



Axel Regeniter¹, Werner Siede²

Biomarker zur Beurteilung von Risiko, Diagnose und Verlauf degenerativer Zentralnervensystem-Erkrankungen*

Zur Labordiagnostik dementieller Erkrankungen stehen heute zahlreiche Biomarker zur Verfügung. Wir beschreiben den diagnostischen Einsatz etablierter Methoden, die neu durch die Einführung der $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ -Ratio und die Entwicklung einer standardisierten Interpretation ergänzt werden.

Demenz: β -Amyloide, Tau und Phospho-Tau

Die Analyse von Hirnproteinen ist differentialdiagnostisch nur auf dem Hintergrund eines Liquor-Grundprogramms und einer diagnostischen Fragestellung sinnvoll. Bei älteren Menschen im Pensionsalter steigt aufgrund der häufig wieder zunehmenden Aktivitäten im Freien (Wandern, Gartenarbeit) zum Beispiel das Risiko, sich mit FSME oder Neuroborreliose zu infizieren. Im Gegensatz zu akuten und chronischen neurologischen Erkrankungen findet man bei Demenzen häufig eine unauffällige Basis-Liquor-Diagnostik, so dass zusätzliche Biomarker zur Abklärung bestimmt werden müssen.

Demenz vom Typ des Morbus Alzheimer (AD) werden ursächlich durch erhöhte Amyloid-Konzentrationen im ZNS verursacht. Der Ablauf der immer noch nicht endgültig geklärten und weiter diskutierten Amyloid-Kaskade führt zu weiteren Veränderungen, die letztendlich die Demenz verursachen [Selkoe und Hardy 2016]. Mit Biomarkern im Liquor können die häufigsten Demenzen vom Alzheimer-Typ im symptomarmen Stadium (*mild cognitive impairment*, MCI) oder sogar symptomlosen Stadium nachgewiesen werden (Tabelle 1).

β -Amyloid ist ein Abbauprodukt des Amyloid- β precursor protein (APP), eines Bestandteils der Zellmembran neuronaler Zellen, das einen intra- und einen extrazellulären Anteil besitzt. Der Teil, der die Zellmembran durchdringt, ist hydrophob. Nachdem β -Amyloid aus APP enzymatisch durch die Wirkung von β - und γ -Sekretase gebildet wurde, aggregieren die hydrophoben $A\beta$ -Bestandteile in extrazellulären Plaques. Das Zerfallsprodukt β -Amyloid ist dann nur noch in verminderter Konzentration im Liquor messbar. Die Sensitivität und Spezifität der Diagnostik wird durch die Bestimmung der Ratio von $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ weiter verbessert. $A\beta_{1-40}$ ist das hauptsächliche Abbau-Produkt von Beta-Amyloid und lagert sich kaum in den Plaques ab.

Zum Nachweis dementieller Veränderungen werden neben dem β -Amyloid auch die Tau-Proteine bestimmt, da es durch einen komplexen, noch nicht endgültig geklärten Feedback-Mechanismus zu einer Rückwirkung auf die intrazellulär gelegenen neurofibrillären Bündel kommt. Diese zerfallen und setzen ihre Bestandteile frei, die dann extrazellulär messbar werden. Es wird zum einen die Gesamt-Tau-Fraktion im Liquor gemessen. Der mittlere Normwert der Gesamt-Tau-Fraktion liegt unter 200 pg/mL. Bei dementiellen Erkrankungen finden sich Werte

überwiegend zwischen 200 pg/mL und 1100 pg/mL, z.B. beim M. Alzheimer, allerdings auch bei anderen Erkrankungen wie einer Multi-Infarkt-Demenz. Die weitere Bestimmung des Phospho-Tau erhöht nicht nur die diagnostische Sensitivität, pathophysiologisch soll die Erhöhung von Phospho-Tau zusätzlich Rückschlüsse auf die Aktivität der AD ermöglichen [Hampel, et al. 2005].

Eine Erhöhung von Tau und Phospho-Tau-Konzentrationen in Kombination mit erniedrigten Amyloid-Konzentrationen kann eine AD von gesunden Kontrollen mit einer Spezifität von 83 bis 87% unterscheiden [Ferreira, et al. 2014]. In der Kombination sind die Marker auch prognostisch aussagekräftig bei Personen, die neuropsychologisch nur leichtere kognitive Defekte zeigen (MCI). Das Biomarker-Profil geht der Entwicklung einer Alzheimer-Demenz zeitlich voraus. Die zweithäufigste Demenz (20%), die Lewy-Body-Demenz (DLB), sowie die kortikobasale Degeneration oder die frontotemporale lobäre Degeneration (FTLD) werden dagegen von den etablierten Markern bis jetzt nicht erfasst.

