

## Laboruntersuchungen in der Demenzdiagnostik

# Hoffnungsvolle Ansätze



### Dr. med. Andreas Gerritzen

Facharzt für Laboratoriumsmedizin und Mikrobiologie, Mitglied des erweiterten Vorstands der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie (DGLN) und Mitglied des geschäftsführenden Vorstands des Berufsverbandes Deutscher Laborärzte (BDL).

Medizinisches Labor Bremen, Haferwende 12, 28357 Bremen  
andreas.gerritzen@mlhb.de, www.mlhb.de

**Labormethoden für die Früherkennung der Alzheimer-Demenz sind klinisch wünschenswert. Seit kurzem stehen zumindest für den Liquor cerebrospinalis erfolgversprechende Parameter wie  $\beta$ -Amyloid-Differenzierung und Phospho-Tau-Protein zur Verfügung; sie kommen aber wegen des technischen Aufwands und Entnahmerisikos nicht für Screeningtests in Frage. Genetische Untersuchungen, insbesondere Apo-E4, eignen sich für eine sekundäre Risikoabschätzung. Der Schwerpunkt der Forschung liegt derzeit bei Multiplex-Analysen, die eine Früherkennung aus dem Blut erlauben sollen. (Trillium-Bibliothek 2011, e-Publikation, [www.trillium.de](http://www.trillium.de))**

Die demographisch determinierte, altersabhängig steil ansteigende Prävalenz von Demenzen erreicht zwischen dem 80. und dem 89. Lebensjahr etwa 10%, wovon über die Hälfte als Alzheimer-Demenz imponieren. In Deutschland sind derzeit etwa 600.000 Menschen von Morbus Alzheimer betroffen. Binnen vierzig Jahren wird eine etwa vierfach höhere Zahl erwartet. Verbesserte medikamentöse Optionen - etwa durch Acetylcholinesterasehemmer (zum Beispiel Donepezil) und NMDA-Rezeptorantagonisten (Memantine), künftig vielleicht durch Beta- bzw. Gammasekretase-Inhibitoren, die immunologische oder biochemische Veränderung der Amyloid-Faltblattstruktur oder eine Beeinflussung des neuronalen Glucosestoffwechsels (z. B. mit Metformin) - erhöhen die Notwendigkeit einer Frühdiagnostik. Klinische Erfahrungen deuten darauf hin, dass eine Behandlung bereits im Stadium der milden kognitiven Beeinträchtigung (*minimal cognitive impairment*, MCI) sinnvoll sein kann, um ein Abgleiten in eine manifeste Demenz zu verzögern, im Idealfall sogar zu verhindern.

Bis vor wenigen Jahren war die Demenzdiagnostik eine Domäne klinischer, psychometrischer und bildgebender Verfahren. Inzwischen steuern aber auch spezialisierte Laboruntersuchungen aus dem Liquor wichtige Hinweise zur Diagnose und Differentialdiagnose der Demenzerkrankungen bei (1). Konsequenterweise werden sie bereits in der gemeinsamen S3-Leitlinie der AWMF-Gesellschaften DGN und DGPPN „Demenzen“ aus dem Jahr 2009 für die begleitende Diagnostik empfohlen (2). Dabei ist die gezielte Kombination mehrerer Parameter erforderlich, um eine akzeptable Sensitivität und Spezifität zu erreichen. Besonderes Augenmerk verdient die Einhaltung adäquater präanalytischer Kriterien bei der Probengewinnung und -aufbewahrung: Glas- und Polycarbonat-

röhrchen sind wegen physikochemischer Absorptionsphänomene obsolet, geeignet sind z. B. Polypropylen und Polyethylen. Eine baldige Kühlung des Liquors und zügiger Transport zum Labor sind wichtig, um einen unkontrollierten Abfall der Messwerte zu vermeiden (3). Für eine längere Aufbewahrung von Liquorproben ist Tiefrieren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  erforderlich, mehrfaches Einfrieren und Auftauen muss aber wegen des kumulativen Aktivitätsverlustes vermieden werden – am besten friert man gleich mehrere Aliquots ein. Auf diese Weise wird auch eine zielgerichtete und kostensparende Stufendiagnostik möglich.

