

Aus der Klinik für Neurologie  
(Prof. Dr. med. M. Bähr)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Biomarker in der Diagnostik und Differentialdiagnostik  
der vaskulären Demenz bei zerebraler Mikroangiopathie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Peter Hermann**  
aus  
Northeim

Göttingen 2019

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent/in: Prof. Dr. med. Inga Zerr

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. Claudia Trenkwalder

Datum der mündlichen Prüfung: 10.07.2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Biomarker in der Diagnostik und Differentialdiagnostik der vaskulären Demenz bei zerebraler Mikroangiopathie“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den.....

.....  
(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

|                                    |            |
|------------------------------------|------------|
| <b>Tabellenverzeichnis .....</b>   | <b>III</b> |
| <b>Abbildungsverzeichnis .....</b> | <b>III</b> |
| <b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>  | <b>IV</b>  |

## 1. Einleitung

|         |  |   |
|---------|--|---|
| 1.1     | Demenz, Definition.....  | 1 |
| 1.2     | Merkmale der häufigsten dementiellen Syndrome.....               | 1 |
| 1.3     | Epidemiologie des dementiellen Syndroms.....                     | 2 |
| 1.4     | Vaskuläre Demenz.....  | 3 |
| 1.4.1   | Entitäten der vaskulären Demenz.....                             | 4 |
| 1.4.2   | Demenz bei zerebraler Mikroangiopathie.....                      | 5 |
| 1.4.2.1 | Definition, Ätiologie.....                                       | 5 |
| 1.4.2.2 | Diagnostik.....  | 6 |
| 1.4.2.3 | Therapie.....  | 7 |
| 1.5     | „Mischdemenz“.....   | 8 |
| 1.6     | Mild Cognitive Impairment und Vascular Cognitive Impairment..... | 8 |
| 1.7     | Fragestellung.....   | 9 |

## 2. Methoden

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.1   | Studienprojekt: Untersuchungen zur prognostischen Aussagekraft von liquorchemischen Markern in der Diagnostik und Differentialdiagnostik der CJK und vaskulärer Demenzen..... | 10 |
| 2.2   | Material und Methoden   |    |
| 2.2.1 | Einschlusskriterien.....  | 10 |
| 2.2.2 | Bildgebung.....   | 11 |
| 2.2.3 | Klinische Daten und Interview.....  | 11 |
| 2.2.4 | Testverfahren.....  | 11 |
| 2.2.5 | Laborparameter.....   | 12 |
| 2.2.6 | Archivierung und Datenschutz.....   | 13 |
| 2.3.  | Studienverlauf, ausgewählte deskriptive Daten.....  | 13 |

### 3. Zusammenfassungen der Publikationen

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 3.1 | Publikation I: <i>CSF biomarkers and neuropsychological profiles in patients with cerebral small-vessel disease</i> .....  | 17 |
| 3.2 | Publikation II: <i>Cytokine profiles and role of cellular PrP in patients with vascular dementia and vascular encephalopathy</i> .....                             | 20 |
| 3.3 | Publikation III: <i>Cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease show different but partially overlapping profile compared to Vascular dementia</i> ..... | 24 |

### 4. Diskussion..... 27

|     |                      |    |
|-----|----------------------|----|
| 4.1 | Publikation I.....   | 27 |
| 4.2 | Publikation II.....  | 29 |
| 4.3 | Publikation III..... | 29 |
| 4.4 | Zusammenfassung..... | 30 |

### 5. Literaturverzeichnis..... 31

### 6. Anhang

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 6.1   | Publikation I.....   | 37 |
| 6.1.1 | Zusatzmaterial.....  | 45 |
| 6.1.2 | Erratum zur Publikation.....                                       | 46 |
| 6.2   | Publikation II.....  | 47 |
| 6.2.1 | Zusatzmaterial.....  | 58 |
| 6.3   | Publikation III.....   | 60 |
| 6.3.1 | Zusatzmaterial.....  | 70 |
| 6.4   | Weitere wissenschaftliche Beiträge zum Thema der Dissertation..... | 71 |