Zusätzlicher Nutzen der $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ -Ratio

Liquor enthält viele verschiedene $A\beta$ -Variationen, von denen die $A\beta_{1-40}$ -Konzentration etwa zehnmal höher ist als die von $A\beta_{1-42}$. Im Liquor verringert sich das Verhältnis, die $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ -Ratio, früher und ist stärker ausgeprägt als die Reduktion des $A\beta_{1-42}$ alleine. Die $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ -Ratio

Mit Biomarkern im Liquor können die häufigsten Demenzen vom Alzheimer-Typ im symptomarmen oder sogar symptomlosen Stadium nachgewiesen werden.

ker zur Abklärung bestimmt werden müssen. Demenzen vom Typ des Morbus Alzheimer (AD) werden ursächlich durch erhöhte Amyloid-Konzentrationen im ZNS verursacht. Der Ablauf der immer noch nicht endgültig geklärten und weiter diskutierten Amyloid-Kaskade führt zu weiteren Veränderungen, die letztendlich die Demenz

1 PD Dr. med. Axel Regeniter, Klinische Chemie Universitätsspital Basel

2 PD Dr. Werner Siede, medica (Medizinische Laboratorien Dr. F. Kaeppli AG), Zürich

* Anmerkung

Es handelt sich um einen gekürzten Vorabdruck des Kapitels Demenzmarker aus dem Buch *Moderne Praxis der Liquordiagnostik*, UNI-MED Verlag, Bremen, das voraussichtlich im zweiten Quartal 2017 erscheinen wird.

Konstellation	$A\beta_{1-42}$	$A\beta_{1-40}$	$A\beta_{1-42/1-40}$
Unauffällige „Normale“	850	(15000)	0.06
M. Alzheimer (häufig)	300	(20000)	0.02
veränderte $A\beta$ Produktion (selten):			
Niedrig	300	(4000) $\Rightarrow$	0.08
Hoch	600	(40000) $\Rightarrow$	0.02

Tabelle 1: Zusätzlicher Nutzen der $A\beta_{1-40}$ Bestimmung bei Low/High-Producern. Die $A\beta_{1-42}$ -Werte werden nur im Verhältnis zu $A\beta_{1-40}$ beurteilt. Referenzwerte ($>0,05$) in grau, pathologische Werte in rot; korrigierte Beurteilung aufgrund der Ratio $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ in blau / leuchtend rot.

Beurteilung	Konstellation $A\beta$ /Tau	Punkte	Interpretation
Marker normal	$\leftrightarrow \leftrightarrow$	0	Kein Hinweis
Grauzone in einer Gruppe	$(\downarrow) \leftrightarrow$ $\leftrightarrow (\uparrow)$	1	AD unwahrscheinlich
Grauzonen in beiden Gruppen	$(\downarrow)(\uparrow)$	2	AD vereinbar
Pathologisch eine Gruppe	$\downarrow \leftrightarrow$ $\leftrightarrow \uparrow$	2	AD vereinbar
Pathologisch + Grauzone	$\downarrow (\uparrow)$ $(\downarrow) \uparrow$	3	AD vereinbar
Pathologisch in Beiden	$\downarrow \uparrow$	4	AD wahrscheinlich

Legende: $\leftrightarrow$ normal, $(\downarrow), (\uparrow)$ Grauzone, $\downarrow \uparrow$ deutlich erhöht/erniedrigt

Tabelle 2: Erlangen-Score zur Interpretation der Demenzmarker.

Biomarqueurs pour l'évaluation du risque, le diagnostic et le suivi de l'évolution des maladies dégénératives du système nerveux central

Actuellement, de nombreux biomarqueurs sont disponibles pour le diagnostic de laboratoire des pathologies démentielles. Nous décrivons l'utilisation diagnostique de méthodes établies, qui sont désormais complétées par l'introduction du rapport $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ ainsi que par le développement d'une interprétation standardisée.

gleicht zusätzlich die interindividuellen Schwankungen der $A\beta$ -Produktion aus (Tabelle 1). Ohne diese Korrektur können Patienten mit geringer $A\beta$ -Produktion fälschlich als AD-Patienten klassifiziert werden, da die Messwerte für $A\beta_{1-42}$ unter dem Grenzwert liegen, während einige Patienten mit vorhandenem Morbus Alzheimer, die physiologisch eine hohe $A\beta$ -Produktion haben, falsch-negative Ergebnisse liefern, wenn nur das $A\beta_{1-42}$ bestimmt wird [Blennow, et al. 2015, Dorey, et al. 2015].

