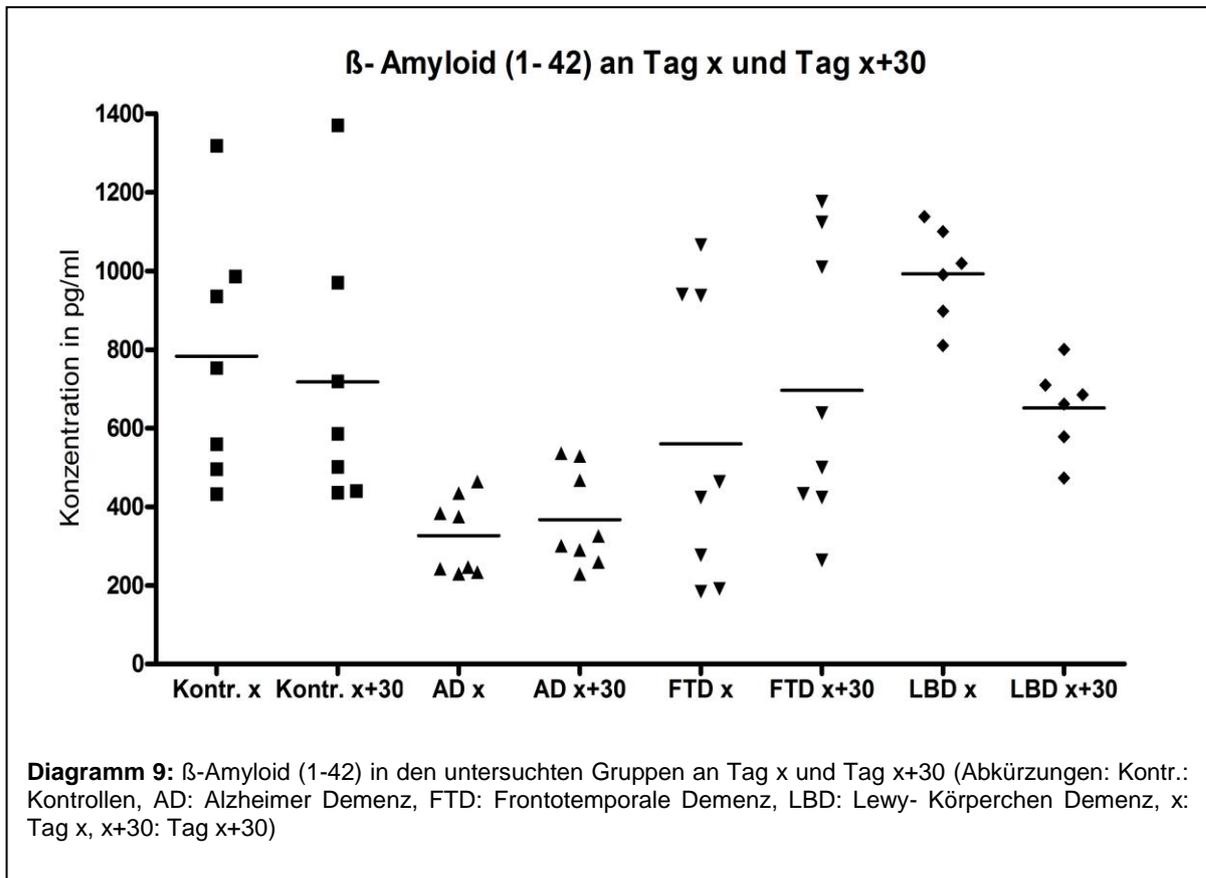
Diagnose	n	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrollen	7	717,99	344,07
AD	8	367,28	123,83
FTD	8	696,24	355,61
LBD	6	651,41	112,91

**Tabelle 4:** Anzahl der Patienten, Mittelwerte der  $\beta$ -Amyloid- Konzentrationen in pg/ml und Standardabweichungen in pg/ml an Tag x+30 (Abkürzungen: AD: Alzheimer Demenz, FTD: Frontotemporale Demenz, LBD: Lewy-Körperchen Demenz, n: Fallzahl)

Die  $A\beta$ - Konzentrationen an Tag x+30 sind alle normalverteilt. Die Varianzen der Variablen weisen erneut keine Homogenität auf. Den höchsten Konzentrationswertmittelwert zeigen die Proben der Kontrollgruppe auf. Sie sind jedoch auch von der größten Standardabweichung betroffen.

Den niedrigsten Konzentrationswertmittelwert hat die Gruppe der AD- Proben. Sie ist deutlich geringer mit gerade einmal der Hälfte der Konzentration, als die der Kontrollen. Deren Streubreite ist dazu relativ gering mit 123,83 pg/ml. Die Konzentrationsmittelwerte der FTD- und LBD- Proben unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander. Sie haben eine Differenz von ca. 45 pg/ml. Die Standardabweichung der LBD- Probe ist allerdings deutlich niedriger und weist im

Gruppenvergleich den geringsten Schwankungsbereich auf. Alle Proben sind im Vergleich zueinander an Tag x+30 nicht signifikant unterschiedlich.



Um die ermittelten Konzentrationswerte der einzelnen Gruppen gepaart miteinander vergleichen zu können, d.h. Tag x mit der gleichen Gruppe von Tag x+30, wird der T-Test bei verbundenen Stichproben verwendet. Die Konzentrationen der Kontrollgruppen sinken innerhalb von 30 Tagen um circa 65 pg/ml. Die Proben der AD- Gruppe steigen geringfügig an. Die Konzentrationsvergleiche der Proben der Kontroll- und AD- Gruppen weisen jedoch keine statistische Signifikanz auf. Innerhalb von 30 Tagen lässt sich bei den FTD- Proben eine Konzentrationserhöhung um fast 140 pg/ml feststellen. Ein gegensinniges Verhalten zeigen die Proben der LBD- Gruppe. Hier sanken die Werte um ein Drittel des Ausgangswertes. Es lassen sich signifikante Unterschiede in den Gruppen der FTD- und LBD- Proben feststellen. D.h. die Werte von Tag x der Gruppe FTD unterscheiden sich signifikant ( $p= 0,001$ ) von den Konzentrationswerten von Tag x+30 der FTD- Gruppe. Gleiches gilt für die LBD- Proben ( $p= 0,001$ ).

### 3.3.2. Gesamt- Tau (h-Tau) der untersuchten Gruppen

Diagnosen	n	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrollen	7	319,20	93,23
AD	8	653,24	261,09
FTD	8	303,36	142,73
LBD	6	415,08	243,85

**Tabelle 5:** Anzahl der Patienten, Mittelwerte der h-Tau - Konzentrationen in pg/ml und Standardabweichungen in pg/ml an Tag x (Abkürzungen: AD: Alzheimer Demenz, FTD: Frontotemporale Demenz, LBD: Lewy-Körperchen Demenz, n: Fallzahl)

Die Werte aller Gruppen am Tag x sind normalverteilt. Sie haben jedoch keine Varianzhomogenität. Der Mittelwert der Kontrollgruppe weist eine h-Tau Konzentration im unteren Bereich im Gruppenvergleich auf. Sie unterliegt der geringsten Streubreite mit 93,23 pg/ml. Die h-Tau- Konzentration der Alzheimer Demenz (AD)- Proben zeigt mit Abstand den höchsten Mittelwert. Dieser liegt bei 653,24 pg/ml. Die Standardabweichung ist im Vergleich zu den anderen Werten eher hoch einzustufen. Im Vergleich mit den anderen Gruppenmitgliedern ist ein statistisch signifikanter Unterschied zu den Gruppen der Kontrollen ( $p= 0,028$ ) und der frontotemporale Demenz (FTD) ( $p= 0,015$ ) auszumachen.

Der Mittelwert der FTD – Proben befindet sich auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Die FTD- Proben unterscheiden sich signifikant von den der AD- Proben. Die Lewy-Körperchen Demenz (LBD)- Gruppe ist wiederum etwas erhöht und liegt bei 415,08 pg/ml.

Diagnosen	n	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrollen	7	184,80	82,08
AD	8	617,11	238,72
FTD	8	318,17	167,41
LBD	6	370,50	229,97

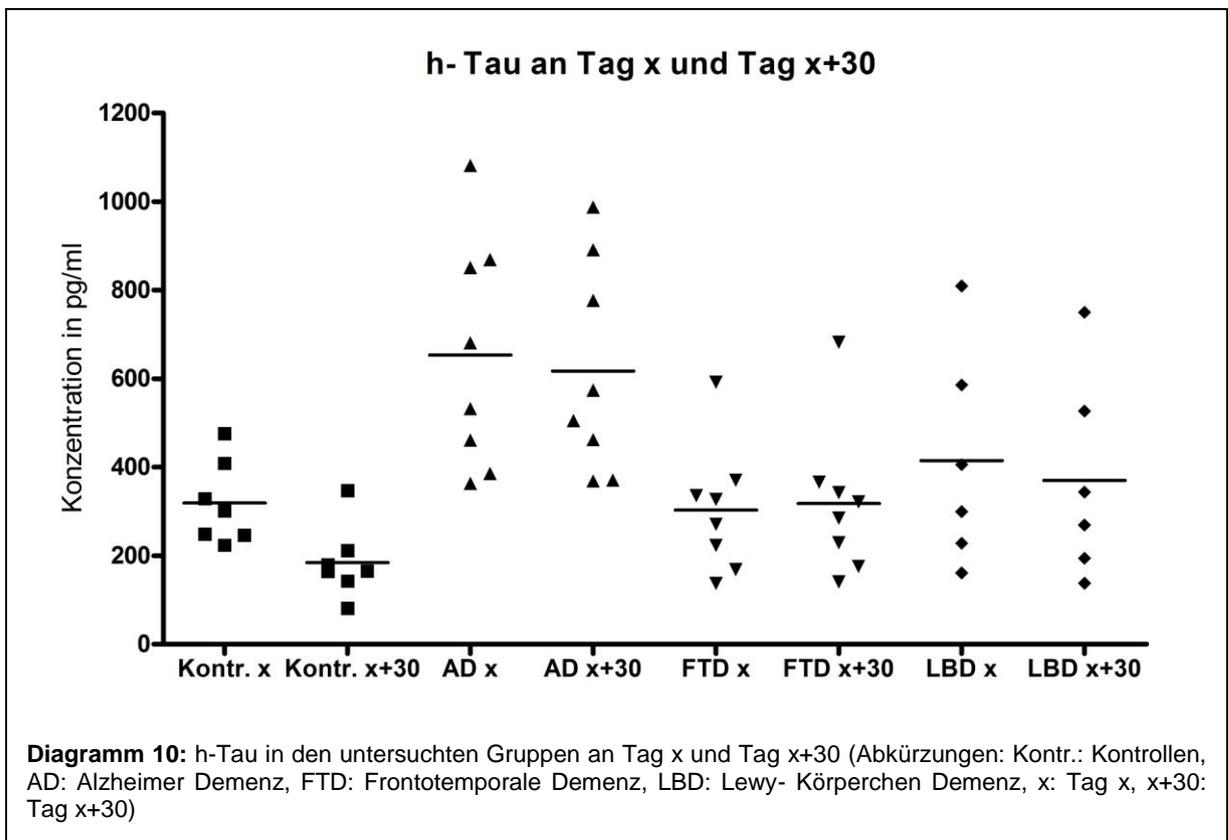
**Tabelle 6:** Anzahl der Patienten, Mittelwerte der h-Tau - Konzentrationen in pg/ml und Standardabweichungen in pg/ml an Tag x+30 (Abkürzungen: AD: Alzheimer Demenz, FTD: Frontotemporale Demenz, LBD: Lewy-Körperchen Demenz, n: Fallzahl)

Auch die Proben der Analyse an Tag x+30 sind normalverteilt und haben keine Varianzhomogenität. Den eindeutig niedrigsten Mittelwert aller Gruppen haben die Kontrollproben mit 184,80 pg/ml. Zudem ist ihnen auch die geringste Standardabweichung zuzuordnen.

Den höchsten h-Tau Konzentrationsmittelwert weist die AD- Gruppe auf. Dieser ist um beinahe das dreieinhalbfache höher als der der Kontrollen. Allerdings auch einhergehend mit einer erhöhten Streubreite von 238,72 pg/ml. Die AD- Gruppe unterscheidet sich signifikant von den Mittelwerten der Kontrollen ( $p= 0,002$ ) und der FTD ( $p= 0,036$ ).

Die FTD- Mittelwerte ordnen sich im mittleren Bereich beim Gruppenvergleich ein und zeigt eine moderate Standardabweichung. Eine statistische Signifikanz lässt sich lediglich zu der Gruppe der AD- Proben beweisen.

Die LBD- Mittelwerte ähneln denen der FTD, zeigen jedoch eine deutlich erhöhte Streubreite. Ein signifikanter Unterschied zu den anderen Gruppen ist nicht darzustellen.



Die Mittelwerte der Kontrollproben fallen im 30- tägigen Zeitverlauf signifikant ( $p=0,002$ ) um fast die Hälfte der Ausgangskonzentration ab. Die Proben der AD- sowie der FTD- Gruppen unterscheiden sich nach 30 Tagen nur minimal und weisen keine Signifikanz auf. Die LBD- Proben wiederum fallen um ca. 11% ihres Ausgangswertes, so dass hier eine statistische Signifikanz ( $p=0,001$ ) vorzufinden ist.

### 3.3.3. Phospho-Tau 181 (p-Tau) der untersuchten Gruppen

Diagnosen	n	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrollen	7	58,37	20,01
AD	8	95,60	30,87
FTD	8	45,40	21,66
LBD	6	57,91	25,39

**Tabelle 7:** Anzahl der Patienten, Mittelwerte der p-Tau - Konzentrationen in pg/ml und Standardabweichungen in pg/ml an Tag x (Abkürzungen: AD: Alzheimer Demenz, FTD: Frontotemporale Demenz, LBD: Lewy-Körperchen Demenz, n: Fallzahl)

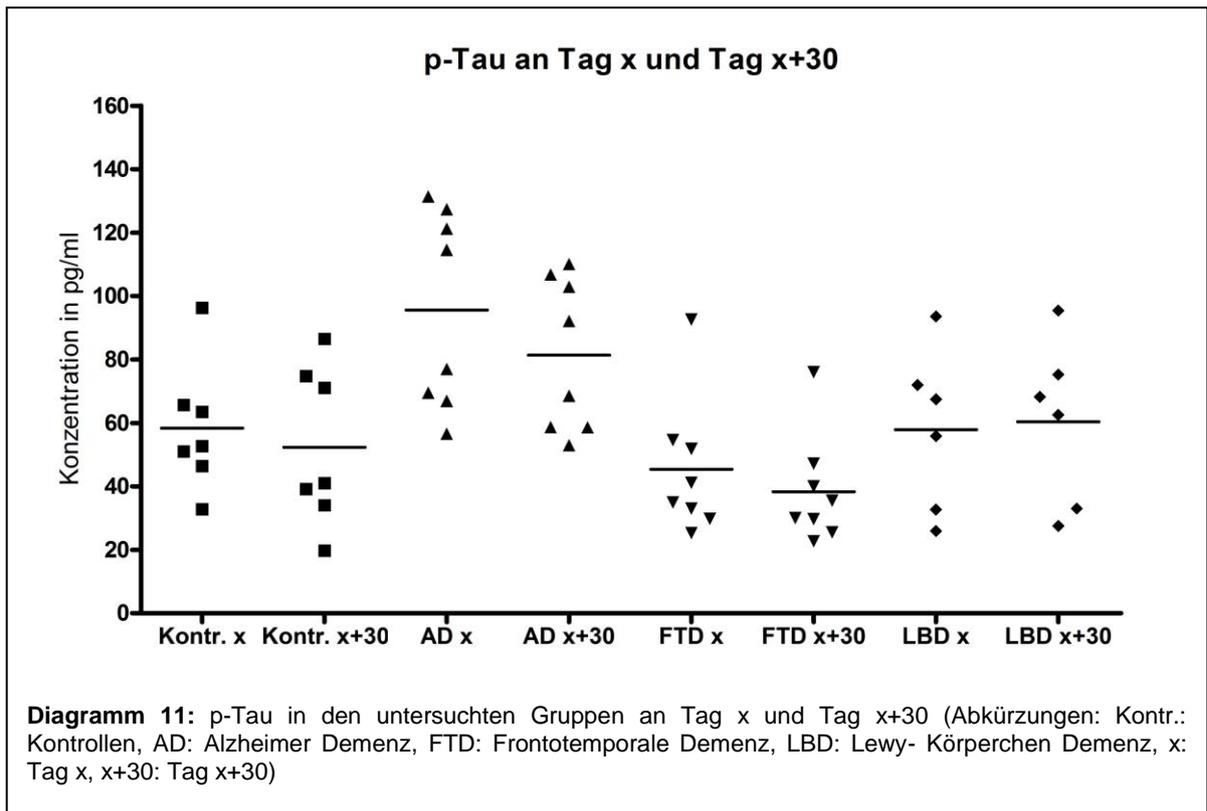
Die Mittelwerte der Phospho-Tau 181 (p-Tau)- Konzentrationen an Tag x unterliegen alle einer Normalverteilung und weisen eine Varianzhomogenität auf. Die Werte der Kontrollgruppen liegen im Mittelfeld im Vergleich zu den anderen Gruppen und haben die geringste Standardabweichung. Die Mittelwerte der Alzheimer Demenz (AD)- Gruppen erreichen das höchste Niveau mit einer p- Tau- Konzentration von 95,60 pg/ml und haben sogleich auch die größte Streubreite. Einen statistisch signifikanten Unterschied findet man bei dem Vergleich der AD- Gruppe mit der frontotemporale Demenz (FTD)- Gruppe ( $p=0,005$ ). Verglichen mit den anderen Gruppen konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Die p-Tau- Konzentration der FTD- Proben haben die niedrigsten Werte mit 45,40 pg/ml. Eine Signifikanz konnte nur zu der Gruppe der AD- Proben ermittelt werden. Die Lewy-Körperchen Demenz (LBD)- Proben haben ein ähnliches Niveau wie das der Kontrollproben. Sie weisen zu keiner weiteren Gruppe einen signifikanten Unterschied auf.

Diagnose	n	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrollen	7	52,35	24,91
AD	8	81,34	24,06
FTD	8	38,36	17,16
LBD	6	60,35	25,86

**Tabelle 8:** Anzahl der Patienten, Mittelwerte der p-Tau - Konzentrationen in pg/ml und Standardabweichungen in pg/ml an Tag x+30 (Abkürzungen: AD: Alzheimer Demenz, FTD: Frontotemporale Demenz, LBD: Lewy-Körperchen Demenz, n: Fallzahl)

Die Mittelwerte der p-Tau- Konzentration an Tag x+30 sind normalverteilt und weisen eine Varianzhomogenität auf. Die Werte der Kontrollgruppe liegen mit 52,35 pg/ml im Mittelfeld der untersuchten Gruppen. Die AD- Werte stellen erneut das Maximum aller Werte dar, liegen mit ihrer Streubreite aber nah bei den anderen Gruppen. Im Vergleich zu den FTD- Proben kann ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p= 0,01$ ) dargestellt werden. Verglichen mit den anderen Gruppen kann keine Signifikanz festgestellt werden. Die Konzentrationen der FTD- Proben bilden das Minimum im Gruppenvergleich. Zudem weisen sie die niedrigste Standardabweichung auf. Statistische Signifikanz kann nur zu der AD- Gruppe hergestellt werden.