### $\beta$ -Amyloide im Liquor

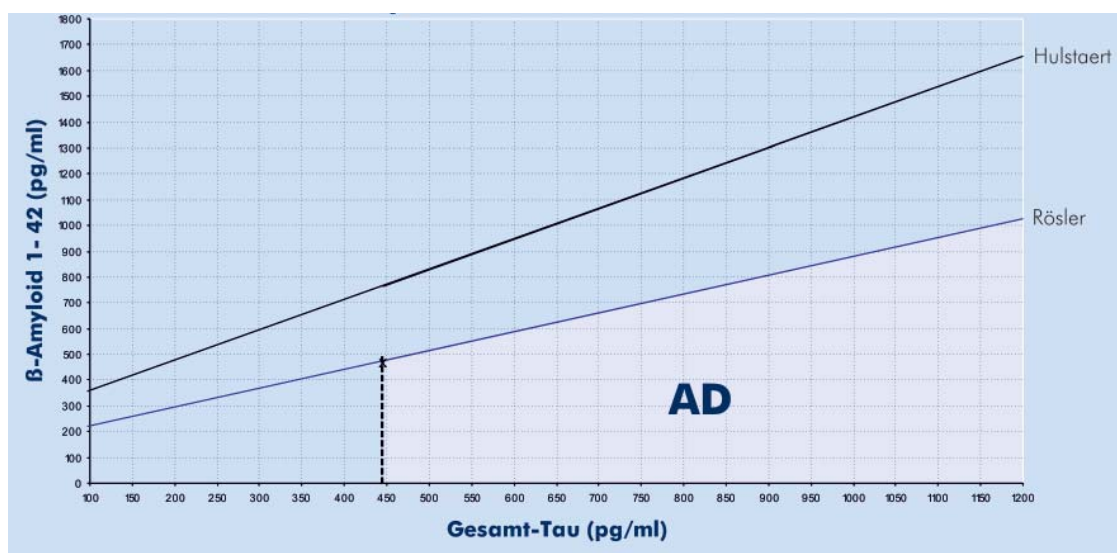
Die histochemisch im demenziellen Hirn nachweisbaren, senilen Amyloidplaques setzen sich hauptsächlich aus proteolytischen Abbauprodukten des physiologischen Amyloidprecursorproteins APP, den  $\beta$ -Amyloidpeptiden ( $\text{A}\beta$ -Peptiden) zusammen. Im Liquor von Patienten mit Alzheimer-Demenz werden typischerweise erniedrigte Werte des löslichen  $\text{A}\beta_{1-42}$ -Peptids ( $\text{A}\beta_{42}$ ) bereits in frühen Krankheitsstadien nachgewiesen.

Der ursächliche Zusammenhang ist nicht abschließend geklärt; die Amyloidverminderung ist jedoch weder Alzheimer-spezifisch noch allein durch eine Ablagerung in den Plaques erklärlich: Auch bei cerebraler Amyloidangiopathie, der amyotrophen Lateralsklerose und der Lewy-Körperchen-Demenz werden Erniedrigungen des Amyloidspiegels im Liquor beobachtet. Nach jüngeren Studien lassen sich Sensitivität und Spezifität der Amyloiduntersuchung bei Alzheimerverdacht durch die Bestimmung des Quotienten der beiden  $\text{A}\beta$ -Peptide 1-40 und 1-42 ( $\text{A}\beta_{1-40} \times 10 / \text{A}\beta_{1-42}$ ) verbessern. Hiermit trägt man der interindividuellen Differenz in der Amyloidsynthese

(Stichwort „low-secreter“) deutlich besser Rechnung als mit der alleinigen  $A\beta_{42}$ -Bestimmung. Es verdichten sich die Hinweise, dass mit dem Amyloidquotienten ein Werkzeug zur Frühdiagnostik zur Verfügung steht, das bereits im MCI-Stadium greift (4). In eigenen Untersuchungen konnten wir kürzlich eine neue Kalibration des Amyloidquotienten mit veränderten Reagenzien etablieren, die zu einer weiteren Verbesserung der Aussagekraft führt (5).