Die $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ -Ratio war der einzige Liquor-Demenz-Marker, der an unterschiedlichen Orten einer Multi-Center-Studie nicht nur die geringste Va-

Verschiedenen diagnostischen Fragestellungen gerecht werden



- Ein schneller Hinweis auf eine bakterielle Meningitis dank Liquormessung im XN-BF Modus
- Automatisierte Messung unterschiedlicher Körperflüssigkeiten mit hoher Aussagekraft im klinisch relevanten Bereich
- Höherer Grad an Standardisierung durch Validierungsregelwerk spezifisch für Körperflüssigkeiten bietet mehr Sicherheit



www.sysmex.ch/xn



rianz aufwies, sondern auch identisch interpretiert wurde, wahrscheinlich weil die Quotienten-Bildung präanalytische und analytische Einflüsse verringert. Bei diskrepanten Ergebnissen von Phospho-Tau und $A\beta_{1-42}$ erhöhte sich durch die Beurteilung der $A\beta_{1-42}/_{1-40}$ -Ratio die Anzahl der eindeutig interpretierbaren CSF-Profilen um mehr als 50% und die Übereinstimmung mit der klinischen Diagnose verbesserte sich signifikant [Dumurgier, et al. 2015].

Beurteilung der Demenzmarker

Die Interpretation der Biomarker wird weiterhin uneinheitlich gehandhabt. Lewczuk et al. entwickelten eine Punkteskala von 0 bis 4, die die Interpretation normiert und wesentlich vereinfacht (Tabelle 2). Sind alle Biomarker im Referenzbereich, werden 0 Punkte vergeben; geringfügige Veränderungen in einer Biomarker-Gruppe (entweder $A\beta$ oder Tau, aber nicht beide) ergeben 1 Punkt. Deutliche Veränderungen des $A\beta$ -Metabolismus (verminderte $A\beta_{1-42}$ -Konzentration und/oder vermindertes $A\beta_{1-42}/_{1-40}$ -Verhältnis) oder des Tau-Metabolismus (erhöhte Konzentrationen von Tau und/oder Phospho-Tau), die nur in einer Gruppe vorhanden sind, ergeben 2 Punkte, kombiniert mit grenzwertigen Veränderungen der anderen Gruppe 3 Punkte. Ausgeprägte Veränderungen sowohl in der $A\beta$ - wie Tau-Gruppe ergeben 4 Punkte [Lewczuk, et al. 2015].

Demenzmarker: Abnahme und Versandbedingungen

Es sollten mindestens drei, besser alle vier Demenz-Biomarker bestimmt werden. Die Demenz-Biomarker sind im Liquor gekühlt über eine Woche bei 4–8°C stabil, Einfrieren schadet nicht. Tau-Protein darf nicht in Glasbehältern aufbewahrt werden. $A\beta_{1-42}$ und $A\beta_{1-40}$ werden in gleicher Weise an der Röhrchenwand unabhängig vom Plastikmaterial absorbiert [Dorey, et al. 2015]. Dieser Effekt ist bei Polystyrol-Röhrchen am stärksten ausgeprägt und am geringsten in Polypropylen Röhrchen. Die Liquorproben sollten deshalb in Polypropylen-Gefäßen gekühlt bei 8°C zur Analyse verschickt werden, um Absorptionsverluste von hauptsächlich $A\beta$ -Amyloiden, aber auch Gesamt-Tau zu verhindern [Lewczuk, Beck, et al. 2006].