Die Werte der LBD- Gruppe liegen im Mittelfeld und weisen keine statistische Signifikanz im Vergleich zu den anderen Proben auf.



Mithilfe des T- Testes verbundener Stichproben konnte herausgearbeitet werden, dass sich die Gruppen der AD- Werte, der FTD- Werte und der LBD- Werte signifikant nach 30 Tagen verändern.

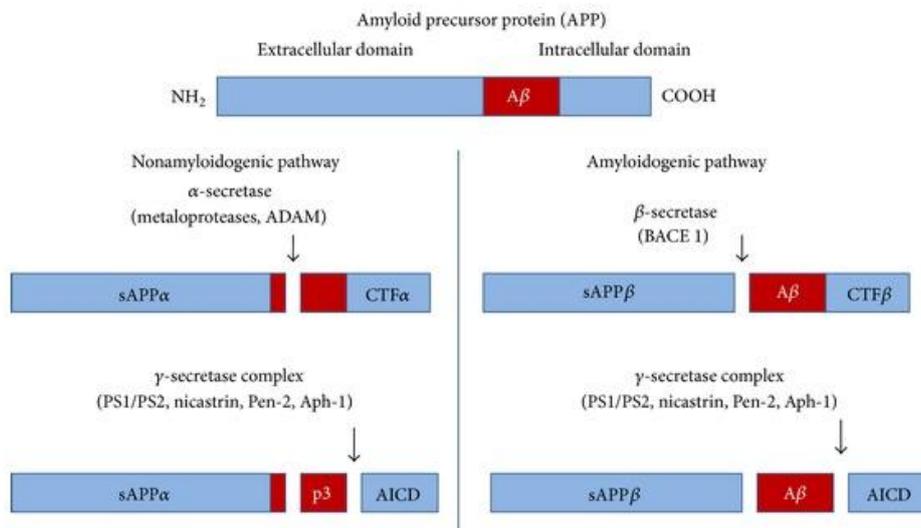
Die Proben der Kontrollgruppen sinken minimal ab. Die der AD- Gruppe sinken um ca. 15 pg/ml. Es ergibt sich daraus eine Signifikanz von  $p= 0,001$ . Auch die FTD- Werte sinken im zeitlichen Verlauf. Auch hier ist dieser Unterschied signifikant ( $p= 0,004$ ). Die minimale Erhöhung der p-Tau- Werte in der LBD- Gruppe ist mit  $p= 0,049$  knapp signifikant.

## 4. Diskussion

### 4.1. Experimentreihe A und B

#### 4.1.1. Veränderungen der $\beta$ -Amyloidkonzentrationen (1-42) gesunder Probanden

Das  $\beta$ -Amyloid (1-42) ( $A\beta$ ) ist ein Protein, welches durch enzymatische Spaltung aus dem Amyloid Precursor Protein (APP) hervorgeht. Das APP ist ein Transmembranprotein vom Typ 1. Das bedeutet, dass die Membran nur einmal durchquert wird (singlepass). Ursprünglich wird es im endoplasmatischen Reticulum synthetisiert und anschließend durch den Golgi-Apparat der Trans-Seite des Golgi-Apparates zugeführt und letztendlich in die Zellmembran integriert. Im Golgiapparat der Neuronen wurden bisher die höchsten Konzentrationen des APP gemessen (Xu, Sweeney, & Wang, 1997).



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der proteolytischen Spaltung des APP (Carrill-Mora, Luna, & Colin-Barenque, 2014)

Das APP kann über zwei verschiedene Wege enzymatisch zerlegt werden, den sogenannten nicht- Amyloid- bildenden Pfad und den amyloiden Pfad (siehe Abbildung 7). Im nicht- Amyloid- bildenden Prozess erfolgt die proteolytische APP-Spaltung durch die  $\alpha$ -Secretase. Dies ist eine ADAM- Metalloprotease (englisch: *a desintregryn and metalloproteinase*), welche im Bereich des  $\beta$ - Amyloid- Fragment enzymatisch wirkt. Durch dessen Spaltung entstehen nun zwei größere lösliche

Fragmente. Einerseits das lösliche sAPP, welches verschiedene neuroprotektive und neurotrophe Eigenschaften hat. Das andere C-terminale Fragment CTF $\alpha$  wird wiederum erneut gespalten durch einen  $\gamma$ -Secretase-Komplex. Dabei entsteht das p3-Fragment, ein  $\beta$ -Amyloid 17-40/42 Protein, und ein neuroprotektives, intrazellulär verbleibendes APP-Fragment (AICD) (Postina, 2008).

1991 wurde erstmals die Amyloid-Hypothese von John Hardy und David Allsop formuliert. Sie ist auch heute noch die am meisten wissenschaftlich unterstützte These zur Ätiologie der Alzheimer Demenz (AD). Die Hypothese besagt, dass Produktion und übermäßige Akkumulation von  $\beta$ - Amyloid intra- sowie extrazellulär zu den auslösenden Faktoren der progressiven neuronalen Zerstörung gehören (Eckman & Eckman, 2007). Das  $\beta$ -Amyloid ist ein Protein aus 39- 42 Aminosäuren und entsteht im amyloiden Spaltungspfad des APP. Hierbei wird das transmembrane Protein durch die  $\beta$ -Secretase proteolytisch in ein lösliches N-terminales Fragment sAPP $\beta$  und ein an der Membran verbleibendes Fragment CTF $\beta$  gespalten. Das aktive Zentrum der  $\beta$ -Secretase, mit dem es seine enzymatische Funktion ausübt, befindet sich in der extramembranären Domäne und enthält zwei Aspartat-Reste. Daher wird die Secretase als eine Aspartatprotease bezeichnet. Das CTF $\beta$  wird anschließend durch den  $\gamma$ -Secretase-Komplex erneut geteilt. Es entsteht wieder das AICD Fragment und das  $\beta$ -Amyloid- Protein (A $\beta$ ) (Nathalie & Jean-Noel, 2008).

Im Liquor liegt das A $\beta$  entweder als freies lösliches Protein, als Oligomer oder gebunden an Trägerproteine vor. Diese Trägerproteine können das  $\alpha$ -2-Makroglobulin (Fabrizi, Businaro, Lauro, & Fumagalli, 2001), Apolipoprotein E (Strittmatter, Saunders, & Schmechel, 1993), Apolipoprotein J (Ghisso, Matsubara, & Koudinov, 1993), Albumin (Biere, et al., 1996), low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP) (Herz & Marschang, 2003) und das Transthyretin (Schwarzmann, Gregori, & Vitek, 1994) sein. Da das A $\beta$  (1-42) eine größere Tendenz zur amyloiden Plaquebildung hat als das A $\beta$  (1-40), spielt es eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung und ist damit ein Dreh- und Angelpunkt der Biomarkerbestimmungen (Selkoe, 1996).

Bei der Quantifizierung des A $\beta$  (1-42) ist es wichtig, den Liquor in Polypropylenröhrchen (PP) aufzufangen, zu verarbeiten und zu lagern. In diversen Studien konnte durch Verwendung von Polystyrolröhrchen (PS) eine signifikante Senkung der A $\beta$  (1-42)- Konzentration nachgewiesen werden (Bjerke, et al., 2010), (Vanderstichele, Blennow und D'Heuvaert 1998), (Lewczuk, Beck, & Esselmann,

2006). Die Effekte auf die Tau- Proteine sind wesentlich geringer ausgeprägt (Andreasen, et al., 1999). Dies ist vermutlich auf die hydrophobischen Eigenschaften einzelner Liquor-bestandteile und die daraus resultierende Adsorption an die Röhrcheninnenwand zurückzuführen (Bjerke, et al., 2010). Bei der Verwendung von Glasröhrchen konnte ebenfalls eine verminderte Konzentrationen ermittelt werden, welche bisher aber keine Signifikanz im Vergleich zu PP- Röhrchen ergab.

In der Experimentreihe A sollte der zeitliche Verlauf der A $\beta$ -Konzentration dargestellt und eventuelle Änderungen aufgezeigt werden. Es fanden mehrere unterschiedliche Versuche statt, in der Absicht die Konzentrationsverläufe zu beeinflussen. Dies geschah durch die Zugabe diverser Zusätze in zeitlicher Beobachtung von maximal 90 beziehungsweise 140 Tagen.

In Probe I (Diagramm 1a) wurden Konzentrationsanstiege bei allen drei Lagerungstemperaturen (4°C, -20°C, -80°C) beobachtet. Trotz unterschiedlich niedriger Temperaturen konnte keiner Konzentrationszunahme entgegen gewirkt werden. Es fanden somit temperaturunabhängige Prozesse statt, die zu einem maximalen Anstieg des A $\beta$  (1-42) auf bis zu 163% des Nullwertes führten. Dies könnten beispielsweise proteolytische Vorgänge sein, die ein Entstehen weiterer  $\beta$ -Amyloidproteine begünstigen. Sei es im Sinne einer Neuproduktion aus dem Ausgangsprotein APP oder dem CTF $\beta$  oder einem Zerfall im Liquor befindlicher akkumulierter löslicher A $\beta$ -Oligomere. Eine weitere Möglichkeit ist die Aufhebung der Bindung zu den verschiedenen Trägerproteinen und somit ein Freigeben des quantifizierbaren A $\beta$  (1-42). Schließlich ist der größte Anteil des im Plasma und Liquor befindlichen A $\beta$  (1-42) an Proteine gebunden (Biere, et al., 1996), (Koudinov, Koudinova, Kumar, Beavis, & Ghiso, 1996). Somit ergäbe sich reichlich Kapazität für einen A $\beta$  (1-42)- Konzentrationsanstieg.

Natriumacid (Na<sub>3</sub>N), wie in Probe III verwendet, wirkt auf die meisten gramnegativen Mikroorganismen bakteriostatisch, läßt jedoch das Wachstum grampositiver Bakterien wie Streptokokken und das einiger Staphylokokken-Stämme ungehindert zu (Snyder & Lichstein, 1940). Dessen Einsatz sollte die Konzentrationsveränderungen des A $\beta$  (1-42) durch eine Inhibierung des Eukaryontenmetabolismus verhindern. In Diagramm 2a sind jedoch unabhängig von der Verwendung des Natriumacid identische Konzentrationsanstiege zu

sehen. Natriumacid hat in den Versuchen somit keinen Einfluß auf die Konzentrationszunahme des A $\beta$  (1-42). Die Veränderungen des Proteins wären beispielweise zu erklären, wenn deren Erhöhung unabhängig vom Metabolismus der enthaltenen Eukaryonten ist. Oder aber die „falschen“ Mikroorganismen im Stoffwechsel gehindert wurden, da Natriumacid schließlich nur ein begrenztes Inhibierungsspektrum aufweist (Snyder & Lichstein, 1940).

In Versuchen (Fronek, Lange, Spreer, Eiffert, & Nau, 2011) bei denen CSF-Proben (englisch: cerebrospinal fluid) mit einer hohen Konzentration an *Pseudomonas aeruginosa* kontaminiert wurden, konnte festgestellt werden, dass diese einen erheblichen Einfluss auf die A $\beta$  (1-42)- Konzentration haben. Diese war nach Kontamination nämlich nicht mehr erfassbar. Der Effekt konnte unter der Kontamination verschiedener grampositiver Bakterien jedoch nicht wiederholt werden. Wurde der Probe nun vor Kontamination Na<sub>3</sub>N in 0,1%- iger Konzentration zugesetzt, blieb der Konzentrationsabfall aus (Fronek, Lange, Spreer, Eiffert, & Nau, 2011). Diese Beobachtung unterstreicht nochmals unsere Schlussfolgerung, dass die Zugabe von Natriumacid einer Konzentrationserhöhung nicht entgegenwirkt, aber durchaus protektive Effekte bei bakterieller Kontamination aufweist. Daher sollte dessen prophylaktischer und regulärer Einsatz bei einer verzögerten Einlagerung bei -80°C (beispielsweise bei längeren Transporten) überdacht werden.

Der verwendete Proteaseinhibitor (PI) bei Probe IV ist ein spezifischer Inhibitor für Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen. Unter Anwendung dieser, sollte unter der Annahme, dass proteolytische Reaktionen die Konzentrationszunahme des A $\beta$  (1-42) bewirken, die Zunahme ausbleiben. Nach 90 Tagen war jedoch eine höhere Konzentration bei der Probe mit PI, als bei der Probe ohne PI bei einer Lagerungstemperatur von -20°C zu verzeichnen. Dieses Ergebnis spricht gegen die oben genannte Hypothese, da die Konzentrationszunahme nicht verhindert werden konnte. Angriffspunkt des PI war unter anderem die  $\beta$ - Secretase (BACE1), eine Aspartatprotease (Carrill-Mora, Luna, & Colin-Barenque, 2014). Diese liefert durch proteolytische Spaltung das Substrat für die A $\beta$  (1-42)-Produktion. Die Inhibierung der  $\beta$ - Secretase ist bereits eine vielversprechende Methode, die A $\beta$  (1-42)- Produktion und die daraus resultierende Amyloidplaqueentstehung bei Alzheimer Demenz (AD) Patienten zu drosseln. In klinischen Studien kommt bereits der Inhibitor MK-8931 zum Einsatz. Der Inhibitor

bewies in der klinischen Versuchsphase I beeindruckende Wirkung. Er reduzierte die A $\beta$ -Konzentrationen um 92% und wurde von den Patienten gut toleriert (Menting & Claassen, 2014).

Es stellt sich somit die Frage, weshalb der hier angewandte PI nicht die gewünschte Wirkung zeigte. Eine Möglichkeit wäre, dass der Inhibitor scheinbar nicht spezifisch genug für die  $\beta$ -Secretase ist und diese somit nicht gehemmt werden konnte. Oder aber die  $\beta$ -Secretase befindet sich gar nicht oder nur zu einem sehr geringen Anteil im entnommenen Liquor und kann deshalb gar nicht erst inhibiert werden und ist somit nur effektiv in vivo hemmbar. Dieser Effekt ließe sich durch die vorwiegende Lokalisierung des Enzyms im sauren intrazellulären Kompartimenten erklären (Vassar, Kovacs, Yan, & Wong, 2010).

Für Probe V wurden die Konzentrationen derer verglichen, die nach sofortiger Liquorgewinnung mithilfe vom flüssigen Stickstoff (-196°C) schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert wurden und derer, die ausschließlich bei -80°C langsam eingefroren wurden. Der flüssige Stickstoff wurde unter der Annahme verwendet, dass die Konzentrationsveränderungen des A $\beta$  (1-42) im Zeitfenster, von der Zugabe eventueller Zusätze bis zum schrittweisen Erreichen der Tiefkühltemperatur von -80°C, durch das Einwirken diverser enthaltener Enzyme geschehen. Um dieses Zeitfenster auf ein Minimum zu reduzieren, wurden die jeweiligen Proben schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert, so dass keine oder lediglich minimale Veränderungen zu verzeichnen sein sollten. Dies ist aber nicht der Fall. Das Konzentrationsniveau der schockgefrorenen Probe übersteigt sogar das der nicht-schockgefrorenen Probe an Tag 90. Einer Konzentrationszunahme konnte in diesem Versuch also nicht entgegengewirkt werden. Es wurde eher ein gegenteiliger Effekt beobachtet. Dieser ließe sich wiederum durch eine ähnliche Wirkung, wie oben vermutet, erklären. Durch das Schockfrieren werden im Liquor befindliche Proteine und Proteasen stabilisiert (Le Bastard, De Deyn, & Engelborghs, 2015). Dies beugt einem Verlust des A $\beta$  (1-42), dessen Proteasen und anderer Proteine vor. Die dadurch höhere Ausgangskonzentration aller Komponenten führt durch diverse unbekannte Prozesse letztlich zu einer erhöhten Endkonzentration des A $\beta$  (1-42) im Vergleich zu den nicht- schockgefrorenen Proben.

In der Versuchsreihe B wurde der Konzentrationsverlauf unter Verwendung eines  $\gamma$ -Secretaseinhibitors beobachtet. Bei dem zu inhibierenden Enzym handelt es sich um einen Proteinkomplex aus 4 Untereinheiten. Zu diesen zählen Nicastrin, PEN-2 (presenilin enhancer 2), Aph-1 (anterior pharynx-defective 1) und PS1 (Presinilin1) und PS2 (Presinilin2). Wobei die beiden Presinilin-Komplexe das katalytische Zentrum bilden (Carrill-Mora, Luna, & Colin-Barenque, 2014). Die  $\gamma$ -Secretase ist ein integrales Membranprotein (Moore, Diehl, Selkoe, & Wolfe, 2000). Eine Mutation der Gene, welche das Protein PS1 codieren, sind bei ca. 80% der Patienten zu finden, die an der familiären AD (FAD) erkrankt sind. Diese Form der Demenz wird autosomal dominant vererbt und ist charakterisiert durch einen frühen Krankheitsbeginn ( $\leq 65$  Jahre) und eine erhöhte Schwere der Krankheit. Auslösende Mutationen können auch das APP sowie die PS2 betreffen (Sepulveda-Falla, Barrera-Ocampo, Hagel, Korwitz, & Vinueza-Veloz, 2014). Daher spielt die Inhibierung der  $\gamma$ -Secretase für die pharmakologische Verwendung eine zentrale Rolle in Studien. Einerseits im Rahmen der AD-Behandlung, andererseits für die Behandlung diverser onkologischer Erkrankungen (Rizzo, et al., 2008). Ein Anstieg der A $\beta$  (1-42)-Konzentrationen ließ sich zwar immer verhindern, problematisch sind jedoch die zahlreichen Nebenwirkungen, die vor allem den Magen-Darm-Trakt betreffen (Golde, Koo, Felsenstein, Osborne, & Miele, 2013).

Über einen Beobachtungszeitraum von 90 Tagen und einer Lagerungstemperatur von 4°C ließ sich eine konstante A $\beta$  (1-42)-Konzentration feststellen (Diagramm 5). D.h. dass der Einsatz des  $\gamma$ -Secretase-Inhibitors einen signifikanten Konzentrationsanstieg verhindern konnte. Diese Feststellung bestätigt nochmals die o.g. Effekte des Secretaseinhibitor in vitro.