### Tau- und Phospho-Tau-Protein im Liquor

Neben den Amyloidplaques ist die verstärkte Bildung von Fibrillenbündeln in den Neuronen ein typisches Merkmal der Alzheimer-Demenz. Diese Bündel sind Folge einer Destabilisierung der neuronalen Mikrotubuli, welche im physiologischen Zustand offenbar durch verschiedene Tau-Proteine verhindert wird. Eine Erhöhung der messbaren Gesamt-Tau-Konzentration im Liquor hat sich als brauchbarer Indikator eines Nervenzelluntergangs erwiesen. Am besten untersucht ist diese Erhöhung in der Diagnostik des M. Alzheimer, jedoch ist altersabhängig bereits bei Gesunden mit höheren Werten zu rechnen. Auch andere Erkrankungen mit Schädigung der Neuronen (degenerativ, entzündlich, vaskulär, tumorös) können zu erhöhten Tau-Werten führen. Die höchsten Tau-Konzentrationen werden bei der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung und bei Hirninfarkten beobachtet. Zur Demenzdiagnostik empfiehlt sich deshalb immer die kombinierte Bestimmung mit anderen Liquorparametern.



Diskriminierungsgeraden zur kombinierten Beurteilung von Gesamt-Tau und  $\beta$ -Amyloid 1-42 im Liquor nach Hulstaert und Rösler. Wertepaare unterhalb der Geraden sprechen für das Vorliegen einer Alzheimer-Demenz (AD). Quelle: Ref. 8 und 9

Eine Verbesserung der Spezifität ist von der Analyse der enzymatischen Phosphorylierung der Tau-Proteine zu erwarten. Nach heutigem Verständnis der Pathogenese der Alzheimer-Demenz scheint eine Hyperphosphorylierung die physiologische Stabilisierungsfunktion für die Mikrotubuli zu beeinträchtigen, woraus eine verstärkte Bündelbildung („Alzheimer-Fibrillen“) mit Zelluntergang resultiert. Laboranalytisch am besten charakterisiert ist ein Nachweisverfahren, mit dessen Hilfe die Hyperphosphorylierung in Position Threonin181 des Tau-Proteins im Liquor gemessen werden kann. Interessanterweise werden erhöhte Phospho-Tau-Werte nach jetzigem Kenntnisstand ganz vorwiegend bei Alzheimer-Demenz, nur selten aber bei anderen Demenzformen beobachtet, so dass dem Parameter auch differenzialdiagnostische Bedeutung zukommt (6). Selbst bei maximaler Erhöhung des Gesamt-Tau im Rahmen einer Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung bleibt das Phospho-Tau in aller Regel normwertig.

### Apolipoprotein E (APO E) im EDTA-Blut

Statistische Metaanalysen weisen auf genetische Risikofaktoren für eine Alzheimer-Demenz hin. Am besten charakterisiert wurde bisher die Typisierung des Apolipoproteins E. Das Vorliegen des Allels 4 (APO E4) bedingt offenbar ein stärkeres Alzheimer-Risiko als andere Allele und verlagert den Beginn der Erkrankung um 8 bis 16 Jahre nach vorn. Alzheimer-Patienten mit dem APO E4 zeigen in der Liquoranalyse noch niedrigere  $\beta$ -Amyloidwerte als solche mit anderen APO-E-Allelen. Die homozygote Ausprägung APO E4/4 verstärkt diese Faktoren weiter (7). Bei weitem nicht jeder Merkmalsträger eines oder beider E4-Allele erkrankt aber an Morbus Alzheimer. Die Bestimmung wird deshalb in den Leitlinien nach jetzigem Stand nicht als Screeninguntersuchung empfohlen. Setzt man sie nach der Liquoranalytik in zweiter Linie zur weiteren Einschätzung eines Erkrankungsrisikos oder des künftigen Verlaufs ein, bedarf es einer umfassenden Aufklärung des Patienten mit Einwilligung nach dem Gendiagnostikgesetz.

### Kombinierte Beurteilung von Laborwerten

Die kombinierte Durchführung und Bewertung mehrerer Laboruntersuchungen aus dem Liquor ist der Einzelanalyse in der Aussagekraft überlegen. Bei einem typischen Fall von Alzheimer-Demenz werden erhöhte Werte für Gesamt-Tau und Phospho-Tau erwartet, während das  $\beta$ -Amyloid 1-42 und der Amyloidquotient erniedrigt sind. Die Bestimmung nur eines Parameters führt bei M. Alzheimer vor allem in

frühen Krankheitsstadien sowie beim Vorliegen anderer Demenzen zu nicht akzeptablen Werten für die Sensitivität und Spezifität. Hulstaert et al. ermittelten bereits 1999 in einer Pionierarbeit (8) eine Entscheidungsgerade, anhand derer Wertekombinationen von  $\beta$ -Amyloid und Tauprotein eingeordnet werden können ( $A\beta_{42} = 240 + 1.18 \times \text{Tau}$ ). Mit Hilfe dieser Geraden gelingt unter anderem eine Unterscheidung von Alzheimer-Patienten von normalen Kontrollen (Sensitivität 85%, Spezifität 81%). In einer späteren Studie differenzierten Rösler et al. (9) mit ihrer