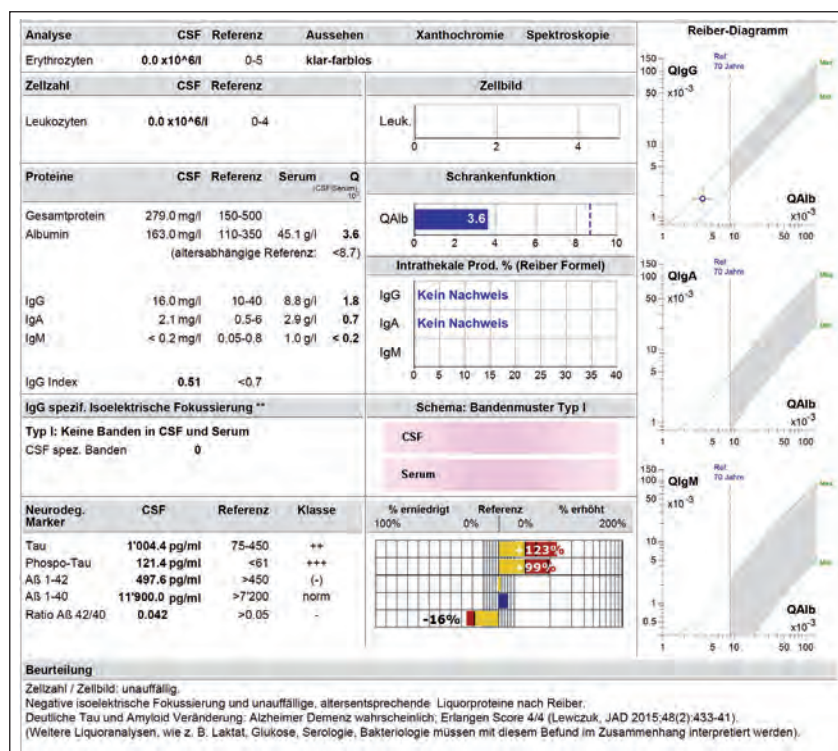


Abbildung 1: Marker der Neurodegeneration

Grafische Darstellung der Ergebnisse der Demenzdiagnostik. Die Ergebnisse werden als prozentuale Abweichung vom oberen/unteren Referenzwert dargestellt. Unterschiedliche Farben (blau, gelb, orange, rot) kennzeichnen die Ausprägung dieser Veränderungen.

Creutzfeldt-Jakob-Krankheit

Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) ist eine beim Menschen sehr selten auftretende, tödlich verlaufende und durch atypische Eiweiße (Prionen) gekennzeichnete übertragbare spongiforme Enzephalopathie. Die abnorm gefalteten Prion-Proteine führen zur Degeneration der Gehirnzellen. Die Erkrankung kommt weltweit mit einer Häufigkeit von etwa 1 Fall pro Jahr pro Million Einwohner vor. Sie wird anfänglich jedoch oft fehldiagnostiziert, am häufigsten als virale Enzephalitis, paraneoplastische Kleinhirnatrophie, Depression, Vertigo oder auch M. Alzheimer. Der Erkrankungsgipfel liegt um das siebzigste Lebensjahr, aber es können auch Menschen, die jünger als fünfzig Jahre sind, an einer sporadischen CJK erkranken; in Deutschland sind das etwa sieben Fälle pro Jahr. Bei einer manifesten Erkrankung kann im Liquor das Protein 14-3-3 nachgewiesen werden, möglich ist ebenfalls der Nachweis erhöhter Neuronen-spezifischer Enolase (NSE), des Tau-Proteins und des Proteins S100. Für die Abklärung einer Creutzfeldt-Jacob-Erkrankung (CJK) ergab sich für das Gesamt-Tau

bei einem Cut-off-Wert von 1200 pg/mL eine ähnlich hohe Sensitivität und Spezifität wie für das 14-3-3-Protein, so dass die Bestimmung des 14-3-3 erst bei hohen Tau-Konzentrationen sinnvoll erscheint [Otto, et al. 2002].

14-3-3-Bestimmung

Das Protein ist im Liquor stabil (bei RT oder 4°C); die Probe kann normal ohne Einfrieren versandt werden. Analysen werden für die Schweiz im Nationalen Referenzzentrum für Prionenerkrankungen, Institut für Neuropathologie der Universität Zürich (www.neuropathologie.usz.ch), in Deutschland in Göttingen (www.cjd-goettingen.de) kostenpflichtig durchgeführt. Ein positives 14-3-3-Ergebnis wird durch die Durchführung weiterer Untersuchungen ergänzt. Weitere Informationen finden sich auf den jeweiligen Webseiten.

Ausblick: Neurofilamente in Liquor und Serum

Neurofilamente spielen bei der Bildung des Stützskeletts und der Transportwege der Nervenzellen eine wichtige Rolle. Aktuelle Studien zeigen erhöhte Konzentrationen bei amyotropher Lateral-

sklerose, Morbus Alzheimer, Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, Lewy-Body-Demenz, progressiver supranukleärer Lähmung oder dem kortikobasalen Syndrom [Gaiottino, et al. 2013, Kuhle, Barro, et al. 2016].