#### **4.1.2 Veränderungen der Gesamt-Tau-Konzentrationen gesunder Probanden**

Das Tau-Protein (h-Tau) kommt überwiegend in dem zentralen und peripheren Nervensystem des Menschen vor. Es ist aber auch in der Lunge, den Nieren und dem Hoden präsent (Gu, Oyama, & Ihara, 1996). Im Nervensystem konzentriert sich das Tau-Protein hauptsächlich auf die axonalen Bereiche. Nachweisbar ist

es sowohl in den somatodendritischen Kompartimenten (Tashiro, Hasegawa, Ihara, & Iwatsubo, 1997) und den Oligodendrozyten (Klein, et al., 2002).

Im menschlichen Gehirn sind sechs verschiedene Isoformen des Tau-Proteins auszumachen. Das Tau- Vorkommen in der grauen Substanz der Großhirnrinde ist bis zu zweimal größer, verglichen mit dem der weißen Substanz oder des Kleinhirns (Majounie, et al., 2013). Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich durch das Einfügen eines aminoterminalen Inserts von 29, beziehungsweise von 58 Aminosäuren Länge und einer zusätzlichen Mikrotubulibindung in der C-terminalen Region. Bisher konnten sechs unterschiedliche ELISA-Methoden entwickelt werden, die eine Messung des an unterschiedlichen Epitopen phosphorylierten Taus erlauben. Diese umfassen Tau, phosphoryliert an Threonin 181 (Vanmechelen, et al., 2000), Threonin 181+231 (Blennow, Wallin, et al. 1995), Serin 199 (Ishiguro, et al., 1999), Threonin 231 und Serin 235 (Ishiguro, et al., 1999), Threonin 231 (Kohnken, et al., 2000) und Serin 396+404 (Hu, et al., 2002). Das Tau- Protein ist ein hydrophiles Protein und gehört zu der Familie der entfalteten, Mikrotubuli- assoziierten Proteine (MAP). Es ist üblicherweise hitzestabil und verliert durch eine Säurebehandlung nicht die ursprüngliche Funktion (Cleveland, Hwo, & Kirschner, 1977). Biophysikalische Studien (Sergeant, et al., 2008) fanden heraus, dass die Polypeptidkette des Tau- Proteins äußerst flexibel und beweglich ist und nur wenige Sekundärstrukturen, wie die der  $\alpha$ -Helix, des  $\beta$ -Strang oder der Polyprolin II-Helix, beinhaltet. Primärsequenzanalysen ergaben, dass das Tau- Protein drei wichtige Domänen enthält, die für die charakterisierenden Eigenschaften verantwortlich sind. Zu denen zählen ein saurer N- terminaler Abschnitt, eine Prolin-reiche Region und eine basische C-terminale Domäne. Durch die zwei gegensätzlichen Ladungen der Terminalbereiche entsteht ein Dipolcharakter innerhalb des Proteins (Sergeant, et al., 2008). Dieser Dipol ist ausschlaggebend für die Interaktionen zwischen dem Tau- Protein und dem des Mikrotubulus und anderen Partnern, als auch für die Innenfaltung des Proteins und dessen Aggregation (Mandelkow & Mandelkow, 2012). Physiologische und pathologische Vorkommen des Tau-Protein umfassen folgende Varianten: Monomere, Dimere/Trimere, kleine lösliche Oligomere, nicht- lösliche granulöse Oligomere, Filamente, Pretangles, große nicht-fibrilläre Tau- Aggregate, Neurofibrilläre Tangles und sog. Ghost- Tangles (Brunden, Trojanowski, & Lee, 2008).

Das Tau- Protein ist ein multifunktionales Protein. Es hat zahlreiche Bindungspartner, dabei inbegriffen Signalmoleküle, zytoskeletale Elemente und Lipide (Kosik, 1993). Die wichtigste Funktion besteht jedoch darin, an den Mikrotubulus zu binden. Dadurch ist es an dessen Aufbau, Stabilisierung und Regulierung des axonalen Transport via Motorproteine maßgeblich beteiligt (Grundke-Iqbal, et al., 1986). Darüber hinaus nimmt es an der zellulären Signaltransduktion teil. Dies ist möglich durch eine Aktivitätenmodulation der sogenannten Src- und Fyn- Kinasen sowie des PSD95, ein Protein aus der Gruppe der Guanylat-Kinasen. In der nukleolären Region der Zelle kann das Tau-Protein sogar bei der DNA- Reparatur sowie der Hitzeschockantwort beteiligt sein (Mietelska-Porowska, Wasik, Goras, Filipek, & Niewiadomska, 2014). Eine Tau-Dysfunktion führt wiederum zu einer Mikrotubulidesintegration, einer Tau-Filamentausbildung und intraneuronaler Signalstörungen, die letztendlich im Zelltod münden (Mietelska-Porowska, Wasik, Goras, Filipek, & Niewiadomska, 2014).

Das h-Tau ist ein hoch reguliertes Protein und unterliegt einer komplexen Reihe posttranslationaler Veränderungen. Es wird unter anderem modifiziert durch Phosphorylierung, Isomerisierung, Glykierung, Nitrierung, Oxidation, Ubiquinierung und proteolytischer Spaltung (Mondragón-Rodríguez, Basurto-Islas, Binder, & García-Sierra, 2009). Abnormale posttranslationale Modifizierungen sind höchstwahrscheinlich der Hauptgrund für das Entstehen nicht- funktionierender Proteine.

In der Experimentreihe A sollte nun erneut der Verlauf der Tau-Proteinkonzentration über einen Zeitraum von 90 bis maximal 140 Tag dargestellt werden.

In Probe I wurde der native Liquor verwendet. Man erkennt über einen Zeitraum von 140 Tagen einen stetig schwankenden Verlauf der Konzentration (Diagramm 1b). Dieser erscheint zudem unabhängig von der Einlagerungstemperatur. Die Tendenz des Verlaufes ist stets dieselbe. Lediglich die 4°C- Probe unterliegt geringfügig kleineren Schwankungen im Vergleich zu denen der -20°C- oder -80°C- Probe. Letztendlich erreichen an Tag 140 die Proben aus -20°C und -80°C knapp wieder ihren Ausgangswert mit circa 101%. Diese Feststellung entspricht einer Studie, die keine signifikanten Änderungen der Tau- Konzentration während einer 6- monatigen Lagerung bei -80°C zeigen konnte (Sunderland, et al., 2003).

Wie oben bereits beschrieben, unterliegt h-Tau stetigen Modifizierungen, sei es Phosphorylierung, proteolytischer Spaltung oder Oxidation. All diese Prozesse könnten dazu beitragen, dass das Protein für den verwendeten Immunoassaytest erschwert nachzuweisen ist. Da dieser spezifisch auf bestimmte Tau epitope festgelegt ist. Durch die andauernden Veränderungen wechselt das Protein nun vom quantifizierbaren Status gelegentlich zum nicht-quantifizierbaren Status. Dies könnte eine Erklärung für den schwankenden Konzentrationsverlauf des h-Tau sein.

In Probe III wurde das bakteriostatisch wirkende Natriumacid ( $\text{Na}_3\text{N}$ ) verwendet. Stets in der Annahme den Eukaryontenstoffwechsel zu behindern und somit den Konzentrationsveränderungen des h-Tau vorzubeugen. Diese These konnte im Versuch jedoch nicht bewiesen werden. Die Werte der Probe mit  $\text{Na}_3\text{N}$  entwickelten tendenziell sogar höhere Konzentrationen, als die ohne  $\text{Na}_3\text{N}$  (Diagramm 2b). Dies ließe eher die Vermutung zu, dass Eukaryonten und deren Metabolismus eine Konzentrationszunahme verhindern. Werden diese nun gehemmt, sind nun größere Konzentrationsveränderungen darzustellen. Am Tag 90 werden jedoch wieder ähnliche Konzentrationswerte beider Proben erreicht. Dies könnte durch eine allmähliche Abnahme der Bakterien und die somit einhergehende verminderte Inhibierung bei der Probe ohne  $\text{Na}_3\text{N}$  erklärt werden. Die Minderung der Bakterienanzahl könnte beispielsweise auf fehlende Nahrungsressourcen oder schlechte, lebenslimitierende Umgebungsbedingungen zurück geführt werden. Durch die nun verringerte Hemmung des Bakterienstoffwechsel auf die h-Tau-Produktion oder Modifikationen, steigt die h-Tau Konzentration wieder auf das Niveau der Probe mit  $\text{Na}_3\text{N}$  an, bei der Eukaryonten dauerhaft im Stoffwechsel behindert wurden.

Die Studie von Fronek (Fronek, Lange, Spreer, Eiffert, & Nau, 2011) bewies einen protektiven Effekt bei einer Kontamination durch eine hohe Konzentration an *Pseudomonas aeruginosa*. Dem signifikanten Konzentrationsabfall des h-Tau konnte durch den Einsatz von  $\text{Na}_3\text{N}$  entgegengewirkt werden. Falls in den Liquorproben der hiesigen Versuche eine Kontamination grampositiver Bakterien vorlag, hat das  $\text{Na}_3\text{N}$  zumindestens einem Konzentrationsverlust durch destruktive Prozesse vorgebeugt und die entstandenen Konzentrationsveränderung beruhen auf anderen Einflüssen.

Für Versuch V kam der Einsatz von flüssigen Stickstoff zum Einsatz (Diagramm 3b). Dessen Verwendung erbrachte jedoch keinen Vorteil. Den Konzentrationsveränderungen des h-Tau war dadurch nicht entgegen zu wirken. Diese Feststellung wurde bereits mehrfach erhoben und unter anderen in der Alzheimer-Biomarker- Standardisierungsinitiative festgehalten (Vanderstichele, et al., 2012). In dieser heisst es, dass bisher keinerlei Daten einen Benefit in der Verwendung von flüssigen Stickstoff erbrachten. Die Verwendung dessen sei lediglich teuer und unpraktikabel, da es nicht für jedes Laboratorium umzusetzen sei.

#### **4.1.3. Veränderungen der Phospho-Tau 181- Konzentrationen gesunder Probanden**

Das phosphorylierte Tau (p-Tau) entspricht dem Tau- Protein (h- Tau). Jedoch mit dem Unterschied, das dieses an der Position 181 an der Aminosäure Threonin, phosphoryliert ist. Die Angliederung von Phosphatgruppen an Tau wird durch dessen Konformation und dem Gleichgewicht zwischen den Aktivitäten der Tau-Kinasen und -Phosphatasen bestimmt. Kinasen sind Enzyme, die in der Lage sind einen Phosphatrest von einem Nucleosidtriphosphat (zum Beispiel ATP) am Tau-Protein zu binden, während die Phosphatasen als Gegenspieler phosphorylierte Anhänge wieder entfernen. Die beteiligten Tau- Kinasen können in drei unterschiedliche Klassen unterteilt werden. Hierzu zählen die PDPK (englisch: proline- directed protein kinases), die nicht- PDPK und die TPK (Tyrosin- Protein- Kinasen) (Mietelska-Porowska, Wasik, Goras, Filipek, & Niewiadomska, 2014). Die Phosphorylierung ist an drei verschiedenen Aminosäuren möglich. Zu diesen gehören die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin. Das Anhängen eines Phosphatrestes gehört zu den häufigsten posttranslationalen Veränderungen des Proteins. Bisher konnten 85 verschiedene Stellen im h-Tau, die phosphoryliert werden können, ausgemacht werden. Bei neurodegenerativen Erkrankungen konnte festgestellt werden, das das Tau einer abnormal hohen Phosphorylierung unterliegt (Mietelska-Porowska, Wasik, Goras, Filipek, & Niewiadomska, 2014). Die Phosphorylierung des Tau- Proteins reguliert und stimuliert die Fähigkeit der Bindung am mikrotubulären System der Neuronen (Rodríguez-Martin, et al., 2013). Somit führt eine Hyperphosphorylierung zu einem Bindungsverlust an dem Mikrotubulus. Dieser Pathomechanismus ist namensgebend bei den sogenannten

Tauopathien (Dixit, Ross, Goldman, & Holzbaur, 2008). Exzessiv phosphoryliertes Tau akkumuliert in den somatodendritischen Kompartimenten der Neurone, sammelt sich an und bildet unter Umständen Neurofibrilläre Tangles (NFTs) (Götz, et al., 1995). Es gibt Quellen, die besagen das übermäßig phosphoryliertes Tau noch vor dessen Ablagerung bereits zu neuronaler Dysfunktion führt (Santacruz, et al., 2005). Mittlerweile konnte gezeigt werden, das stark phosphoryliertes Tau neuronale Funktionen beeinträchtigt, sowie die mitochondriale Atmungskette und den axonalen Transport stören (Müller, Eckert, Kurz, Eckert, & Leuner, 2010) (Mondragón-Rodríguez, et al., 2013). Allgemein wurde festgestellt, das die CSF-Konzentration (englisch: cerebrospinal fluid) bei Alzheimer Patienten des hyperphosphorylierten Tau- Proteins, das drei- bis vierfache übersteigt, verglichen mit CSF- Konzentrationen nicht- dementieller Menschen (Kopke, et al., 1993).

In den Versuchen wurde auch p-Tau im Verlauf von maximal 140 Tagen mehrfach quantifiziert.

Für Probe I (Diagramm 1c) konnte ein stetiger, temperaturunabhängiger Konzentrationsverlust dargestellt werden. Es wurden verschiedene Lagerungstemperaturen gewählt um eventuelle enzymatische Prozesse, die einen Abbau initiieren, besser zu erkennen. Da aber kein bedeutender Unterschied zu erkennen ist, kann auch von keinem proteolytischen Abbau, der durch unterschiedliche Temperaturen beeinflussbar ist, ausgegangen werden. Dies lässt eventuelle Rückschlüsse auf die allgemeine Stabilität der Proteinstruktur zu. Im Grunde unterscheidet sich das p-Tau vom h-Tau lediglich durch die Phosphorylierung an der Aminosäure Threonin an Stelle 181. h-Tau überzeugt jedoch im Vergleich dazu durch seine Stabilität, die lediglich kleinen Schwankungen unterliegt. p-Tau aber zeigt einen deutlichen Konzentrationsverlust. Diese Erkenntnis lässt vermuten, dass die zusätzliche Phosphorylierung einen Abbau beziehungsweise dessen Proteinzerfall beschleunigt. Es ist jedoch zu erwähnen, dass sich der Zerfall bei -80°C verzögert, trotz dessen aber nicht aufzuhalten ist.

Bei der Alzheimer Demenz (AD) ist das Tau-Protein unphysiologisch hoch phosphoryliert (Goedert, Spillantini, Cairns, & Crowther, 1992), die Tubulin-Bindungsaffinität geht verloren und die Mikrotubuli werden destabilisiert. Das nun im Zytoplasma frei liegende und bindungsunfähige p-Tau aggregiert zu antiparallelen Dimeren und bildet die Neurofibrillen oder PHF (englisch: paired

helical filaments), was in vitro nachweisbar ist (Crowther, Olesen, Smith, Jakes, & Goedert, 1994), (Wille, Drewes, Biernat, Mandelkow, & Mandelkow, 1992). Dies könnte den Konzentrationsverlust des p-Tau in unserem Experiment erklären.

In Diagramm 2c ist der Verlauf unter der Verwendung von  $\text{Na}_3\text{N}$  dargestellt. Dem generellen Abwärtstrend der p-Tau-Konzentration kann auch durch  $\text{Na}_3\text{N}$  nicht entgegen gewirkt werden.  $\text{Na}_3\text{N}$  sollte dem proteolytischen Abbau durch einen Eukaryontenstoffwechsel vorbeugen. Da der Konzentrationsabfall trotzdem im gleichen Maße von statten geht, kann dem Einfluß des Eukaryontenmetabolismus keine Verantwortung gegeben werden. Dies ist zumindestens zutreffend für die gramnegativen Bakterien. Die grampositiven sind durch den Einsatz von  $\text{Na}_3\text{N}$  nicht hemmbar (Snyder & Lichstein, 1940).

#### **4.1.4. Bedeutung für die Interpretation von Biomarkern**

Wir haben festgestellt, dass  $\beta$ -Amyloid (1-42) ( $\text{A}\beta$ ) eine steigende Tendenz, Gesamt-Tau (h-Tau) relativ konstant bleibt und phosphorylierte Tau 181 (p-Tau) tendenziell einen Konzentrationsverlust über eine Zeit von mindestens 90 Tagen erfährt. Es ist ein gängiges Verfahren, entnommenen Liquor den präanalytischen Prozessen zuzuführen und es bis zu der endgültigen Analyse der Demenzmarker bei  $-80^\circ\text{C}$  einzufrieren (Vanderstichele, et al., 2012). Die Dauer der Einlagerung hängt häufig davon ab, wie schnell das Labor weitere Proben zur selbigen Diagnostik erhält und kann durchaus mehrere Wochen in Anspruch nehmen. Dies wird so gehandhabt, da es preiswerter ist, die verwendeten Kits möglichst vollständig zu bestücken. Zudem ist die Analyse sehr zeitaufwendig, was ein weiteres Argument ist, Proben gesammelt zu analysieren.

Nimmt man nun an, ein Patient erfährt im Rahmen der Demenzdiagnostik eine Liquorpunktion. Wären dessen Biomarker nun hypothetisch grenzwertig i.S. einer Alzheimer Demenz (AD), das heißt  $\text{A}\beta$  leicht erniedrigt und p-Tau grenzwertig erhöht und trägt diese erfassten Konzentrationen bei einer sofortigen Quantifizierung in die dafür vorgesehenen Diagramme der Demenzkategorisierung (Kapitel 1.4.2.3.), würde sich der Verdacht einer AD erhärten. Werden aber, wie üblich, mehrere Wochen gewartet, verändern sich die Proteinkonzentrationen. Das heißt  $\text{A}\beta$  steigt in den Bereich des physiologischen Konzentrationsbereiches und

p-Tau fällt in den Bereich gesunder Probanden. Die Demenzkategorisierung würde nun das Biomarkerprofil eines gesunden Patienten widerspiegeln. Und der Patient würde aus dem Raster fallen.

Zwar stellt die Demenzkategorisierung via Liquoranalyse nur ein Puzzleteil in der Demenzdiagnostik dar, aber es ist ein sehr bedeutendes und vielfach verwendetes. Die Konzentrationsermittlung von A $\beta$  (1-42) geht mit 80 bis 90%igen Sensitivitätswerten und hohen Spezifitätswerte in der AD- Diagnostik einher (Galasko, 1998). Gleiches gilt für die Tau- Konzentrationen. Inzwischen gelten auch weitere erkrankungsspezifische Konzentrationswerte der Proteine (Sjögren, et al., 2001).

#### **4.2. Experimentreihe C**

Die ermittelten Konzentrationswerte des Liquor pools der fünf Alzheimer Demenz (AD)- Patienten entsprechen mit  $\beta$ - Amyloid (1-42) (A $\beta$ ) von 642,43 pg/ml, Gesamt- Tau (h-Tau) von 883,73 pg/ml und Phospho- Tau 181 (p-Tau) von 158,61 pg/ml dem Profil eines an AD erkrankten Patienten. Dieses lässt sich unter anderem durch die Ermittlung des Amyloid-Tau- Index (ATI) von 0,50 und das Auftragen der Konzentrationswerte in die Diagramme der Demenzkategorisierung graphisch darstellen.