modifizierten Entscheidungsgeraden ( $A\beta_{42} = 0,73 \times \text{Tau} + 150$ ) Alzheimer-Demenzen von gesunden Kontrollen noch genauer (Sensitivität 89%, Spezifität 100%). Die Spezifität der Unterscheidung zwischen Alzheimer- und Non-Alzheimer-Demenz erreichte immerhin 75%, wenn zusätzlich eine Untergrenze für das Tauprotein mit 445 pg/ml herangezogen wurde. Noch heute liefert die in unserem Labor erstmals eingesetzte Kombination der beiden Geraden in einem leicht ablesbaren Nomogramm in der Praxis brauchbare Ergebnisse zur Einordnung von Wertepaaren.

Zur weiteren Verbesserung insbesondere des Spezifitätswertes bei der Differenzialdiagnose zwischen Alzheimer- und Non-Alzheimer-Demenz wird die ergänzende Bestimmung des Phospho-Tau herangezogen. Mehrere Algorithmen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen vorgeschlagen, um eine kombinierte Beurteilung der Laborwerte auch unter Verwendung des Amyloidquotienten zu standardisieren, eine allgemeingültige Empfehlung liegt aber derzeit

noch nicht vor. Die zusätzliche Bedeutung der APOE-Genotypisierung im EDTA-Blut liegt in einer generellen Risikoabschätzung bei gestellter oder vermuteter Alzheimer-Diagnose, nicht im Screening.

## Zukunftsperspektive Blutuntersuchungen

Für eine breite Anwendung von Laboruntersuchungen in der Demenzdiagnostik ist Liquor kein geeignetes Probenmaterial. Erst mit der Einführung aussagekräftiger Bluttests könnte der Durchbruch zu einem echten Screening möglich werden. Es ist daher nicht verwunderlich, dass mit großem Nachdruck verschiedenste Ansätze versucht werden. Die im Blut nachweisbaren Konzentrationen des aus dem Liquor bekannten Tau-Proteins und diverser Amyloidpeptide liegen allerdings wesentlich niedriger als im Liquor, und die verlässliche Erkennung und Zuordnung bestimmter Muster steht noch am Anfang. Das deutsche Kompetenznetz „Demenzen“ unternahm bereits mit Förderung u. a. des BMBF erhebliche Anstrengungen in dieser Richtung.

Eine andere Forschungsrichtung setzt sich mit Einflussfaktoren der Mikrozirkulation und den begleitenden Mikrogefäßveränderungen auf die Alzheimerentwicklung auseinander (10). Vermutet wird eine schlechtere Entsorgung toxischer Stoffwechselprodukte bei eingeschränkter Durchblutung. Die im Blut messbaren Konzentration der zirkulationssteuernden Biomarker MR-proANP (Mittregionales Pro-Atriales-Natriuretisches-Peptid), MR-proADM (Mittregionales Pro-Adrenomedullin) und CT-proET-1 (C-Terminales Pro-Endothelin 1) sollen nach ersten Pilotstudien ähnlich gute Ergebnisse in der Erkennung von Alzheimerpatienten liefern wie die derzeit etablierten Liquorverfahren.

Einen Proteomics-Multiplextest mit über 100 verschiedenen Analyten setzte eine texanische Gruppe um O'Bryant ein. Zusammen mit dem APOE4-Genotyp und anderen Patienteninformationen sollen in einem ausgeklügelten Auswertalgorithmus ebenfalls brauchbare diagnostische Werte aus Blutuntersuchungen ableitbar sein (11).

Ziemlich am Anfang stehen noch vielversprechende Bemühungen der Gruppe um Kodadek aus den USA, mit Hilfe synthetischer Peptidantigene (sog. Peptinoide) wegweisende Konstellationen spezifischer Autoantikörper im Blut von Alzheimer-Patienten zu finden (12). Seit längerem wird schon vermutet, dass auch entzündliche Prozesse im Sinne einer Autoimmunität zur Alzheimer-Entwicklung beitragen könnten. Erste Reports von Pilotuntersuchungen enthielten Angaben zur Sensitivität und Spezifität der experimentellen Tests, die den herkömmlichen Verfahren überlegen waren und auch in den Nature News positive Resonanz fanden.