## Tabellenverzeichnis

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| <b>Tabelle 1:</b>  | Prävalenz von Demenzerkrankungen in Westeuropa.....   | 2  |
| <b>Tabelle 2:</b>  | Relative Häufigkeit verschiedener Demenzerkrankungen.....   | 2  |
| <b>Tabelle 3:</b>  | NINDS-AIREN-Kriterien für eine wahrscheinliche vaskuläre Demenz<br>(nach Roman et al.1993).....                               | 3  |
| <b>Tabelle 4:</b>  | Differentialdiagnosen dem Referenzzentrum für TSE vorgestellter<br>CJK-Verdachtsfälle in unterschiedlichen Altersgruppen..... | 9  |
| <b>Tabelle 5:</b>  | Testverfahren des Studienprojektes.....   | 12 |
| <b>Tabelle 6:</b>  | Laborparameter des Studienprojektes.....  | 13 |
| <b>Tabelle 7:</b>  | Beteiligte Einrichtungen und Probandenzahl.....   | 14 |
| <b>Tabelle 8:</b>  | Geschlecht und Alter eingeschlossener Probanden.....  | 14 |
| <b>Tabelle 9:</b>  | Verdachtsdiagnosen bzw. Leitsymptome bei stationärer Aufnahme.....  | 15 |
| <b>Tabelle 10:</b> | Zusammenfassung der Marker-Profile, Publikation I.....  | 20 |
| <b>Tabelle 11:</b> | Im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant abweichende Cytokine<br>und Chemokine, Publikation I.....                         | 22 |
| <b>Tabelle 12:</b> | CSF-Marker und PrPC im Vgl. zur Kontrollgruppe, Publikation II.....   | 23 |
| <b>Tabelle 13:</b> | Signifikante Biomarker-Alterationen (Studienkohorte), Publikation III.  | 25 |
| <b>Tabelle 14:</b> | <i>Table 3. (supplemental)</i> , Publikation I.....   | 45 |
| <b>Tabelle 15:</b> | <i>Table 4. (supplemental)</i> , Publikation I.....   | 46 |
| <b>Tabelle 16:</b> | <i>Supplementary Fig. 1</i> , Publikation II.....   | 58 |

## Abbildungsverzeichnis

|                     |   |    |
|---------------------|---|----|
| <b>Abbildung 1:</b> | cCT und cMRT bei CSVD.....  | 6  |
| <b>Abbildung 2:</b> | Diagnosen der eingeschlossenen Probanden.....   | 16 |
| <b>Abbildung 3:</b> | Gruppenaufteilung der Studienkohorte nach Diagnosen und CSF<br>Biomarkern, Publikation I..... | 18 |
| <b>Abbildung 4:</b> | <i>Supplementary Fig. 2</i> , Publikation II.....   | 59 |
| <b>Abbildung 5:</b> | <i>Supplementary Figure 1</i> , Publikation III.....  | 70 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                            |   |
|----------------------------|---|
| <b>A<math>\beta</math></b> | Beta-Amyloid  |
| <b>AD</b>                  | <i>Alzheimer's Disease</i> , Alzheimer-Erkrankung                                       |
| <b>APOE</b>                | Apolipoprotein E, Polymorphismus  |
| <b>ARWMC</b>               | Age Related White Matter Changes  |
| <b>BBB</b>                 | <i>Blood Brain Barrier</i> , Blut-Hirn-Schranke   |
| <b>cCT</b>                 | Zerebrale Computertomographie   |
| <b>CAMCOG</b>              | <i>Cambridge Cognitive Examination</i>  |
| <b>CERAD</b>               | <i>Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i>                       |
| <b>CJK</b>                 | Creutzfeldt-Jakob-Krankheit   |
| <b>cMRT</b>                | Zerebrale Magnetresonanztomographie   |
| <b>CSF</b>                 | <i>Cerebrospinal Fluid</i> , Liquor   |
| <b>CSVD</b>                | <i>Cerebral Small Vessel Disease</i> , zerebrale Mikroangiopathie                       |
| <b>DLB</b>                 | <i>Dementia with Lewy Bodies</i> , Lewy-Körperchen-Demenz                               |
| <b>ELISA</b>               | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>  |
| <b>FTLD</b>                | <i>Frontotemporal Lobar Degeneration</i>  |
| <b>ICD</b>                 | <i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i> |
| <b>IWG</b>                 | <i>International Working Group</i>  |
| <b>MCI</b>                 | <i>Mild Cognitive Impairment</i> , leichte kognitive Störung                            |
| <b>MD</b>                  | <i>Mixed Dementia</i> , Mischdemenz   |
| <b>MMSE</b>                | <i>Mini Mental Status Examination</i>   |
| <b>MRI</b>                 | <i>Magnetic Resonance Image</i> , = MRT   |
| <b>NIA-AA</b>              | <i>National Institute on Aging and Alzheimer's Association</i>                          |
| <b>PET</b>                 | Positronenemissionstomographie  |
| <b>PrPC</b>                | <i>Cellular Prion Protein</i> , zelluläres Prion-Protein                                |
| <b>pTau</b>                | Phosphoryliertes Tau-Protein  |
| <b>rpAD</b>                | <i>Rapidly Progressive Alzheimer's Disease</i>  |
| <b>UMG</b>                 | Universitätsmedizin Göttingen   |
| <b>VCI</b>                 | <i>Vascular Cognitive Impairment</i> , vaskulär bedingte kognitive Störung              |
| <b>VD/VaD</b>              | <i>Vascular Dementia</i> , vaskuläre Demenz   |
| <b>VD+AD</b>               | Mischdemenz aus Alzheimer Demenz und vaskulärer Demenz                                  |
| <b>VE</b>                  | Vaskuläre Enzephalopathie   |
| <b>WML</b>                 | <i>White Matter Lesions</i> , Läsionen der weißen Substanz                              |
| <b>ZNS</b>                 | Zentrales Nervensystem  |