In Experimentreihe C wurden Proben miteinander verglichen, die einer beziehungsweise mehrfachen Auftau-Einfrier-Zyklen unterlagen. Die Tendenz der Veränderungen der Probenwerte aus Probe 2 über einen Zeitraum von 21 Tagen entsprechen denen der Experimentreihe A (Probe 1 bei -80°C). Im Grunde entsprechen auch die Werte der Probe 1 denen der Experimentreihe A, da sich die Konzentrationswerte der Probe 1 und 2 nicht wesentlich unterscheiden.

In der Studie von N. Schoonenboom und C. Mulder (Schoonenboom, et al., 2005) wird ein Konzentrationsverlust des A $\beta$  (1-42) von bis zu 20% über die ersten drei Auftau- Einfrier- Zyklen beschrieben. Bis zum sechsten und letzten Auftau-Einfrierzyklus zeigt sich dann ein nahezu konstanter Konzentrationsverlauf. Den dort beschriebenen anfänglichen Konzentrationsverlust des A $\beta$  konnten wir bei unseren Versuchen nicht beobachten. Da aus dem Paper nicht hervorgeht über welchen Zeitraum diese Analysen gemacht wurden, könnte das gegebenenfalls

abweichende Zeitmodell eine Begründung unterschiedlicher Ergebnisse sein. Dass in unseren Versuchen ausschließlich der Liquor von AD Patienten verwendet wurde, stellt eine weitere mögliche Ursache dar. Eventuell unterliegen die Liquores anderer Erkrankungen verschiedenen zeitabhängigen Proteinveränderungen. Zu berücksichtigen ist ausserdem das Alter des von uns untersuchten Liquors. Die Liquorproben stammen aus dem Sommer 2011, wurden im Frühjahr 2013 analysiert. Darin kann eine Begründung unterschiedlicher Resultate liegen.

Die Studie von N. Le Bastard (Le Bastard, De Deyn, & Engelborghs, 2015) beschreibt einen ähnlichen Verlauf des A $\beta$  (1-42), wie die zuvor aufgeführte Studie. Es sollte allerdings auch erwähnt werden, dass R. Zimmermann (Zimmermann, et al., 2011) unsystematisch steigende Konzentrationswerte bei A $\beta$  und h-Tau beobachtete. Von einer Unabhängigkeit der A $\beta$ -Konzentrationen über wiederholte Auftau- Einfrierzyklen kann demnach nicht ausgegangen werden.

Beim Vergleich der Konzentrationsveränderungen des h-Tau lässt sich feststellen, dass die Proben, welche wiederholt aufgetaut und eingefroren wurden (Probe 1) einen stärkeren Konzentrationsverlust zeigen, als jene, die diesem Zyklus lediglich einmal unterlagen (Probe 2). Die h-Tau- Konzentration der Probe 1 sinkt bis zum dritten Zyklus. Es folgt eine Stabilisierung mit einer anschließenden Zunahme um ca. 5%. Probe 2 zeigt dabei eine geringere, jedoch stete Konzentrationsabnahme. h-Tau wird grundsätzlich als ein sehr stabiles Protein beschrieben. Auch in anderen Studien ist es bisher noch nicht gelungen, signifikante Konzentrationsunterschiede über bis zu sechs Auftau- Einfrierzyklen zu beweisen (Schoonenboom, et al., 2005), (Lachno, et al., 2011). Diese Feststellungen stimmen mit unseren Ergebnissen überein.

p-Tau zeigt für beide Proben einen nahezu konstanten Verlauf. Einen Ausnahmewert stellt dabei Probe 1 an Tag 14 dar. Dieser Wert weicht sehr stark vom sonst nahezu konstanten Konzentrationsverlauf ab. Auch weil die Konzentration sieben Tage später wieder auf den Ausgangswert fällt, kann hier von einer fehlerhaften Messung ausgegangen werden. Es bestätigt sich auch hier die angenommene hohe Stabilität des Proteins p-Tau (Lachno, et al., 2011).

### 4.3. Experimentreihe D

#### 4.3.1. Die Gruppe der Alzheimer Demenz- Proben

Das Amyloid- Precursor- Protein (APP) ist Ausgangsprotein für diverse Spaltprodukte, unter anderem dem  $\beta$ -Amyloid (1-42) (A $\beta$ ). Dieser Spaltprozess geschieht durch die enzymatische Zerlegung mittels der Enzyme der  $\beta$ -Secretase und  $\gamma$ - Secretase (Carrill-Mora, Luna, & Colin-Barenque, 2014). Da das A $\beta$ (1-42) die Hauptkomponente der senilen Plaques bei der Erkrankung der Alzheimer Demenz (AD) ist, steht dieses Protein im Fokus zahlreicher Studien. Es wurde versucht die Bedeutung des A $\beta$  (1-42) als diagnostisches Instrument zu bewerten. Die Messung des totalen A $\beta$ , unabhängig von seiner Länge (38-43), erwies sich dabei als ungeeignet. Grund dafür ist die starke Überschneidung der AD-Patienten mit den Kontroll-patienten (Lannfelt, et al., 1995). Da das A $\beta$  (1-42) schneller aggregiert (Jarret, Berger, & Lansbury, 1993) als seine Isoformen und Bestandteil der diffusen Plaques ist, konzentrieren sich die Studien hauptsächlich auf das A $\beta$  (1-42). Die Mehrheit der Studien weist einen Abfall der A $\beta$  (1-42)-Konzentration bei den AD- Patienten nach (Andreasen, et al., 1999), (Engelborghs, et al., 2008), (Hulstaert, et al., 1999), (Riemenschneider, et al., 2002), (Vanderstichele, 2000). Es gibt allerdings auch einige Artikel, die eine Erhöhung (Jensen, 1999) oder eine Kontinuität (Czernansky, Miller, & McKeel, 2002) des A $\beta$  beschreiben. Diese Diskrepanzen sind oft auf die Nutzung unterschiedlicher Analyseassays, variierender Patientenkollektivgrößen und unterschiedlicher Selektionskriterien für die Patienten zurückzuführen. Zudem existieren keine einheitlichen Vorgaben, zu welchem Zeitpunkt diese Analysen im Verlauf der Erkrankung stattfinden sollen.

Es hat sich gezeigt, dass niedrige A $\beta$  (1-42)- Level im Liquor, für eine sich entwickelnde Demenz bei Patienten mit leichten kognitiven Beeinträchtigungen, sogenannte Mild Cognitive Impairment (MCI) (Blennow und Hampel 2003), (Hansson, et al., 2006), (Riemenschneider, et al., 2002), eine vorhersagende Bedeutung haben. Es zeigten sich signifikant reduzierte A $\beta$  (1-42)- Werte bei Patienten mit einer sehr leichten Demenz (Mini Mental State Test 25-28) (Fagan, Roe, Xiong, & Mintun, 2007), (Riemenschneider, et al., 2000). In deren weiteren Verlauf entwickelten die Patienten eine ernsthafte Demenz, welche zudem von

signifikant weiter fallenden A $\beta$  (1-42)- Werten begleitet wurde. Es wurde die Vermutung aufgestellt, das A $\beta$  (1-42) als prädiktiver Wert für die Diagnostik bei AD- Patienten genutzt werden und auch als Verlaufsparemeter hilfreich sein könnte (Riemenschneider, et al., 2000).

Eine mögliche Einschränkung des A $\beta$  (1-42)- Parameter für die AD- Diagnostik sind jedoch die ebenfalls reduzierten A $\beta$  (1-42)- Level bei der frontotemporale Demenz (FTD) (Hulstaert, et al., 1999), (Sjögren, et al., 2000), der Lewy-Körperchen- Demenz (LBD) (Clark, et al., 2003), (Vanderstichele H., et al. 2000), dem Gerstmann-Straussler-Scheinker Syndrom (Clark, et al., 2003), der amyotrophen Lateralsklerose (Sjögren, et al., 2002) und der Kreuzfeld- Jakob Erkrankung (CJD) (Clark, et al., 2003), (Kapaki, Kilidereas, Paraskevas, Michalopoulo, & Patsouris, 2001).

Die A $\beta$ - Plaques werden zudem auch beim normalen Altern, der LBD und im Rahmen eines akuten Hirntraumas gefunden (Davies, et al., 1988), (McKenzie, Roberts, Gentleman, Graham, & Royston, 1994). Dies zeigt, dass A $\beta$ - Ablagerungen allein kein eindeutiges Merkmal für die AD- Erkrankung darstellen.

Um AD- Patienten von Kontrollpatienten unterscheiden zu können, liegen die durchschnittlichen Sensitivitäts- und Spezifitätswerte des A $\beta$  (1-42) bei 86% beziehungsweise 89% (Blennow K. 2004). Wie oben bereits erwähnt, zeigt die überwiegende Mehrzahl der Methoden eine deutliche Konzentrationsreduktion des A $\beta$  (1-42) um circa 50% im Verhältnis zu den Kontrollgruppen (Andreasen, et al., 1999), (Engelborghs, et al., 2008), (Hulstaert, et al., 1999), (Riemenschneider, et al., 2002). Die A $\beta$  (1-42)- Konzentrationen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt wurden, sind bei den AD-Patienten an Tag x um 60% niedriger als jene der Kontrollpatienten. Die Einzelwerte sind durchaus mit den Angaben in der Literatur vergleichbar.

Signifikante Unterschiede bezüglich der A $\beta$  (1-42)- Konzentration waren zwischen den Vergleichsgruppen AD und Kontrollen sowie AD und LBD zu finden. Die AD- A $\beta$  (1-42)- Konzentration war um beinahe ein Drittel kleiner als die der LBD. 30 Tage später waren diese Signifikanzen durch die Konzentrationsveränderungen in den verschiedenen Gruppen wieder aufgehoben. Die A $\beta$  (1-42)- Konzentration in der AD- Gruppe änderte sich in diesem Zeitraum kaum und stieg minimal um 40 pg/ml an. Das entspricht tendenziell den Beobachtungen der vorausgegangenen Versuche mit Probe I in Experimentreihe A. Die Ausprägung der Veränderungen ist hier allerdings geringer. Dies lässt sich eventuell damit erklären, dass sich das

A $\beta$  (1-42) von Gesunden und das von AD- Patienten verschieden stark verändert, begründet in der Pathophysiologie und den umgebenden Faktoren. Sei es durch unterschiedliche Ausgangskonzentrationen des Proteins an sich oder den Umstand, dass es sich bei den Plaques der AD in der Mehrzahl bereits um unlösliche Oligomere (der Vorstufe der Plaques) handeln könnte. Die Kapazität zum Konzentrationsanstieg durch Lösung dieser Oligomere wäre damit bereits von Beginn an begrenzt. Ein vergleichbarer Anstieg ist dann nicht möglich. Desweiteren wurden die Proben nicht direkt nach der Entnahme analysiert. Die Analyse fand zum Teil erst nach einer Zwischenlagerung von bis zu 168 Tagen bei -80°C statt. Durch die verzögerte Quantifizierung ist es denkbar, dass die maximale Lösbarkeit der noch vorhandenen Oligomere bereits erreicht war.

Das zweite krankheitstypische Protein der AD ist das Tau Protein (h-Tau) im Liquor. Es bildet neurofibrilläre Bündel, welche unter anderem den mikrotubulären Transport behindern. Zahlreiche Studien konnten bereits einen starken Tau-Anstieg bei einer AD- Erkrankung nachweisen (Andreasen, et al., 1999), (Blennow, et al., 1995), (Fagan, Roe, Xiong, & Mintun, 2007), (Sjögren, et al., 2000), (Czernansky, Miller, & McKeel, 2002).

Erhöhte Konzentrationswerte des gesamten Tauprotein im Liquor sind jedoch auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen festzustellen. Zu diesen zählen die FTD, der Apoplex, die kortikobasale Degeneration und die Kreuzfeld-Jakob Erkrankung (Itoh, et al., 2001). Folglich kann das Tau- Protein nicht als spezifischer Marker für die AD betrachtet werden. Aus diesem Grund rückte das phosphorylierte Tau in den Mittelpunkt der Analysen als Biomarker für die AD. Es wird angenommen, dass erhöhte Tau-Werte die Intensität des neuronalen Schadens und Untergangs reflektieren (Blennow, 2004), (Blennow, deLeon, & Zetterberg, 2006), (Blennow, et al., 1995). Diese Vermutung stützt sich auf die Beobachtung, dass nach einem Apoplex das durch Computertomographie gemessene Ausmass des Infarktes mit erhöhten Tauwerten korrelierte (Hesse, et al., 2000).

Die durchschnittliche Sensitivität und Spezifität des Tau die AD von nichtdementen älteren Kontrollpersonen zu unterscheiden, liegt bei 81% beziehungsweise 91% (Blennow, 2004), (Blennow & Hampel, 2003). In zahlreichen Studien war das Tau-Protein bei AD, verglichen mit gesunden Kontrollpatienten, um das 300% -fache erhöht (Blennow, 2004), (Blennow & Hampel, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit

wurde bei den AD- Patienten eine 200%- fache Erhöhung des Tau- Protein ermittelt. Diese liegt im Bereich der bisher publizierten Daten (Andreasen, et al., 2001), (Arai, et al., 1998), (Bibl, et al., 2006), (Blennow, Wallin, et al. 1995). Diese Tau- Werte waren alle normalverteilt. Die Konzentration an Tag x ist im Vergleich zu der Kontroll- und der FTD- Gruppe signifikant erhöht. Beide Gruppen zeigen deutlich niedrigere Werte. Diese Signifikanz bleibt auch noch 30 Tage später bestehen. Das ist möglich, da es in der AD- Gruppe während dieser 30 Tage zu keiner signifikanten Konzentrationsveränderung kommt. Auch hier zeigt sich die bereits festgestellte Proteinstabilität.

Das Tauprotein unterliegt unter anderem einer übermäßigen Phosphorylierung an verschiedenen Aminosäuren. Für diesen Zweck wurden ELISA's entwickelt, welche in der Lage sind diese Phosphorylierungen spezifisch zu detektieren und letztendlich zu quantifizieren. Inzwischen erkennen die ELISA's Phosphorylierungen an Threonin 181, Threonin 231 und Serin 199, 235, 396 und 404 (Blennow & Hampel, 2003). Aufgrund der Phosphorylierung ist es dem Tau nahezu unmöglich am Mikrotubulus zu binden und zu stabilisieren. Dies führt unter anderem zu einer Axondegeneration (Mandelkow & Mandelkow, 2012). Das nun gestörte Gleichgewicht des Tau, führt zu einem Konzentrationsanstieg im Zytosol des ungebundenen Tauproteins und daraus resultierend zur Fehlfaltung und Aggregation. Dies führt wiederum zu dystrophischen Neuronen und den neurofibrillären Bündeln (NFT) (Ballatore, Lee, & Trojanowski, 2007). Hampel H. (Hampel, et al., 2004) verglich die Genauigkeit des p-Tau 231, p-Tau 181 und p-Tau 199 in der Nutzung zur Abgrenzung der AD von der FTD, LBD, vaskulärer Demenz und den Kontrollpatienten. Sie fanden heraus, dass alle drei p-Tau-Proteine im Falle einer AD signifikant erhöht waren, verglichen mit den anderen Gruppen.

Patienten, die einen Apoplex erlitten, konnten keine erhöhten p-Tau- Werte nachgewiesen werden (Hesse, et al., 2001). Im Gegensatz dazu stehen erhöhte p-Tau 181- Werte (p-Tau) bei Patienten mit Multipler Sklerose. Eine Erkrankung die mit axonalen Schäden einhergeht (Bartosik-Psujek & Stelmasiak, 2006). Diese Datenlage lässt die Vermutung zu, dass das p-Tau ein AD- spezifischer Wert sein könnte, da es nicht wie das Tau- Protein den neuronalen Untergang charakterisiert. Statt dessen steht es mit den hyperphosphorylierten Tau enthaltenden neurofibrillären Bündeln in Verbindung (Buerger, et al., 2006).

Die durchschnittliche Sensivität und Spezifität zur Unterscheidung von AD und den Kontrollen lag bei den bisherigen Veröffentlichungen bei 81% beziehungsweise bei 91% (Blennow, 2004). Bei allen Studien war das p-Tau bei der AD- Gruppe signifikant erhöht zur Kontrollgruppe (Blennow, Wallin, et al. 1995), (Buerger, et al., 2002), (Ishiguro, et al., 1999). Diese Zahlen nehmen jedoch Bezug auf Untersuchungen bei denen das Tau an den verschiedenen Tau-Phosphorylierungsstellen gemessen wurde. Die vorliegenden Ergebnisse aus unserem Versuch entsprechen nicht vollständig den oben genannten Studien. Zwar ließ sich eine Erhöhung des p-Tau 181 in der AD- Gruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen feststellen, allerdings war die Differenz nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es lag lediglich eine Signifikanz beim Vergleich der AD- Proben mit den FTD- Proben vor. Die Signifikanz blieb auch 30 Tage später weiterhin bestehen. Diese Abweichung zu den Studienergebnissen lässt sich unter Umständen durch die geringe Patientanzahl erklären, da das Ergebnis lediglich als Tendenz zu werten ist. Mit einer größeren Anzahl von Probanden, wäre eventuell ein signifikanter Unterschied das Ergebnis gewesen. Ein weiterer Grund könnte die Tatsache sein, dass die p-Tau- Proben aus Experimentreihe A Probe I im Zeitfenster von 140 Tagen einem kontinuierlichen Konzentrationsabfall unterlagen. Da die von uns genutzten Proben teilweise bis zu 168 Tage alt waren, ist davon auszugehen, dass auch diese p-Tau- Werte dem anfänglichen Konzentrationsabfall unterlagen und somit die initiale, eventuell sogar signifikante, Startkonzentration an Tag 0 auf einem wesentlich höheren Ausgangsniveau anzusiedeln ist.

Über die Hyperphosphorylierung im Speziellen ist noch recht wenig bekannt. In einem frühen Stadium der AD kann p- Tau 231 bereits vor der Bildung der paarigen helikalen Filamente gefunden werden (van Engelen, et al., 1992). Während die Phosphorylierung von Threonin 181 und Serin 199 lediglich in späteren Stadien stattfindet und diese nur in den intrazellulären Bündeln gefunden werden kann (Augustinack, Schneider, Mandelkow, & Hyman, 2002). Dieser Umstand ist eine weitere Möglichkeit die hier vorliegende Ergebnisse zu diskutieren. Schließlich ist nicht bekannt in welchem Krankheitsstadium sich die untersuchten AD- Probanden befanden. Wenn man jeweils von einem sehr frühen Stadium ausgeht, würde dies die jeweils niedrigeren p-Tau 181- Werte erklären.