Bei Tier- und Human-Versuchen zeigte sich zudem ein enger Zusammenhang zwischen der Konzentration der Neurofilamente in der Gehirnflüssigkeit und im Blut, so dass hiermit erstmals ein Marker neuronaler Schädigung – der im Blut gemessen werden kann – zur Verfügung steht. Erste Studien zeigen gute Resultate bei der Überwachung des Krankheitsverlaufes, zum Beispiel bei der Multiplen Sklerose [Kuhle, Nourbakhsh, et al. 2017]. Es ist wahrscheinlich, dass diese Bestimmung in absehbarer Zukunft das Spektrum der Diagnostik in der Verlaufs- und Therapie-Überwachung neurologischer und dementieller Erkrankungen ergänzen wird.

Korrespondenz:
Axel.Regeniter@unibas.ch

Referenzen

- Blennow, Kaj, Niklas Mattsson, Michael Schöll, Oskar Hansson, und Henrik Zetterberg. «Amyloid biomarkers in Alzheimers' disease.» Trends in pharmacological sciences 36, Nr. 5 (May 2015): 297–309.
- Dorey, Aline, Armand Perret-Liaudet, Yannick Tholance, Anthony Fourier, und Isabelle Quadrio. «Cerebrospinal Fluid Abeta40 Improves the Interpretation of Abeta42 Concentration for Diagnosing Alzheimer's Disease.» Frontiers in neurology 6 (2015): 247.
- Dumurgier, Julien, et al. «Cerebrospinal fluid amyloid- β 42/40 ratio in clinical setting of memory centers: a multicentric study.» Alzheimer's Research & Therapy (Springer Nature) 7 (jun 2015).
- Ferreira, Daniel, Lilisbeth Perestelo-Pérez, Eric Westman, Lars-Olof Wahlund, Antonio Sarra, und Pedro Serrano-Aguilar. «Meta-Review of CSF Core Biomarkers in Alzheimers' Disease: The State-of-the-Art after the New Revised Diagnostic Criteria.» Front Aging Neurosci 6 (2014): 47.
- Gaiottino, Johanna, et al. «Increased neurofilament light chain blood levels in neurodegenerative neurological diseases.» Herausgeber: Markus Reindl. PloS one (Public Library of Science (PLoS)) 8, Nr. 9 (sep 2013): e75091.
- Hampel, Harald, et al. «Correlation of cerebrospinal fluid levels of tau protein phosphorylated at threonine 231 with rates of hippocampal atrophy in Alzheimer disease.» Archives of neurology 62, Nr. 5 (May 2005): 770–773.
- Kuhle, Jens, et al. «Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa.» Clinical chemistry and laboratory medicine (Walter de Gruyter GmbH) 54, Nr. 10 (#oct# 2016): 1655–1661.
- Kuhle, Jens, et al. «Serum neurofilament is associated with progression of brain atrophy and disability in early MS.» Neurology (Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health)), #feb# 2017: 10.1212/WNL.0000000000003653.
- Lewczuk, P., et al. «Effect of sample collection tubes on cerebrospinal fluid concentrations of tau proteins and amyloid beta peptides.» Clin. Chem. 52 (#feb# 2006): 332–4.
- Lewczuk, P., R. Zimmermann, J. Wiltfang, und J. Kornhuber. «Neurochemical dementia diagnostics: a simple algorithm for interpretation of the CSF biomarkers.» J. Neural Transm. 116 (#sep# 2009): 1163–7.
- Lewczuk, Piotr, et al. «Validation of the Erlangen Score Algorithm for the Prediction of the Development of Dementia due to Alzheimer's Disease in Pre-Dementia Subjects.» Journal of Alzheimers' disease: JAD 48, Nr. 2 (2015): 433–41.
- Otto, M., et al. «Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease.» Neurology 58, Nr. 2 (Jan 2002): 192–7.
- Selkoe, Dennis J., und John Hardy. «The amyloid hypothesis of Alzheimers' disease at 25 years.» EMBO molecular medicine 8, Nr. 6 (2016): 595–608.

Allplex™

Next Generation of Real-Time PCR Assays
MuDT™ Technology: Multiple quantification and simultaneous detection