Nach krankheitsspezifischen Autoantikörpern fahnden auch Netzwerke unter Beteiligung der Göttinger Arbeitsgruppe um T. Bayer aus der Molekularen Psychiatrie. Sie wollen sich den immunogenen Charakter toxischer Amyloidvarianten wie dem Pyroglutamat-Abetapeptid für einen Labortest zunutze machen (13).

Weiterhin sind der neuronale Cholesterinstoffwechsel, die Verwertung von Metallen wie Eisen, Zink, Kupfer oder anderen Spurenelementen, die Fähigkeit von Makrophagen zur Phagozytose von Amyloidpeptiden und manches andere Gegenstand von Forschungen zu routinefähigen Alzheimer-Bluttests. Ein wenig auffällig erscheint manchmal die Eile, mit der schon vorläufige oder orientierende Ergebnisse publik gemacht und von der Presse auch unverzüglich weiterverbreitet werden. Hier scheint ein großer Bedarf nach Neuem zu bestehen, aber auch ein großer Markt zu locken. Vielleicht wird es eines Tages tatsächlich möglich sein, mit Blutuntersuchungen in Kombination mit neuen bildgebenden Verfahren wie der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder dem Diffusion-Tensor-Imaging (DTI) echte, zuverlässige Frühdiagnosen zu ermöglichen und damit bessere Voraussetzungen für einen anhaltenden Therapieerfolg zu schaffen. Allem Anschein nach ist es aber bis dahin noch ein weiter Weg.

## Literatur:

1. K. Blennow et al.  
CSF markers for incipient Alzheimer's disease  
The Lancet Neurology 2, 605 – 613; 2003
2. G. Deuschl und Maier W für die Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde (DGPPN) und die Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN). S3 Leitlinie "Demenzen", Stand 11/2009. AWMF online
3. N. Schoonenboom et al: Effects of processing and storage conditions on amyloid  $\beta$  (1-42) and tau concentrations in cerebrospinal fluid: implications for use in clinical practice  
Clinical Chemistry 51, 189 – 195; 2005
4. P. Lewczuk, Esselmann H, Otto M, Maler JM, Henkel AW, Henkel MK, Eikenberg O, Antz C, Krause WR, Reulbach U, Kornhuber J, Wiltfang J.  
Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF A $\beta$ 42, A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio and total tau.  
Neurobiol Aging 25, 273-81; 2004
5. A. Gerritzen und Brandt S  
Newly calibrated  $\beta$ -amyloid ratio in CSF for improved Alzheimer detection  
Clin Chem Lab Med 48, A140 (2010)
6. P. Lewczuk et al.  
Tau protein phosphorylated at threonine 181 in CSF as a neurochemical biomarker in Alzheimer's disease  
J Molecular Neuroscience 23, 115 – 122; 2004
7. R. Mayeux, Saunders AM, Shea S, et al.:  
Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease.  
N Engl J Med 338, 506 – 511; 1998
8. F. Hulstaert et al:  
Improved discrimination of AD patients using  $\beta$ -amyloid (1-42) and tau levels in CSF  
Neurology 52, 1555 – 1562; 1999
9. N. Rösler et al.  
Aktuelle klinisch-neurochemische Diagnostik der Alzheimer-Krankheit  
J Lab Med 26, 139 – 148; 2002
10. K. Buerger et al.  
Blood-Based Microcirculation Markers in Alzheimer's Disease—Diagnostic Value of Midregional Pro-atrial Natriuretic Peptide/C-terminal Endothelin-1 Precursor Fragment Ratio  
Biological Psychiatry 65, 979 – 984; 2009
11. S. O'Bryant et al.  
A Serum protein-based algorithm for the detection of Alzheimer disease  
Arch Neurol. 2010;67(9):1077-1081. doi:10.1001/archneurol.2010.215
12. N. N. Reddy et al.  
Identification of Candidate IgG Biomarkers for Alzheimer's Disease via Combinatorial Library Screening  
Cell 144, 132 – 142; 2011
13. A. Marcello, Wirths O, Schneider-Axmann T, Degerman-Gunnarsson M, Lannfelt L, Bayer TA  
Reduced levels of IgM autoantibodies against N-truncated pyroglutamate Abeta in plasma of patients with Alzheimer's disease  
Neurobiol Aging 2009; doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.08.011