### 4.3.2. Die Gruppe der frontotemporalen Demenz- Proben

Die frontotemporale Demenz (FTD) beschreibt ein klinisches Syndrom mit einer Bandbreite verschiedener klinischer Symptome und zugrunde liegender Pathologien. Diese sind ursächlich für eine Vielzahl von Bezeichnungen, die die FTD ebenfalls beschreiben. Dazu zählen unter anderem die Pick'sche Krankheit, die Frontallappendegeneration vom nicht- Alzheimer Typ, die semantische Demenz oder auch der sogenannte Pick- Komplex (Arvanitakis, 2010). Gemäß der aktuellen Nomenklatur beschreibt die FTD die klinische Entität und die Frontallappendegeneration (FTLD) die pathologische Entität.

Das Hauptsymptom der FTD ist eine langsam fortschreitende Demenz, die sich meist mit einer Verhaltens- oder einer Sprachstörung manifestiert. Die Gedächtnisfunktion und das räumliche Vorstellungsvermögen bleiben in frühen Stadien der Erkrankung weitestgehend erhalten (McKhann, et al., 2001). Diese Merkmale und weitere lassen die Vermutung zu, dass sich diese Demenz von der Alzheimer Demenz (AD) unterscheidet und scheinbar andere Ursachen der Pathologie zugrunde liegen. Ein anderer Unterschied ist der Erkrankungsbeginn der FTD, der nach diversen Studien in den späten 50'ern liegt (Rosso, Donker Kaat, & Baks, 2003), (Hodges J. , Davies, Xuereb, Kril, & Halliday, 2003). Die Diagnosestellung der FTD gestaltet sich jedoch oft schwierig, da die Symptome anderer Demenzformen sehr ähnlich beziehungsweise gleich sind. Die Differentialdiagnosen sind meist im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen zu finden. Wobei hier die häufigste die AD ist. Es gilt also die Herausforderung, die FTD durch Alleinstellungsmerkmale von den anderen Demenzformen abzugrenzen. Zu diesen zählen neben der klinischen Untersuchung, eine Bildgebung des Gehirns und eventueller genetischer Ursachenforschung unter anderem die Analyse des Liquors auf die demenziellen Biomarker  $\beta$ - Amyloid (1-42) (A $\beta$ ), Gesamt- Tau (h- Tau) und Phospho- Tau 181 (p-Tau).

Als das vielversprechendste Protein zur Differenzierung der FTD von der AD gilt das h-Tau- Protein. Unterschiedliche Studien berichten über h-Tau- Quantifizierung bei klinisch diagnostizierten FTD- Patienten. Die Ergebnisse sind jedoch oft widersprüchlich. Einige berichten von statistisch erhöhten h- Tau- Werten (Arai, Morikowa, & Higuchi, 1997), (Green, Harvey, Thompson, & Rossor, 1999), (Riemenschneider, Wagenpfeil und Diehl 2002), während andere normale h-Tau- Werte beschreiben (Mecocci, Cherubini, & Bregnocchi, 1998). Diese

Unterschiede in der Berichterstattung könnten unter anderem darin begründet sein, dass die klinischen Diagnosen nicht immer mit den pathologischen Ergebnissen übereinstimmen. Die Diagnosestellung der FTD stellt sich als schwierig heraus, da sie sich oft auch atypisch darstellt. Beispielsweise wird die FTD gelegentlich statt der frontalen AD fehldiagnostiziert (Kramer & Miller, 2000), (Johnson, Head, Kim, Starr, & Cotman, 1999) oder aber die FTD geht mit untypischen Gedächtnisverlusten einher (Graham, Davies, & Xuereb, 2005). Klinisch- pathologische Studien ergaben, dass zwischen 15% bis 33% der Patienten mit einer klinisch gestellten FTD- Diagnose eigentlich an einer AD litten, die letztlich in einer Autopsie ermittelt wurde (Hodges, Davies, & Xuereb, 2004), (Knopman, Boeve, & Parisi, 2004). Die Mehrheit der Studien, die sich jedoch mit pathologisch gesicherten FTD- Erkrankungen beschäftigt haben, sind zu dem Schluss gekommen, dass die FTD- Proben signifikant niedrigere h-Tau- Level haben, als die der AD- Patienten. Zudem lassen sich bei der FTD signifikant höhere A $\beta$ - Werte finden verglichen mit AD- Proben. Es ließen sich jedoch keine Unterschiede zwischen den Gruppen der FTD und den gesunden Kontrollpatienten herausfinden (Bian, et al., 2008). In einer Querschnittstudie wurde zudem herausgefunden, dass die ermittelten Proteinkonzentrationen des h-Tau und A $\beta$  nicht mit dem des Krankheitsstadiums der FTD korrelieren (Bian, et al., 2008).

Diese Ergebnisse stimmen mit denen der vorliegenden Arbeit größtenteils überein. Alle gemessenen Proteinkonzentrationen der FTD- Patienten waren normalverteilt und unterschieden sich bei den Proteinen h-Tau und p-Tau signifikant von denen der AD- Proben. A $\beta$  (1-42) war zwar erhöht, aber nicht signifikant. Die Konzentrationen des h-Tau und p-Tau hingegen waren verglichen zu den AD Werten signifikant reduziert. Relevante Unterschiede zu der Kontrollgruppe der Gesunden konnten nicht festgestellt werden.

Die Gründe für die geringeren h-Tau- Werte bleiben jedoch unklar. Eine mögliche Erklärung ist die Möglichkeit, dass das lösliche h-Tau- Level im Gehirn bereits erschöpft ist und damit keine weiteren Ressourcen für einen weiteren Anstieg vorhanden sind. Dass das Tau- Protein im Gehirn abgesondert beispielsweise in der Form von filamentösen Einschlüssen, wie den sogenannten Pick- Körperchen oder auch in Form von Ballonzellen, vorliegt und dadurch auch keine Kapazitäten für einen Anstieg gegeben sind, könnte eine weitere Ursache darstellen (Grossman, Farmer, & Leight, 2005). Die Gründe für die erhöhten A $\beta$ -

Konzentrationen sind wahrscheinlich darin begründet, dass die Amyloidplaques eher ein typisches Merkmal der AD sind. Sie sind vereinzelt zwar auch bei FTD-Patienten zu finden, stellen aber kein charakteristisches Kennzeichen der FTD dar (Arnold, Han, Clark, Grossman, & Trojanowski, 2000), (Riemenschneider, Wagenpfeil, & Diehl, 2002). Somit ist das A $\beta$  (1-42) nicht in der Form der Amyloidplaques gebunden und ergibt im Gesamten eine höhere messbare Proteinmenge. Die Menge des A $\beta$  (1-42) korreliert zwar nicht mit dem des Krankheitsstadiums (Bian, et al., 2008), dafür aber mit der Schwere der kognitiven Einschränkungen (Koedam, et al., 2013). Niedrige A $\beta$  (1-42)-Konzentrationen sind mit schlechten kognitiven und exekutiven Funktionen bei der verhaltensgestörten FTD assoziiert. Da in dieser Arbeit nicht bekannt ist, an welcher expliziten Form der FTD die Patienten erkrankt waren, kann gemutmaßt werden, dass die Proben in der Mehrzahl von solchen, oben erwähnten, verhaltensgestörten Erkrankungstypen stammen. Von Versuchsbeginn an geringe A $\beta$  (1-42)-Konzentrationen könnten eine Erklärung für die nicht vorhandene Signifikanz zwischen AD- und FTD- Proben sein. In einer Studie von Koopman wurden signifikant niedrigere p-Tau- Konzentrationen von FTD- Patienten, verglichen mit AD- Patienten, konstatiert (Koopman K. , et al., 2009). Auch dieses Ergebnis spiegelt sich in unseren wieder. Die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins ist ein typisches Merkmal der AD. Es gehört aber nicht zu den pathologischen Merkmalen einer FTD. Daher ähneln die p-Tau- Konzentrationen eher denen der Kontrollpatienten, als denen der AD- Proben.

Die Experimentreihe B untersuchte zusätzlich den Verlauf der Proteinkonzentrationen über 30 Tage. Auch hier wurden relevante Veränderungen im Bereich der A $\beta$ - und p-Tau-Konzentrationen festgestellt. Die Proteine verhalten sich, wie in Experimentreihe A Probe I bereits dargestellt. A $\beta$  (1-42) erfährt einen signifikanten Anstieg, während p-Tau einem Konzentrationsverlust unterliegt. Da sich dieser Verlauf mehrfach wiederholt, ist hier nicht von einem Zufall auszugehen. Dieser Proteinveränderung sollte deshalb mit größeren Patientenzahlen in weiteren Versuchen nachgegangen werden.

### 4.3.3. Die Gruppe der Lewy- Körperchen Demenz- Proben

Klinisch ist die Lewy- Körperchen Demenz (LBD) charakterisiert durch wechselnde kognitive Fähigkeiten begleitet von ausgeprägten psychopathologischen Symptomen. Dazu gehören rezidivierende optische Halluzinationen und Wahnvorstellungen (Barber, Panikkar, & McKeith, 2001). Neurologisch zeigen 25% bis 30% der Patienten extrapyramidale Symptome, wie zum Beispiel die körperliche Steifheit (Rigidität), eine motorische Verlangsamung (Bradykinese), eine leise unbetonte Sprache (Hypophonie), ein starrer Gesichtsausdruck (Hypomimie), eine gebückte Körperhaltung, ein langsamer und kleinschrittiger Gang sowie ein Ruhetremor, der jedoch weniger häufig auftritt (McKeith, Galasko, & Kosaka, 1996), (McKeith, Mintzer, & Aarsland, 2004).

Im klinischen Umfeld wird die LBD häufig als Alzheimer Demenz (AD) oder auch als Parkinson'sche Krankheit fehldiagnostiziert. Dies geschieht durch überlappende Symptome der Erkrankungen (Noe, et al., 2004). Die Differentialdiagnostik dieser Krankheiten ist unerlässlich, da fast 50% aller LBD-Patienten überempfindlich auf die konventionelle antipsychotische medikamentöse Therapie mit vermehrten Wahnvorstellungen und verschlimmerten motorischen Symptomen reagieren (Bosboom & Wolters, 2004). Die Validität und Reliabilität der existierenden Kriterien für die LBD- Diagnosestellung haben eine gute Spezifität (95%), allerdings eine geringere Sensivität (83%) für die Detektierung verschiedener Arten der dementiellen Prozesse (McKeith, 2000). Dies schränkt die klinischen Diagnosekriterien in ihrem Nutzen in der praktischen Routine erheblich ein. Bisher existieren also keine einheitlichen Methoden um die LBD sicher zu diagnostizieren. Es mangelt an Empfehlungen für Liquoruntersuchungen oder anderer peripherer Biomarker, die im klinischen Alltag für die Differentialdiagnostik gut genutzt werden können.

Der Liquor enthält eine Fülle an Proteinen, unter anderem neuron- und astrozytärassozierte und Synapsen- spezifische Proteine (Davidsson, Paulson, Hesse, Blennow, & Nilsson, 2001). Darunter befinden sich auch die detektierbaren Hauptbestandteile der Lewy- Körperchen ( $\alpha$ -Synuclein), Neurofibrillärer Bündel (h-Tau) und der Amyloidplaques (A $\beta$ ), welche für die Pathophysiologie der LBD mitverantwortlich sind. Deren Quantifizierung bietet die Möglichkeit, die Differentialdiagnostik der verschiedenen dementiellen Prozesse erheblich zu verbessern. Das A $\beta$ - Peptid spielt nicht nur eine wichtige Rolle in der AD-

Pathogenese (Andreasen, et al., 2001), sondern auch in der der LBD. Es wird vermutet, dass das A $\beta$  mit dem  $\alpha$ -Synuclein interagiert und somit dessen Aggregation unterstützt, die  $\alpha$ -Synuclein-Akkumulation fördert und dadurch die kognitiven Funktionsstörungen beschleunigt (Clinton, Blurton-Jones, Myczek, Trojanowski, & LaFerla, 2010). Der Konzentrationsabfall des A $\beta$  (1-42) im Liquor ist charakteristisch für die AD, konnte aber auch vereinzelt bei der LBD und dem Parkinson nachgewiesen werden (Bibl, et al., 2006), (Vanderstichele, De Vreese, & Blennow, 2006). Dies spiegelt die eventuelle Bedeutung der Amyloidplaques für die genannten Erkrankungen wieder (Hanson & Lippa, 2009). Das Protein gilt unter anderem sogar als Leitmarker für die Schwere des Fortschreitens der LBD (Gómez-Tortosa, et al., 2003). Andere Studien wiederum, die die Analysen auf Autopsie gesicherten Diagnosen stützen, stellten fest, dass die LBD ähnliche h-Tau, p-Tau und A $\beta$  (1-42)-Konzentrationen auswies, verglichen mit den Demenzformen der frontotemporale Demenz (FTD), der Kreutzfeld-Jakob Erkrankung und der vaskulären Demenz. A $\beta$  war zudem im Vergleich zur AD signifikant erhöht und h-Tau sowie p-Tau waren signifikant reduziert verglichen mit den AD-Konzentrationen (Koopman K., et al., 2009), (Mattsson, Zetterberg, & Hansson, CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment, 2009). Diese Studienergebnisse zeichnen sich auch in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ab. Die LBD-Proben von A $\beta$  (1-42) waren signifikant erhöht, verglichen mit denen der AD-Gruppe. Die LBD-A $\beta$  (1-42)-Werte hatten zudem das höchste Konzentrationslevel aller untersuchten Gruppen. Diese Unterschiede wiesen jedoch keine Signifikanz auf. Nach der 30-tägigen Analysewiederholung hatte sich die A $\beta$  (1-42)-Konzentration ausserdem signifikant um 35% des Ausgangswertes verringert. Diese Entwicklung widerspricht allen bisherigen Verlaufsbeobachtungen des Proteins. Hierzu ist anzumerken, dass sich diese Beobachtungen auf Kontrollpatienten und AD-Patienten bezogen. Eventuell liegt bei der LBD ein anderes Zusammenspiel von pathophysiologischen Faktoren der Erkrankung vor, so dass ein gleichartiges Proteinverhalten grundsätzlich nicht möglich ist. Dies könnte in der Interaktion des A $\beta$  (1-42) mit dem  $\alpha$ -Synuclein begründet sein. Vielleicht ist dieser Prozess bei der LBD dominierend gegenüber dem Prozess der Amyloidplaquebildung. Es ist gegebenenfalls von Beginn an mehr A $\beta$  (1-42) im Liquor vorhanden, da es nicht in der unlöslichen Polymerform vorliegt. Ferner ist zu erwähnen, dass es sich bei den verwendeten FTD-Proben um die Proben handelt, die am längsten eingelagert

waren. Im Mittel über eine Dauer von etwa 602 Tagen. Das ist deutlich mehr im Vergleich zu allen anderen Gruppen und ein weiterer möglicher Faktor, der in die Proteinstabilität des A $\beta$  (1-42) beeinflussend wirken und somit für den Abfall innerhalb der 30 Tage ursächlich sein könnte.

Erhöhte p-Tau 181- Konzentrationen wurden mehrfach in diversen Studien beobachtet (De Jong, Jansen, & Pijnenburg, 2007). Dieser Konzentrationsanstieg ist nicht allein auf die LBD beschränkt. Er ist auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen zu finden und spiegelt somit das Vorhandensein von überlappenden Pathologien, wie dem der neurofibrillären Bündeln wieder. Dennoch unterscheiden sich die Werte auch innerhalb der verschiedenen Demenzformen. AD- Patienten weisen weit höhere p-Tau- Level auf verglichen mit denen von Kontroll- und LBD- Patienten (Vanderstichele, De Vreese, & Blennow, 2006). Dies ist ein signifikanter Unterschied zwischen der LBD und AD, der mit einer Sensivität von 91% und einer Spezifität von 95% durchaus von Bedeutung in der Differentialdiagnostik sein sollte (Simic, Boban, & Sarac, 2007). p-Tau war somit die am meisten statistisch signifikante Einzelvariable aller drei Biomarker, die eine Unterscheidung zwischen LBD und AD ermöglichte (Vanderstichele, De Vreese, & Blennow, 2006). Werden jedoch Daten herangezogen, die auf Autopsie gesicherten Diagnosen basieren, ergibt sich eine Sensivität von lediglich 75% und eine Spezifität von lediglich 61%, wenn man LBD- von AD- Proben anhand von p-Tau unterscheiden möchte (Koopman K. , et al., 2009). Auch diese Beobachtung kann mit der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die p-Tau-Werte der AD- Proben zeigen weitaus höhere Konzentrationen verglichen mit denen der LBD- Proben. Sie weisen jedoch keine Signifikanz auf. Die Konzentrationswerte der LBD sind annähernd identisch mit denen der Gruppe der Kontroll- und der FTD- Proben. In der wiederholten Analyse nach 30 Tagen ist das p-Tau der LBD signifikant angestiegen. Auch diese Proteinveränderung entspricht nicht den bisherigen Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit. Die Gründe dafür sind wahrscheinlich auch der anderen Pathophysiologie der LBD- Erkrankung und dem hohen Probenalter geschuldet.

Das Vorhandensein von Lewy- Körperchen wird einem schädigenden Effekt auf das neuronale Zytoskelett zugeschrieben (Mukaetova- Ladinska & McKeith, 2006). Dies trägt somit höchstwahrscheinlich zu den Veränderungen der h-Tau- Konzentrationen bei den LBD- Patienten bei, da h-Tau als ein Ausdruck von neuronaler und axonaler Beschädigung gewertet wird. Tatsächlich konnten

erhöhte h-Tau- Level in gesicherten Diagnosen von LBD und AD nachgewiesen werden (Clark, et al., 2003) und bestätigen somit die beschriebene Beeinträchtigung des axonalen Transports und des axonalen Verlustes (Katsuse, Iseki, Marui, & Kosaka, 2003). Trotz dessen sind die verschiedenen h-Tau Ergebnisse nicht ganz schlüssig. In einer Studie von Arai (Arai, Morikawa, & Higuchi, 1997) wurden erhöhte h-Tau- Werte bei der LBD festgestellt, jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der LBD- und der AD-Gruppe. Im Gegensatz dazu wird in einer weiteren Studie berichtet, dass es signifikante Unterschiede in den h-Tau- Werten zwischen den Gruppen der LBD und AD gebe (Parnetti, et al., 2001). Diese Ergebnisse wurden nochmals in einer Studie bei Autopsie gesicherten LBD- Diagnosen bestätigt (Engelborghs, et al., 2008). Ein weiterer Bericht (Koopman K. , et al., 2009) bei dem es sich ebenfalls um durch Autopsie gesicherte Diagnosen handelte, hat signifikant erniedrigte h-Tau-Konzentrationen bei den LBD- Patienten festgestellt, wenn man sie mit AD-Patienten verglich. Die Werte glichen jedoch denen der anderen Demenzformen, wie FTD, vaskulärer Demenz und der Kreuzfeld- Jakob- Erkrankung. Diese Beobachtungen lassen sich auch in der Experimentreihe D der LBD- Gruppe zum Teil wieder finden. Die LBD- h-Tau- Werte sind ähnlich den der Kontrollen und den der FTD- Proben. Sie sind jedoch deutlich niedriger, als die der AD-Proben. Alle Differenzen untereinander weisen aber keine Signifikanzen auf. Signifikant ist lediglich die h-Tau – Konzentrationsänderung der LBD- Probe nach 30 Tagen. Hier ist ein Konzentrationsabfall zu verzeichnen. Die Unterschiede in den h-Tau-Konzentrationen der verschiedenen Studien lassen sich eventuell auf das unterschiedliche Stadium der neuronalen Beschädigung zurückführen, da sich dies über überhöhte h-Tau- Werte ausdrücken lässt. Damit ließen sich auch die nicht vorhandene Signifikanz in der vorliegenden Arbeit erklären, da die Liquorproben eventuell in bereits fortgeschrittenen Stadien der Gehirnschädigung entnommen wurden, haben sich die initial niedrigen LBD-Werte bereits erhöht, so dass kein relevanter Unterschied zwischen den LBD und AD mehr nachzuweisen war. Aufgrund der neuronalen Schädigung lassen sich auch die Differenzen zu den Kontrollproben erklären.

## **5. Zusammenfassung**

---

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Beurteilung und Verwendung, der auf Demenz hinweisenden Liquorproteine  $\beta$ -Amyloid (1-42) (A $\beta$ ), Phospho-Tau 181 (p-Tau) und Gesamt-Tau (h-Tau) leisten. Es sollte aufgezeigt werden, inwiefern unterschiedliche Lagerungstemperaturen, Lagerungsdauer, die Zugabe von fraglichen Stabilisatoren sowie wiederholte Auftau-Einfrier-Zyklen die Konzentration der untersuchten Proteine beeinflusst. Zudem sollte der Frage nachgegangen werden, inwiefern sich die Proteinkonzentrationen dreier verschiedener Demenzformen (Alzheimer Demenz (AD), frontotemporale Demenz (FTD), Lewy-Körperchen-Demenz (LBD)) im Verlauf verändern und ggf. unterscheiden.

In Zusammenarbeit mit dem Liquorlabor der Universitätsklinik Magdeburg, der neurologischen Klinik Neustadt und der neurologischen Ambulanz der Universitätsklinik Lübeck gewann man mittels einer Lumbalpunktion die benötigten Liquorproben. Für die Quantifizierung der Proteine wurde ein Sandwich-ELISA-Test von Innogenitics® genutzt.

Die Experimente zeigten, dass die Proteinkonzentrationen sich weder durch unterschiedliche Lagerungstemperaturen, durch Zugabe diverser Zusätze oder wiederholter Auftau-Einfrier-Zyklen im Verlauf signifikant beeinflussen ließen. Der  $\gamma$ -Secretase-Inhibitor nimmt hierbei eine Sonderstellung ein, da eine signifikante Wirkung auf die A $\beta$  (1-42)-Konzentration festgestellt wurde. Es fanden sich signifikante Unterschiede bezüglich der A $\beta$  (1-42)-Konzentration zwischen den Vergleichsgruppen AD und Kontrollen sowie AD und LBD. Auch die h-Tau-Werte der AD-Gruppe zeigten signifikant erhöhte Konzentrationswerte gegenüber der Kontroll- und FTD-Gruppe. Die Konzentration des p-Tau der AD-Gruppe wies lediglich eine Signifikanz gegenüber der FTD-Gruppe auf.

Die Konzentrationszunahme des A $\beta$  im Zeitverlauf über maximal 140 Tage steht im Widerspruch zu anderen Studien, welche eine Proteinstabilität von bis zu 26 Monaten aufzeigen (Bjerke, et al., 2010). Für h-Tau und p-Tau gilt im Allgemeinen, dass diese äusserst geringen Schwankungen unterliegen (Vanderstichele, et al., 2012). Für h-Tau gilt dies auch in der vorliegenden Arbeit. Die erfolgreiche Inhibierung der  $\gamma$ -Secretase findet bereits Anwendung in pharmakologischen Studien zur Behandlung der AD. Die AD-Proben bestätigen die aktuelle Studienlage im Vergleich zu den Kontrollpatienten. Die typischen pathologischen

Veränderungen in Form von Amyloidplaques, neurofibrillären Bündeln und einer Hyperphosphorylierung spiegeln sich in den Konzentrationsprofilen der Proteine wieder. Die Ergebnisse der FTD-Konzentrationswerte stimmen weitestgehend mit denen aus verschiedenen Studien überein (Bian, et al., 2008). Durch Analyse und Vergleich einzelner Proteinkonzentrationen ist es grundsätzlich schwierig die LBD eindeutig zu identifizieren. Zwar zeigte sich p-Tau als Marker zur Abgrenzung der LBD von der AD (Vanderstichele, De Vreese, & Blennow, 2006), allerdings konnte dieses Ergebnis mit der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

## 6. Literaturverzeichnis

---

- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin*(64), S. 146-148.
- Andreasen, N., Hesse, C., Davidsson, P., Minthon, L., Wallin, A., & Winblad, B. (1999). Cerebrospinal fluid  $\beta$ -amyloid (1-42) in Alzheimer disease: differences between early- and late-onset Alzheimer disease and stability during the course of disease. *Arch Neurol*, 56, S. 673-680.
- Andreasen, N., Minthon, L., Davidsson, P., Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Winblad, B., & Blennow, K. (2001). Evaluation of CSF-tau and CSF-Abeta42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. *Archives of neurology*, 58, S. 373-379.
- Arai, H., Morikawa, Y., & Higuchi, M. (1997). Cerebrospinal fluid tau levels in neurodegenerative diseases with distinct tau-related pathology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236, S. 262-264.
- Arai, H., Morikawa, Y., & Higuchi, M. (1997). Cerebrospinal fluid tau levels in neurodegenerative diseases with distinct tau-related pathology. *Biochem Biophys Res Commun*, 236, S. 262-264.
- Arai, H., Sato-Nakagawa, T., Higuchi, M., Morikawa, Y., Miura, M., Kawakami, H., . . . Sasaki, H. (1998). No increase in cerebrospinal fluid tau protein levels in patients with vascular dementia. *Neuroscience letters*, 256, S. 174-176.
- Arnold, S., Han, L., Clark, C., Grossman, M., & Trojanowski, J. (2000). Quantitative neurohistological features of frontotemporal degeneration. *J Struct Biol*, 130, S. 271-279.
- Arvanitakis, Z. (2010). Update on Frontotemporal Dementia. *The neurologist*, 16, S. 16-22.
- Augustinack, J., Schneider, A., Mandelkow, E., & Hyman, B. (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, 103, S. 26-35.
- Ballatore, C., Lee, V., & Trojanowski, J. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature reviews. Neurosciece*, 8, S. 663-372.
- Barber, R., Panikkar, A., & McKeith, I. (2001). Dementia with Lewy bodies: diagnosis and management. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 16, S. 12-18.
- Bartosik-Psujek, H., & Stelmasiak, Z. (2006). The CSF levels of total-tau and phosphotau in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of neural transmission*, 113, S. 339-345.

- Bian, H., Van Swieten, J., Leight, S., Massimo, L., Wood, E., Forman, M., . . . Grossman, M. (2008). CSF biomarkers in frontotemporal lobar degeneration with known pathology. *Neurology*, *70*, S. 1827-1835.
- Bibl, M., Mollenhauer, B., & Esselmann, H. (2006). CSF amyloid- $\beta$ -peptides in Alzheimer's disease, dementia with Lewy Bodies and Parkinson's disease. *Brain*, *129*, S. 1177-1187.
- Bibl, M., Mollenhauer, B., Esselmann, H., Lewczuk, P., Trenkwalder, C., Brechlin, P., . . . Wiltfang, J. (2006). CSF diagnosis of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Journal of neural transmission*, *113*, S. 1771-1778.
- Biere, A., Ostaszewski, B., Stimson, E., Hyman, B., Maggio, J., & Selkoe, D. (1996). Amyloid  $\beta$ -peptide is transported on lipoproteins and albumin in human plasma. *Journal of Biological Chemistry*, S. 32916-32922.
- Bjerke, M., Portelius, E., Minthon, L., Wallin, A., Anckarsater, H., & Ancharsater, R. (2010). Confounding factors influencing amyloid beta concentration in cerebrospinal fluid.
- Blennow, K. (2001). CSF biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Clinical Laboratory International*.
- Blennow, K. (2004). Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx*, *1*, S. 213-225.
- Blennow, K., & Hampel, H. (2003). CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, 605-613.
- Blennow, K., deLeon, M., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet*, *368*, S. 387-403.
- Blennow, K., Wallin, A., Agren, H., Spenger, C., Siegfried, J., & Vanmechelen, E. (1995). Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for axonal degeneration in Alzheimer disease? *Molecular and chemical neurology*, *26*, S. 231-245.
- Bosboom, J., & Wolters, E. (2004). Psychotic symptoms in Parkinson's disease: pathophysiology and management. *Expert opinion on Drug Safety*, *3*, S. 209-220.
- Braun, J., & Dormann, A. (2010). *Klinikleitfaden Innere Medizin*. München: Urban & Fischer Verlag.
- Brayne, C., Richardson, K., & Matthews, F. (2009). Neuropathological correlates of dementia in over-80-year-old brain donors from the population-based Cambridge City over 75s Cohort study. *J Alzheimers Dis*, 645-658.
- Brunden, K., Trojanowski, J., & Lee, V. (2008). Evidence that non-fibrillar tau causes pathology linked to neurodegeneration and behavioral impairments. *Journal of Alzheimers Disease*, *14*, S. 393-399.
- Buerger, K., Ewers, M., Pirtillä, T., Zinkowski, R., Alafuzoff, I., Teipel, S., & Hampel, H. (2006). CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *brain: a journal of neurology*, *129*, S. 3035-3041.

- Buerger, K., Zinkowski, R., Teipel, S., Tapiola, T., Arai, H., Blennow, K., . . . Hampel, H. (2002). Differential diagnosis of Alzheimer disease with cerebrospinal fluid levels of tau protein phosphorylated at threonine 231. *Archives of neurology*, *59*, S. 1267-1272.
- Carrill-Mora, P., Luna, R., & Colin-Barenque, L. (2014). Amyloid Beta: Multiple Mechanism of Toxicity and Only Some Protective Effects? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Clark, C., Xie, S., Chittams, J., Ewbank, D., Peskind, E., & Galasko, D. (2003). Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid: How well do these biomarkers reflect autopsy- confirmed dementia diagnoses? *Archives of Neurology*, *60*, S. 1696-1702.
- Cleveland, D., Hwo, S., & Kirschner, M. (1977). Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *Journal of Molecular Biology*, *116*, S. 227-247.
- Clinton, L., Blurton-Jones, M., Myczek, K., Trojanowski, J., & LaFerla, F. (2010). Synergistic interactions between A $\beta$ , tau, and alpha-synuclein: acceleration of neuropathology and cognitive decline. *Journal of neuroscience*, *30*, S. 7281-7289.
- Crowther, R., Olesen, O., Smith, M., Jakes, R., & Goedert, M. (1994). Assembly of Alzheimer- like filaments from full- length tau protein. *FEBS letters*, *337*, S. 135-138.
- Czernansky, J., Miller, J., & McKeel, D. (2002). Relationships among cerebrospinal fluid biomarkers in dementia of the Alzheimer type. *Alzheimer disease and associated disorders*, *16*, S. 144-149.
- Davidsson, P., Paulson, L., Hesse, C., Blennow, K., & Nilsson, C. (2001). Proteome studies of human cerebrospinal fluid and brain tissue using a preparative two-dimensional electrophoresis approach prior to mass spectrometry. *Proteomics*, *1*, S. 444-452.
- Davies, L., Wolska, B., Hilbich, C., Multhaup, G., Martins, R., Simms, G., . . . Masters, C. (1988). A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques. *Neurology*, *38*, S. 1688-1693.
- De Jong, D., Jansen, R., & Pijnenburg, Y. (2007). CSF neurofilament proteins in the differential diagnosis of dementia. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *78*, S. 936-938.
- DGPPN, & DGN. (2010). *Diagnose- und Behandlungsleitlinie Demenz*. Berlin: Springer Verlag.
- Dilling, H., Mombour, W., & WHO. (2008). *Internationale Qualifikation psychischer Störungen, ICD-10 Kapitel V*. Bern: Huber.
- Dixit, R., Ross, J., Goldman, Y., & Holzbaur, E. (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science*, *319*, S. 1086-1089.

- Eckman, C., & Eckman, E. (2007). An update on the amyloid hypothesis. *Neurologic Clinics*, *S.* 669-682.
- Engelborghs, S., De Vreese, K., Van de Castele, T., Vanderstichele, H., Cras, P., Vanmechelen, E., & De Deyn, P. (2008). Diagnostic performance of a CSF-biomarker panel in autopsy-confirmed dementia. *Neurobiol Aging*, *29*, S. 1143-1159.
- Eschweiler, G., Leyhe, T., Klöppel, S., & Hüll, M. (2010). Neue Entwicklungen in der Demenzdiagnostik. *Deutsches Ärzteblatt*, *39*, S. 677-683.
- Fabrizi, C., Businaro, R., Lauro, M., & Fumagalli, L. (2001). Role of alpha2-macroglobulin in regulating amyloid beta-protein neurotoxicity: protective or detrimental factor? *Journal of Neurochemistry*, *S.* 406-412.
- Fagan, A., Roe, C., Xiong, C., & Mintun, M. (2007). Cerebrospinal fluid tau/A $\beta$ 42 ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Archives of Neurology*, *64*, S. 343-349.
- Ferri, C., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Hall, K., & Rimmer, E. (17. December 2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*(366), S. 2112-2117.
- Fronek, K., Lange, P., Spreer, A., Eiffert, H., & Nau, R. (2011). Bacterial contamination and the transport vial material affect cerebrospinal fluid concentrations of  $\beta$ -Amyloid and Tau protein as determined by enzyme immunoassay. *Dementia and geriatric disorders*, *32*, S. 126-134.
- Galasko, D. (1998). CSF tau and A $\beta$ 42: logical biomarkers for Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging*, *19*, S. 117-119.
- Ghisso, J., Matsubara, E., & Koudinov, A. (1993). The cerebrospinalfluid soluble form of Alzheimer's amyloid beta is complexed to SP-40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex. *Biochemical Journal*, *S.* 27-30.
- Goedert, M., Spillantini, M., Cairns, N., & Crowther, R. (1992). Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron*, *8*, S. 159-168.
- Golde, T. E., Koo, E., Felsenstein, K., Osborne, B., & Miele, L. (2013).  $\gamma$ -Secretase Inhibitors and Modulators. *Biochimica et biophysica acta*, *S.* 2898-2907.
- Gómez-Tortosa, E., Gonzalo, I., Fanjul, S., Sainz, M., Cemillán, C., Yébenes, J., & del Ser, T. (2003). Cerebrospinal fluid markers in dementia with lewy bodies compared with Alzheimer disease. *Arch Neurol*, *60*, S. 1218-1222.
- Götz, J., Probst, A., Spillantini, M., Schäfer, T., Jakes, R., Bürki, K., & Goedert, M. (1995). Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *the EMBO Journal*, *14*, S. 1304-1313.
- Graham, A., Davies, R., & Xuereb, J. (2005). Pathological proven frontotemporal dementia presenting with severe amnesia. *Brain*, *128*, S. 597-605.

- Greck, J., Lautenschlager, N., & Kurz, A. (2000). Klinische Aspekte der frontotemporalen Demenz. *Fortschr Neurol Psychiat*, 68, S. 447-457.
- Green, A., Harvey, R., Thompson, E., & Rossor, M. (1999). Increased tau in the cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 259, S. 133-135.
- Grossman, M., Farmer, J., & Leight, S. (2005). Cerebrospinal fluid profile in frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 57, S. 721-729.
- Grünthal, E. (1926). Über die Alzheimersche Krankheit. *Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie*(101), S. 128-157.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y., Quinlan, M., Wisniewski, H., & Binder, L. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 101, S. 4913-4917.
- Gu, Y., Oyama, F., & Ihara, Y. (1996). Tau is widely expressed in rat tissues. *Journal of Neurochemistry*, 67, S. 1235-1244.
- Hampel, H., Buerger, K., Zinkowski, R., Teipel, S., Goernitz, A., Andreasen, N., . . . Blennow, K. (2004). Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study. *Archives of general psychiatry*, 61, S. 95-104.
- Hampel, H., Buerger, K., Zinkowski, R., Teipel, S., Kerkman, D., Ohno, H., . . . Blennow, K. (january 2004). Measurement of phosphorylated tau epitopes in differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study. *Archives of general psychiatry*, S. 95-102.
- Hampel, H., Buerger, K., Zinkowski, R., Teipel, S., Goernitz, A., Andreasen, N., . . . Kerkman, D. (2004). Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study. *Archives of general psychiatry*, 61, S. 95-102.
- Hanson, J., & Lippa, C. (2009). Lewy body dementia. *International Review of Neurobiology*, 84, S. 215-228.
- Hansson, O., Zetterberg, H., Buchhave, P., Londos, E., Blennow, K., & Minthon, L. (2006). Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow up study. 228-234.
- Herz, J., & Marschang, P. (2003). Coaxing the LDL receptor family into the fold. *Cell*, S. 289-292.
- Hesse, C., Rosengren, L., Andreasen, N., Davidsson, P., Vanderstichele, H., Vanmechelen, E., & Blennow, K. (2001). Transient increase in total tau but not phospho-tau in human cerebrospinal fluid after acute stroke. *Neuroscience letters*, 297, S. 187-190.

- Hesse, C., Rosengren, L., Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Jensen, C., Davidsson, P., & Blennow, K. (2000). Cerebrospinal fluid markers for Alzheimer's disease evaluated after acute ischemic stroke. *Journal of Alzheimer's disease*, 2, S. 199-206.
- Hodges, J., Davies, R., & Xuereb, J. (2004). Clinicopathological correlates in frontotemporal dementia. *Ann Neurol*, 56, S. 399-406.
- Hodges, J., Davies, R., Xuereb, J., Kril, J., & Halliday, G. (2003). Survival in frontotemporal dementia. *Neurology*, 61, S. 349-354.
- Hort, J., Bartos, A., Pirtila, T., & Scheltens, P. (january 2010). Use of cerebrospinal fluid biomarkers in diagnosis of dementia across Europe. *European journal of neurology*, S. 90-96.
- <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/sandwich-elisa>.  
Abgerufen am 24. Juni 2015
- <https://www.demenz-leitlinie.de/aerzte/Demenz.html>. Abgerufen am 22. April 2017
- <https://www.dgn.org/leitlinien/3176-leitlinie-diagnose-und-therapie-von-demenzen-2016>.  
Abgerufen am 08. April 2017
- Hu, Y., He, S., Wang, X., Duan, Q., Grundke-Igbal, I., Igbal, K., & Wang, J. (2002). Levels of nonphosphorylated and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients : an ultrasensitive bienzyme-substrate-recycle enzyme-linked immunosorbent assay. *The American journal of pathology*, 160, S. 1269-1278.
- Hulstaert, F., Blennow, K., Ivanoiu, A., Schoonderwaldt, H., De Deyn, P., Igbal, K., . . . Vanderstichele, H. (1999). improved discrimination of AD patients using beta-amyloid<sub>81-42</sub> and tau levels in CSF. *Journal of Neurology*, S. 1555-1562.
- Ishiguro, K., Ohno, H., Arai, H., Yamaguchi, H., Urakami, K., Park, J., . . . Imahori, K. (1999). Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*, 270, S. 91-94.
- Itoh, N., Arai, H., Urakami, K., Ishiguro, K., Ohno, H., Hampel, H., & Buerger, K. (2001). Large- scale, multicenter study of cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at serine 199 for the antemortdem diagnosis of Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, 50, S. 150-156.
- Jarret, J., Berger, E., & Lansbury, P. j. (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 32, S. 4693-4697.
- Jensen, M. (1999). Cerebrospinal fluid A $\beta$ 42 is increased early in sporadic Alzheimer's disease and declines with disease progression. *Annals of Neurology*, 45, S. 504-511.
- Johnson, J., Head, E., Kim, R., Starr, A., & Cotman, C. (1999). Clinical and pathological evidence for a frontal variant of Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 56, S. 1233-1239.

- Kaiser, E., Schonknecht, P., Thomann, P., Hunt, A., & Schroder, J. (2007). Influence of delayed CSF storage on concentrations of phospho-tau protein (181), total tau protein and beta-amyloid (1–42). *Neuroscience letters*, *417*, 193-195.
- Kang, J., Vanderstichele, H., Trojanowski, J., & Shaw, L. (April 2012). Simultaneous analysis of cerebrospinal fluid biomarkers using microsphere-based xMMP multiplex technology for early detection of Alzheimer's disease. *Methods*, *S*, 484-493.
- Kapaki, E., Kilidereas, K., Paraskevas, G., Michalopoulo, M., & Patsouris, E. (2001). Highly increased CSF tau protein and decreased beta-amyloid (1-42) in sporadic CJD: a discrimination from Alzheimer's disease? *Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry*, *71*, S. 401-403.
- Karantzoulis, S., & Galvin, J. (2013). Update on dementia with lewy bodies. *Curr Transl Geriatr Exp Gerontol Rep*, *2*, S. 196-204.
- Katsuse, O., Iseki, E., Marui, W., & Kosaka, K. (2003). Developmental stages of cortical lewy bodies and their relation to axonal transport blockage in brains of patients with dementia with lewy bodies. *Journal of the Neurological Sciences*, *211*, S. 29-35.
- Klein, C., Kramer, E., Cardine, A., Schraven, B., Brandt, R., & Trotter, J. (2002). Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. *Journal of neuroscience*, *22*, S. 698-707.
- Knopman, D., Boeve, B., & Parisi, J. (2004). Antemortem diagnosis of frontotemporal lobar degeneration. *Ann Neurol*, *57*, S. 480-488.
- Koedam, E., van der Vlies, A., an der Flier, W., Verwey, N., Koene, T., Scheltens, P., . . . Pijnenburg, Y. (2013). Cognitive correlates of cerebrospinal fluid biomarkers in frontotemporal dementia. *Alzheimers Dement*, *9*, S. 269-275.
- Kohnken, R., Buerger, K., Zinkowski, R., Miller, C., Kerkman, D., DeBernardis, J., . . . Hampel, H. (2000). Detection of tau phosphorylated at threonine 231 in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neuroscience letters*, *287*, S. 187-190.
- Koopman, K., Le Bastard, N., Martin, J., Nagels, G., De Deyn, P., & Engelborghs, S. (2009). Improved discrimination of autopsy- confirmed Alzheimer's disease (AD) from non- AD dementias using CSF P-tau (181P). *Neurochem. Int.*, *55*, S. 214-218.
- Koopman, K., Le Bastard, N., Martin, J.-J., Nagels, G., De Deyn, P., & Engelborghs, S. (2009). Improved discrimination of autopsy- confirmed Alzheimer's disease (AD) from non AD dementias using CSF p-Tau 181P. *Neurochemistry International*, *55*, S. 214-218.
- Kopke, E., Tung, Y., Shaikh, S., Del Alonso, C., Iqbal, K., & Grundke-Ibqal, I. (1993). Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimers disease. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*, S. 24374-24384.

- Kosik, K. (1993). The molecular and cellular biology of tau. *Brain pathology*, 3, S. 39-43.
- Koudinov, A., Koudinova, N., Kumar, A., Beavis, R., & Ghiso, J. (1996). Biochemical characterization of Alzheimer's soluble amyloid beta protein in human cerebrospinal fluid: association with high density lipoproteins. *Biochemical and biophysical research communications*, S. 592-597.
- Kramer, J., & Miller, B. (2000). Alzheimer's disease and its focal variants. *Semin Neurol*, 20, S. 447-454.
- Lachno, D., Romeo, M., Siemers, E., Vanderstichele, H., Coart, E., & Konrad, R. (2011). Validation of ELISA methods for quantification of total tau and phosphorylated-tau 181 in human cerebrospinal fluid with measurement in specimens from two Alzheimer's disease studies. *Journal of Alzheimers Disease*, 26, S. 531-541.
- Lafora, G. (1911). Beitrag zur Kenntnis der Alzheimerschen Krankheit oder präsenilen Demenz mit Herdsymptomen. *Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie*(6), S. 15-20.
- Lannfelt, L., Basun, H., Wahlund, L., Winblad, B., Lieberburg, I., & Schenk, D. (1995). Amyloid beta-peptide in cerebrospinal fluid in individuals with the Swedish Alzheimer amyloid precursor protein mutation. *Neuroscience Letters*, 199, S. 203-206.
- Lauter, J., & Meyer, H. (1968). Clinical and Nosological Concepts of Senile Dementia. In C. L. Ciompi, *Senile Dementia* (S. 13-26). Stuttgart/ Bern.
- Le Bastard, N., De Deyn, P., & Engelborghs, S. (2015). Importance and Impact of Preanalytical Variables on Alzheimer Disease Biomarker Concentrations in Cerebrospinal Fluid. *Clinical Chemistry*, 61, S. 734-743.
- Le Bastard, N., De Deyn, P., & Engelborghs, S. (may 2015). Importance and Impact of Preanalytical Variables on Alzheimer Disease Biomarker Concentrations in Cerebrospinal Fluid. *Clinical Chemistry*, S. 734-743.
- Lewczuk, P., Beck, G., & Esselmann, H. (2006). Effect of sample collection tubes on cerebrospinal fluid concentrations of tau proteins and amyloid  $\beta$  peptides. *Clinical Chemistry*, S. 332-334.
- Mahlberg, R. (2010). Diagnostik und Differentialdiagnose von Demenzerkrankungen. *Deutsches Ärzteblatt*, 107(39), S. 675-676.
- Majounie, E., Cross, W., Newsway, V., Dillman, A., Vandrovcova, J., Morris, C., . . . O'Donovan, M. (2013). Variation in tau isoform expression in different brain regions and disease states. *Neurobiology of aging*, 34, S. 1922.e7-1922.e12.
- Mandelkow, E., & Mandelkow, E. (2012). Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*.
- Mattsson, N., Zetterberg, H., & Hansson, O. (2009). CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA*, 302, S. 385-393.

- Mattsson, N., Zetterberg, H., Hansson, O., Andreasen, N., Parnetti, L., & Jonsson, M. (2009). CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. 385-393.
- Maurer, K., & Maurer, U. (1999). *Alzheimer* (2.Auflage Ausg.). München, Bayern: Piper Verlag GmbH.
- Mc Kaan, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., & Stadlan, E. (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*, S. 939-944.
- Mc Keith, I., Ballard, C., Perry, R., Ince, P., Neill, D., Barber, R., & Perry, E. (2000). Prospective validation of consensus criteria for diagnosis of dementia with Lewy's bodies. *Neurology*, S. 1050-1058.
- Mc Khann, G., Albert, M., Grossman, M., Miller, B., Dickson, D., & Trojanowski, J. (2001). Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Arch Neurol*, S. 1803-1809.
- McKeith, I. (2000). Spectrum of Parkinson's dementia, and Lewy body dementia. *Neurol Clin.*, 18, S. 865-902.
- McKeith, I. (2005). Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology*, 65, S. 1863-1872.
- McKeith, I., Galasko, D., & Kosaka, K. (1996). Consensus guidelines for the clinical and pathological diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology*, 47, S. 1113-1124.
- McKeith, I., Mintzer, J., & Aarsland, D. (2004). International psychogeriatric association expert meeting on DLB (Dementia with Lewy Bodies). *Lancet Neurology*, 3, S. 19-28.
- McKenzie, G., Roberts, G., Gentleman, S., Graham, D., & Royston, M. (1994). Increased numbers of beta APP-immunoreactive neurones in the entorhinal cortex after head injury. *Neuroreport*, 6, S. 161-164.
- McKhann, G., Albert, M., Grossman, M., Miller, B., Dickson, D., & Trojanowski, J. (2001). Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Archives of neurology*, S. 1803-1809.
- Mecocci, P., Cherubini, A., & Bregnocchi, M. (1998). Tau protein in cerebrospinal fluid: a diagnostic and prognostic marker in Alzheimer disease? *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 12, S. 211-214.
- Menting, K., & Claassen, J. (2014).  $\beta$ -secretase inhibitor; a promising novel therapeutic drug in Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience*.

- Mietelska-Porowska, A., Wasik, U., Goras, M., Filipek, A., & Niewiadomska, G. (2014). Tau Protein Modifications and Interactions: Their Role in Function and Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*, S. 4671-4713.
- Mitchell, A. (2009). CSF phosphorylated tau in the diagnosis and prognosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a meta-analysis of 51 studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, S. 966-975.
- Mondragón-Rodríguez, S., Basurto-Islas, G., Binder, L., & García-Sierra, F. (2009). Conformational changes and cleavage; are these responsible for the tau aggregation in Alzheimer's disease? *Future Neurology*, *4*, S. 39-53.
- Mondragón-Rodríguez, S., Perry, G., Zhu, X., Moreira, P., Acevedo-Aquino, M., & Williams, S. (2013). Phosphorylation of tau protein as the link between oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and connectivity failure: Implications for Alzheimer's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, S. 2013:940603.
- Moore, C., Diehl, T., Selkoe, D., & Wolfe, M. (2000). Toward the Characterization and Identification of  $\gamma$ -Secretases Using Transition-state Analogue Inhibitors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, S. 197-205.
- Motter, R., Vigo-Pelfrey, C., Kholodenko, D., Barbour, R., Johnson-Wood, K., Miller, B., . . . Green, R. (1995). Reduction of  $\beta$ -amyloid peptide 42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, 643-648.
- Müller, W., Eckert, A., Kurz, C., Eckert, G., & Leuner, K. (2010). Mitochondrial dysfunction: Common final pathway in brain aging and Alzheimer's disease- Therapeutic aspects. *Molecular neurobiology*, *41*, S. 159-171.
- Mukaetova-Ladinska, E., & McKeith, I. (2006). Pathophysiology of synuclein aggregation in lewy body disease. *Mechanism of Ageing and Development*, *127*, S. 188-202.
- Mumenthaler, M., & Mattle, H. (2006). *Kurzlehrbuch Neurologie (ISBN3131429313)*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Nathalie, P., & Jean-Noel, O. (2008). Processing of amyloid precursor protein and amyloid peptide neurotoxicity. *Current Alzheimer Research*, S. 92-99.
- Noe, E., Marder, K., Bell, K., Jacobs, D., Manly, J., & Stern, Y. (2004). Comparison of dementia with Lewy Bodies to Alzheimer's disease and Parkinson's disease with dementia. *Movement disorders*, *19*, S. 60-67.
- Parnetti, L., Lanari, A., Amici, S., Gallai, V., Vanmechelen, E., & Hulstear, F. (2001). CSF phosphorylated tau is a possible marker for discriminating Alzheimer's disease from dementia with Lewy bodies. *Neurological Sciences*, *22*, S. 77-78.
- Peskind, E., Riekse, R., Quinn, J., Kaye, J., Clark, C., & Farlow, M. (2005). Safety and acceptability of the research lumbar puncture. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, S. 220-225.
- Postina, R. (2008). A closer look at alpha-secretase. *current Alzheimer research*, S. 179-186.

- Qiu, C., De Ronchi, D., & Fratiglioni, L. (2007). The epidemiology of the dementias: an update. *Current opinion in psychiatry*, 380-385.
- Riemenschneider, M., Lautenschlager, N., Wagenpfeil, S., Diehl, J., Drzezga, A., & Kurz, A. (November 2002). Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid 42 proteins identify Alzheimer disease in subjects with mild cognitive impairment. *Archives of Neurology*, S. 17729-1734.
- Riemenschneider, M., Schmolke, M., Lautenschlager, N., Guder, W., Vanderstichele, H., Vanmechelen, E., & Kurz, A. (2000). Cerebrospinal beta-amyloid (1-42) in early Alzheimer's disease: association with apolipoprotein E genotype and cognitive decline. *Neuroscience Letters*, 284, S. 85-89.
- Riemenschneider, M., Wagenpfeil, S., & Diehl, J. (2002). Tau and A $\beta$ 42 protein in CSF of patients with frontotemporal degeneration. *Neurology*, 58, S. 1622-1628.
- Riepe, M. (2012). *Therapie Tabellen Neurologie/Psychiatrie*. München: Westermeyer Verlags GmbH.
- Rizzo, P., Osipo, C., Foreman, K., Golde, T., Osborne, B., & Miele, L. (2008). Rational targeting of Notch signaling. *Oncogene*, S. 5124–5131.
- Rodríguez-Martin, T., Cuchillo-Ibáñez, I., Noble, W., Nyenya, F., Anderton, B., & Hanger, D. (2013). Tau phosphorylation effects its axonal transport and degradation. *Neurobiology in aging*, 34, S. 2146-2157.
- Rosso, S., Donker Kaat, L., & Baks, T. (2003). Frontotemporal dementia in The Netherlands: patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study. *Brain*, 126, S. 2016-2022.
- Sancesario, G., Esposito, Z., Nuccetelli, M., Bernadini, S., Sorge, R., Martorana, A., . . . Sancesario, G. (2010). Abeta1-42 Detection in CSF of Alzheimer's disease is influenced by temperature: indication of reversible Abeta1-42 aggregation? *Experimental Neurology*, S. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.07.028.
- Sancesario, C., Esposito, Z., Nuccetelli, M., Bernadini, S., Sorge, R., & Martorana, R. (2010). Abeta1–42 Detection in CSF of Alzheimer's disease is influenced by temperature: indication of reversible Abeta1–42 aggregation? *Exp Neurol*, 223, 371-376.
- Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., . . . McGowan, E. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*, 309, S. 476-481.
- Schoonenboom, N., Mulder, C., Vanderstichele, H., van Elk, E., Kok, A., van Kamp, G., . . . Blankenstein, M. (2005). Effects of Processing and Storage Conditions on Amyloid (1-42) and Tau Concentrations in Cerebrospinal Fluid: Implications for Use in Clinical Practise. *Clinical Chemistry*, S. 189-195.
- Schwarzmann, A., Gregori, L., & Vitek, M. (1994). Transthyetin sequesters amyloid  $\beta$  protein and prevents amyloid formation. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, S. 8368-8372.

- Seelig, H.-P. (2008). *Präanalytik* (3. Ausg.). Karlsruhe: Alexander Thielbeer Druckerei&Verlag GmbH.
- Selkoe, D. (1996). Amyloid beta- protein and the genetics of Alzheimer's disease. *The Journal of biological chemistry*, S. 18295-18298.
- Sepulveda-Falla, D., Barrera-Ocampo, A., Hagel, C., Korwitz, A., & Vinueza-Veloz, M. (2014). Familial Alzheimer's disease-associated presenilin-1 alters cerebellar activity and calcium homeostasis. *The journal of clinical investigation*, S. 1552-67.
- Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Caillet-Boudin, M., Grognet, P., Bombois, S., . . . Vanmechelen, E. (2008). Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert review of proteomics*, 5, S. 207-224.
- Simic, G., Boban, M., & Sarac, H. (2007). CSF tau proteins in evaluation of patients with suspected dementia. (Medimond, Hrsg.) *New Trends in Alzheimer and Parkinson Related Disorders*.
- Sjögren, M., Davidsson, P., Tullberg, M., Minthon, L., Wallin, A., & Wikkelso, C. (2001). Both total and phosphorylated tau are increased in Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, Psychiatry*, S. 624-630.
- Sjögren, M., Davidsson, P., Wallin, A., Granérus, A., Grundström, E., Asmark, H., . . . Blennow, K. (2002). Decreased CSF beta- amyloid 42 in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis may reflect mistreatment of beta- amyloid induced by disparate mechanisms. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 13, S. 112-118.
- Sjögren, M., Minthon, L., Davidsson, P., Granérus, A.-K., Clarberg, A., Vanderstichele, H., . . . Blennow, K. (2000). CSF levels of tau, beta- amyloid (1-42) and GAP-43 in frontotemporal dementia. other types of dementia and normal aging. *Journal of neural transmission*, 107, S. 563-579.
- Sjögren, M., Vanderstichele, H., Agren, H., Zachrisson, O., Edsbacke, M., & Wikkelso, C. (2001). Tau and Abeta42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21–93 years of age: establishment of reference values. *Clinical Chemistry*, 47, 1776-1781.
- Sjögren, M., Vanderstichele, H., Agren, H., Zachrisson, O., Edsbacke, M., Skoog, I., . . . Blennow, K. (2001). Tau and Aβ42 in Cerebrospinal Fluid from Healthy Adults 21-93 Years of Age: Establishment of Reference Values. *Clinical Chemistry*, S. 1776-1781.
- Snyder, M. L., & Lichstein, H. C. (1940). Sodium azide as an inhibiting substance for gram-negative bacteria. *Journal of Infectious Diseases*, 113-115.
- Strittmatter, W., Saunders, A., & Schmechel, D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to β-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, S. 1977-1981.
- Sunderland, T., Linker, G., Mirza, N., Putnam, K., Friedman, D., Bartko, J., & Cohen, R. (2003). Decreased beta-amyloid 1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA*, S. 2094-2103.

- Tashiro, K., Hasegawa, M., Ihara, Y., & Iwatsubo, T. (1997). Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *Neuroreport*, 8, S. 2797-2801.
- van Engelen, B., Lamers, K., Gabreels, F., Wevers, R., van Geel, W., & Borm, G. (1992). Age-related changes of neuron-specific enolase, S-100 protein, and myelin basic protein concentrations in cerebrospinal fluid. *Clinical chemistry*, 38, S. 813-816.
- Vandermeeren, M., Mercken, M., Vanmechelen, E., Six, J., & van de Voorde, A. (1993). Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Neurochemistry*, S. 1828-1834.
- Vanderstichele, H. (2000). Standardization of measurement of beta-amyloid (1-42) in cerebrospinal fluid and plasma. *Amyloid: International Journal of of experimental and clinical investigation*, 7, S. 245-258.
- Vanderstichele, H., Bibl, M., Engelborghs, S., Le Bastard, N., Lewczuk, P., Molineuvo, J., . . . Blennow, K. (2012). Standardization of preanalytical aspects of cerebrospinal fluid biomark testing for Alzheimer's disease diagnosis: A consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimer's & Dementia*(8).
- Vanderstichele, H., Blennow, K., & D'Heuvaert, N. (1998). Developement of a specific diagnostic test for measurement of  $\beta$ -amyloid(1-42) in CSF. *Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases*, S. 773-778.
- Vanderstichele, H., De Vreese, K., & Blennow, K. (2006). Analytical performance and clinical utility of the INNOTEST PHOSPHO-TAU(181P) assay for discrimination between Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44, S. 1472-1480.
- Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Davidsson, P., Van Kerschaver, E., Van Der Perre, B., Sjögren, M., . . . Blennow, K. (2000). Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neuroscience letters*, 285, S. 49-52.
- Vassar, R., Kovacs, D. M., Yan, R., & Wong, P. C. (October 2010). The  $\beta$ -Secretase Enzyme BACE in Health and Alzheimer's Disease: Regulation, Cell Biology, Function, Therapeutic Potential. *Journal of Neuroscience*, S. 128787-12794.
- Weder ND, A. R. (2007). Frontotemporale dementias: a review. *Ann Gen Pschiatry*, 380-385.
- Wille, H., Drewes, G., Biernat, J., Mandelkow, E., & Mandelkow, E. (1992). Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallet dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro. *The Journal of cell biology*, 118, S. 573-584.
- Wiltfang, J., Esselman, H., Maler, J., Bleich, S., Huther, G., & Kornhuber, J. (2001). Molecular biology of Alzheimer's dementia and ist clinical relevance to early diagnosis and new therapeutic strategies. (47), 65-71.

- Xu, W., Sweeney, D., & Wang, R. (April 1997). Generation of Alzheimer beta-amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 3748-3752.
- Zaccai J, M. C. (2005). A systemic review of prevalence and incidence studies of dementia with Lewy bodies. *Age Ageing*, 561-566.
- Ziegler, U., & Doblhammer, G. (2009). *Prevalence and incidence of dementia in Germany- a study based on data from the public sick funds in 2002*. Gesundheitswesen.
- Zimmermann, R., Lelental, N., Ganslandt, O., Maler, J., Kornhuber, J., & Lewczuk, P. (2011). Preanalytical sample handling and sample stability testing for the neurochemical dementia diagnostics. *Journal of Alzheimers Disease*, 25, S. 739-745.

## **7. Anhang**

---

### **7.1. Informationsblatt und Einwilligungserklärung für die Patienten**

#### Probandeninformation

Bitte lesen Sie diese Probandeninformation sorgfältig durch. Ihr Arzt wird mit Ihnen direkt über die Studie sprechen. Bitte fragen Sie Ihren Arzt, wenn Sie etwas nicht verstehen oder wenn Sie zusätzlich etwas wissen müssen.

Studientitel: Quantifizierung von Tau, Phospho- Tau und  $\beta$ - Amyloidfragmenten zur Diagnostik von Demenzerkrankungen

Studienleiter: Prof. Dr. med. Andreas Moser, stellvertretender Direktor und Oberarzt

Klinik für Neurologie, UKSH, Campus Lübeck, 23538 Lübeck

Tel.: 0451/500- 2930

E-Mail: andreas.moser@neuro.uni-luebeck.de

#### Allgemeine Informationen

Bei der Studie handelt es sich um eine Experimentelle Studie mit humanen Liquorproben, die im Rahmen einer standardisierten Liquorpunktion zur Routinediagnostik anfallen.

Die Studie widmet sich der Forschung auf dem Gebiet der Proteinanalytik bei Demenzerkrankungen mittels unterschiedlicher Analyseverfahren (ELISA). Es ergibt sich die Möglichkeit eines verbesserten Analyseverfahrens im Hinblick auf Validität und Reliabilität. Die Ergebnisse dienen nicht dem Eigennutzen, sondern zukünftig für Erkrankte und Personen der Heilkunde bzw. Wissenschaft. Finanziert wird die Studie u.a. durch Gelder des Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF).

Die Studienergebnisse sollen abschließend in der gängigen Fachpresse publiziert werden. Nach Studienabschluss und Publikation werden die Aufzeichnungen eingelagert.

Es entstehen für den Probanden durch die Studienteilnahme keine zusätzlichen Risiken, Beeinträchtigungen oder anderweitige Nachteile. Prinzipielle Risiken einer Liquorpunktion werden im beiliegenden Aufklärungsbogen ausführlich mit dem Arzt besprochen.

Die Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Sie können jederzeit ohne Angabe von Gründen die Teilnahme verweigern, ohne dass Ihnen dadurch Nachteile im Hinblick auf die Behandlung oder Ihr Verhältnis zu Ihrer behandelnden Ärztin bzw. Arzt entstehen.

#### Datenschutzrechtliche Informationen

Für die Datenverarbeitung ist Prof. Dr. med. A. Moser verantwortlich, der Studienleiter, Universität zu Lübeck. Die Datenerhebung erfolgt zum Zweck des oben genannten Forschungsvorhabens.

Während der Versuche wird ein Versuchsprotokoll geführt. Die bei den Versuchen erhobenen Daten werden in anonymisierter Form einerseits in verschließbaren Schränken der Klinik für Neurologie, andererseits in einer passwortgeschützten Datei auf einem Forschergruppenrechner gelagert sein und verarbeitet.

Die erhobenen Daten werden nur für die Ihnen zweckdienlichen Projekte verwertet und entsprechend des Datenschutzgesetzes behandelt. Entnommenes Material wird ohne Aufzeichnung patientenbezogener Daten für die Studie eingesetzt und anonymisiert. Im Anschluss an einen Versuch wird das Liquormaterial bei -20°C eingelagert und mindestens für zwei Jahre aufbewahrt. Danach wird es den Vorschriften entsprechend entsorgt.

Die Versuchsergebnisse lassen keinen Rückschluss auf die Werte der einzelnen Probanden zu, da ein Liquorpool verwendet wird.

Die Bestimmungen des Bundesdatenschutzgesetzes werden eingehalten. Zugriff auf Ihre Daten haben nur Mitarbeiter der Studie. Diese Personen sind zur Verschwiegenheit verpflichtet. Die Daten sind vor fremden Zugriff geschützt.

Einwilligungserklärung

Studientitel: Quantifizierung von Tau, Phospho- Tau und  $\beta$ - Amyloidfragmenten zur Diagnostik von Demenzerkrankungen

Studienleiter: Prof. Dr. med. Andreas Moser, stellvertretender Direktor und Oberarzt

Klinik für Neurologie, UKSH, Campus Lübeck, 23538 Lübeck

Tel.: 0451/500- 2930

E-Mail: andreas.moser@neuro.uni-luebeck.de

Name des Probanden:

geboren am:

Ich wurde durch

über die Studie informiert.

Ich habe die schriftliche Patienteninformation zur oben genannten Studie erhalten, gelesen und verstanden. Ich wurde ausführlich – mündlich und schriftlich – über das Ziel und den Verlauf der Studie, Chancen und Risiken der Behandlung, meine Rechte und Pflichten aufgeklärt.

Ich erkläre hiermit meine Teilnahme an der oben genannten Studie. Ich wurde darauf hingewiesen, dass meine Teilnahme freiwillig ist und dass ich das Recht habe, diese jederzeit ohne Angabe von Gründen zu beenden, ohne dass mir dadurch Nachteile entstehen.

Ich wurde über meine Datenschutzrechte informiert. Mit der Erhebung, Verarbeitung und Speicherung meiner Daten, sowie Übermittlung im Rahmen der Studie bin ich einverstanden.

Ich hatte Gelegenheit alle meine Fragen zu stellen. Diese wurden zufriedenstellend und vollständig beantwortet.

weitere Fragen und Antworten:

## 7.2. Votum der Ethikkommission



*Im Fokus des Lebens*  
Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät

### Ethik-Kommission

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe

Universität zu Lübeck

Stellv. Vorsitzende:

Frau Prof. Dr. med. M. Schrader

Ratzeburger Allee 160

23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann

Tel.: +49 451 500 4639

Fax: +49 451 500 3026

janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 09-179

Datum: 22. Dezember 2009

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn

Prof. Dr. Moser

Klinik für Neurologie

im Hause

nachrichtlich:

Herrn Prof. Dr. Kömpf

Direktor der Klinik für Neurologie

**Sitzung der Ethik-Kommission am 01. Dezember 2009 – Ihr Schreiben vom 17. Dezember 2009**

**Antragsteller: Herr Prof. Moser / Herr Prof. Kömpf**

**Titel: Quantifizierung von Tau, Phospho-Tau und  $\beta$ -Amyloidfragmenten zur Diagnostik von Demenzerkrankungen. Kurztitel: Demenzplattform**

Sehr geehrter Herr Prof. Moser,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat keine Bedenken mehr.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Studie und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß bin ich

Ihre

Prof. Dr. med. Marianne Schrader  
Stellv. Vorsitzende

anwesende Kommissionsmitglieder:

Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe  
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)

Prof. Dr. Schweiger  
(Psychiatrie)

Prof. Dr. Dendorfer  
(Pharmakologie)

Frau Prof. E. Stubbe  
(Theologin)

Prof. Dr. Borck

(Medizin- und Wissenschaftsgeschichte)

Frau H. Müller  
(Pflege)

Dr. Kaiser

(Kinderchirurgie)

Herr Dr. Fieber

(Richter am Amtsgericht Ahrensburg)

Prof. Schwinger

(Humangenetik)

Herr Prof. Dr. Mönig  
(Medizinische Klinik I)

Frau Prof. Dr. M. Schrader

(Plastische Chirurgie, Stellv. Vors.)

Herr PD Lauten

(Pädiatrie)

Herr D. Stojan

(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)

### 7.3. Experimentreihe A: tabellarische Ergebnisauflistung

$\beta$ -Amyloid (1-42)					
	Temperatur	Nullwert	Tag 5	Tag 20	Tag 90
Probe II	4°C	100% ( $\pm 5,44\%$ )	130,29% ( $\pm 2,64\%$ )	161,44% ( $\pm 4,34\%$ )	35,23% ( $\pm 7,07\%$ )
	-20°C	100% ( $\pm 5,44\%$ )	134,35% ( $\pm 2,66\%$ )	177,67% ( $\pm 4,14\%$ )	177,20% ( $\pm 2,60\%$ )
	-80°C	100% ( $\pm 5,44\%$ )	139,77% ( $\pm 5,74\%$ )	183,06% ( $\pm 2,71\%$ )	185,83% ( $\pm 1,64\%$ )
Probe III	-20°C	100% ( $\pm 4,00\%$ )	115,89% ( $\pm 4,64\%$ )	142,42% ( $\pm 5,17\%$ )	135,82% ( $\pm 9,69\%$ )
Probe IV	4°C	100% ( $\pm 7,35\%$ )	117,59% ( $\pm 6,73\%$ )	135,10% ( $\pm 0,61\%$ )	25,68% ( $\pm 14,42\%$ )
Probe V	-20°C	100% ( $\pm 6,97\%$ )	124,34% ( $\pm 5,46\%$ )	149,07% ( $\pm 12,92\%$ )	155,07% ( $\pm 4,01\%$ )
Probe VI	4°C	100% ( $\pm 3,46\%$ )	107,00% ( $\pm 3,61\%$ )	132,80% ( $\pm 1,11\%$ )	146,90% ( $\pm 6,40\%$ )
	-20°C	100% ( $\pm 3,46\%$ )	114,60% ( $\pm 5,17\%$ )	140,20% ( $\pm 1,43\%$ )	166,20% ( $\pm 6,83\%$ )
Gesamt- Tau (h-Tau)					
Probe II	4°C	100% ( $\pm 4,71\%$ )	101,60% ( $\pm 3,97\%$ )	80,03% ( $\pm 5,03\%$ )	0,00%
	-20°C	100% ( $\pm 4,71\%$ )	97,09% ( $\pm 3,72\%$ )	62,22% ( $\pm 12,28\%$ )	108,49% ( $\pm 1,94\%$ )
	-80°C	100% ( $\pm 4,71\%$ )	94,08% ( $\pm 5,29\%$ )	70,95% ( $\pm 13,73\%$ )	112,92% ( $\pm 2,89\%$ )
Probe III	-20°C	100% ( $\pm 4,95\%$ )	115,44% ( $\pm 4,17\%$ )	79,95% ( $\pm 9,68\%$ )	114,82% ( $\pm 4,71\%$ )
Probe IV	4°C	100% ( $\pm 3,39\%$ )	98,82% ( $\pm 7,86\%$ )	73,43% ( $\pm 8,03\%$ )	0,00%
	-20°C	100%	102,51%	77,90%	119,72%

		(± 3,39%)	(± 3,53%)	(± 14,22%)	(± 18,15%)
Probe V	-20°C	100% (± 2,00%)	107,25% (± 4,06%)	76,93% (± 5,39%)	112,39% (± 4,49%)
Probe VI	4°C	100% (± 3,26%)	107,67% (± 5,64%)	81,21% (± 7,68%)	125,00% (± 3,93%)
	-20°C	100% (± 3,26%)	111,36% ± 4,49%	89,02% (± 5,75%)	143,11% (± 1,47%)
Phospho- Tau <sub>181</sub>					
Probe II	4°C	100% (± 3,51%)	89,31% (± 5,66%)	80,95% (± 2,72%)	42,17% (± 5,14%)
	-20°C	100% (± 3,51%)	77,77% (± 2,38%)	80,11% (± 1,02%)	67,94% (± 2,23%)
	-80°C	100% (± 3,51%)	73,99% (± 4,27%)	83,94% (± 16,11%)	65,23% (± 3,76%)
Probe III	4°C	100% (± 3,79%)	74,17% (± 0,81%)	70,42% (± 2,80%)	55,47% (± 2,44%)
Probe IV	4°C	100% (± 4,25%)	82,67% (± 2,50%)	87,87% (± 4,06%)	43,72% (± 3,73%)
	-20°C	100% (± 4,25%)	81,56% (± 5,85%)	78,57% (± 2,70%)	62,40% (± 4,87%)
Probe V	-20°C	100% (± 3,03%)	71,01% (± 4,26%)	62,92% (± 2,28%)	50,81% (± 1,96%)
	-80°C	100% (± 3,03%)	65,34% (± 3,75%)	64,01% (± 1,93%)	53,40% (± 1,03%)
Probe VI	4°C	100% (± 2,43%)	53,37% (± 2,07%)	48,90% (± 1,92%)	38,65% (± 2,56%)
	-20°C	100% (± 2,43%)	52,17% (± 3,24%)	53,33% (± 19,35%)	38,66% (± 0,00%)

**Tabelle 9** : Darstellung der relativen Proteinkonzentrationen und deren relative Standardabweichung der Experimentreihe A zu den verschiedenen Messzeitpunkten

## **8. Danksagung**

Diese Arbeit wurde in der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Schleswig- Holstein, Campus Lübeck erstellt. Unter anderem waren an der Mitarbeit das Institut für Biochemie der Universität zu Lübeck, das Liquorlabor der Otto- von- Guericke- Universität Magdeburg und die neurologische Klinik der Aneos Klinik Oldenburg beteiligt.

Mein ausdrücklicher Dank, gilt Herrn Prof. Dr. med. Andreas Moser für die Überlassung des Themas und die unendliche Geduld bei Fragen und Erklärungen. Ein besonderer Dank geht zudem an das Team der MTA's im Labor der Neurobiochemie, hier im besonderen Katharina Schnackenberg. Sie war mir eine große Hilfe in der Einarbeitung in das Fachgebiet des experimentellen Arbeitens und war mir stets eine Stütze bei der ungewohnten Handhabung der vielen technischen Geräte und bei der Durchführung und Planung der Experimente. Es war immer eine ausserordentlich angenehme, konstruktive und hilfreiche Zusammenarbeit.

Dr. Jeroen Mesters möchte ich für die initiale Ideensammlung für den Experimentaufbau danken, für die selbstverständliche Übernahme der Gefriertrocknung und die Bereitstellung von flüssigen Stickstoff.

Dem Liquorlabor aus Magdeburg und Dr. med. Ansgar Thümen danke ich herzlich für die Sammlung und Überlassung zahlreicher Liquorproben.

Zutiefst dankbar bin ich meinem Ehemann, der mir in der Zeit des Verfassens immer hilfreich zur Seite stand. Mich stets motiviert hat, wenn die Lust verflogen war und sich immer liebevoll um unsere Söhne gekümmert hat, so dass ich mich ganz auf die Arbeit konzentrieren konnte. Ein Dankeschön geht auch an meine Eltern und meine Schwester für die mentale Unterstützung, Anteil- und Rücksichtnahme bei der Erstellung dieser Arbeit.

## 9. Curriculum vitae

### PERSONALIEN

Name: Tina Wendt

geboren am: 25.01.1985

Staatsangehörigkeit: deutsch



### AUSBILDUNG und STUDIUM

10/08 – 11/14      Humanmedizinstudium  
Universität zu Lübeck

04/04 – 04/07      Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin  
Diakoniekrankenhaus Rotenburg/Wümme

### BERUFSTÄTIGKEIT

ab 01/16            Assistenzärztin in der Strahlentherapie und Radioonkologie  
Städtisches Klinikum Lüneburg

10/08 – 07/13      Tätigkeit neben dem Studium als Gesundheits- und Kranken-  
pflegerin auf der Anästhesiologischen Intensivstation  
UKSH Lübeck

10/07 – 10/08      Gesundheits- und Krankenpflegerin auf der Traumatologie und  
Orthopädie  
HELIOS Klinikum Blankenhain

07/07 – 10/07      Gesundheits- und Krankenpflegerin im mobilen Pflegedienst  
Pflegedienst Werler Crimmitschau

## DISSERTATION

07/16 – 04/17	Korrektur und Abgabe der Dissertationsarbeit
01/16 – 06/16	Unterbrechung durch Aufnahme ärztlicher Tätigkeit und anschließende Elternzeit
05/15 – 12/15	Verfassen der Dissertationsarbeit
08/13 – 06/15	Unterbrechung durch praktisches Jahr, Hochschulstudiumabschluss und anschließende Elternzeit
05/11 – 05/13	Durchführung der experimentellen Untersuchungen