# 1. Einleitung

## 1.1 Demenz, Definition

Dem ICD-10-Katalog gemäß bezeichnet der Begriff „Demenz“ ein klinisches Syndrom als Folge einer chronischen oder fortschreitenden Krankheit des Gehirns, welches sich wie folgt zusammenfassen lässt (nach WHO et al. 2008):

- Störung kortikaler Funktionen, einschließlich Gedächtnis, Denken, Orientierung, Auffassung, Rechnen, Lernfähigkeit, Sprache, Sprechen und Urteilsvermögen
- das Bewusstsein ist nicht getrübt
- die Symptome halten über mindestens 6 Monate an
- die Sinne funktionieren im für die Person üblichen Rahmen
- Veränderungen von emotionaler Kontrolle, Sozialverhalten oder Motivation können die kognitiven Beeinträchtigungen begleiten oder ihnen vorausgehen
- die Symptome kommen bei AD, Gefäßerkrankungen und anderen Zustandsbildern vor, die primär oder sekundär das Gehirn und die Neuronen betreffen

## 1.2 Merkmale der häufigsten dementiellen Syndrome

Die dementiellen Erkrankungen werden gemäß ihrer Ätiologie zugeordnet. Neben den neurodegenerativen Demenzen wie z. B. AD, DLB und FTLD ist die Demenz infolge vaskulärer Schädigung eine der häufigsten Differentialdiagnosen.

Die AD zeichnet sich klinisch in der Regel durch eine Betonung von Gedächtnisdefiziten aus. Sie bietet neuropathologisch ein typisches kortikales Muster mit Amyloid-Plaques und Ablagerungen aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein (Braak und Braak 1991). Forschungskriterien wurden von der NIA-AA (McKhann et al. 2011) und der IWG (Dubois et al. 2014) definiert. Bei der DLB treten gemäß Konsensus-Kriterien fluktuierende kognitive Symptome, visuelle Halluzinationen und ein Parkinson-Syndrom in engem zeitlichen Zusammenhang auf (McKeith et al. 2005). Es finden sich Einschlüsse (Lewy-Körperchen) mit hohem Anteil an  $\alpha$ -Synuclein vor allem in den Kerngebieten des Hirnstamms. FTLD steht für eine Gruppe von Erkrankungen, die als frontotemporale Demenz, primär progressive Aphasie und semantische Demenz beschrieben werden (Konsensus-Kriterien: Neary et al. 1998). Es stehen Verhaltensänderungen bzw. Sprachstörungen im Vordergrund. In 30-50% der Fälle besteht eine deutliche familiäre Häufung, Mutationen wurden in mehreren Genen mit teils bekannten (u. a. Codierung für das Tau-Protein) und teils unbekanntem Funktionen nachgewiesen (Sieben et al. 2012). Die



VD wird als Folge verschiedener vaskulärer Pathologien und daraus resultierender zerebraler Schädigungen beschrieben. Die klinischen Symptome resultieren im Wesentlichen aus den Ausfällen der jeweils betroffenen Hirnregion. Es existieren mehrere Subtypen, auf die in Kapitel 1.3 eingegangen wird.

### 1.3 Epidemiologie des dementiellen Syndroms

Prävalenz und Inzidenz des dementiellen Syndroms nehmen mit dem Alter zu (zur Prävalenz siehe Tabelle 1, Prince et al. 2013). Frauen sind etwas häufiger als Männer betroffen. Von *Alzheimer's Disease International* (ADI) wurde nach einem Review von 273 Studien zur Prävalenz von Demenzerkrankungen die Anzahl der erkrankten Menschen für 2015 weltweit auf 46,8 Millionen geschätzt (Wimo et al. 2016). Da auch die Lebenserwartung in den meisten Ländern stetig steigt, ist in der Zukunft mit einem weiteren deutlichen Anstieg von erkrankten Individuen zu rechnen.

Tabelle 1: Prävalenz von Demenzerkrankungen in Westeuropa, Prince et al. 2013

| Alter (Jahre) | 60-64 | 65-69 | 70-74 | 75-79 | 80-84 | 85-89 | 90+  | >90  |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| Prävalenz (%) | 1,6   | 2,6   | 4,3   | 7,4   | 12,9  | 21,7  | 43,1 | 6,92 |

Die AD ist, wie bereits in Kapitel 1.1. erwähnt, als häufigste Demenzform anzusehen. Darüber hinaus bestehen in der Literatur teils beträchtliche Unterschiede, insbesondere was das verhältnismäßige Auftreten von VD, MD und DLB betrifft (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Relative Häufigkeit verschiedener Demenzerkrankungen

|  | AD  | VD  | AD+VD | DLB | FTLD | Andere |
|--|-----|-----|-------|-----|------|--------|
| <b>Brunnström et al. 2009</b>              | 42% | 24% | 22%   |     | 4%   | 9%     |
| <b>De Pedro-Cuesta et al. 2009</b>         | 59% | 20% |       |     |      | 21%    |
| <b>Jellinger und Attems et al. 2007</b>    | 67% | 11% | 5%    |     |      | 16%    |
| <b>Schneider et al. 2007</b>               | 30% | 38% | 12%   | 12% |      | 8%     |
| <b>Seno et al. 1999</b>                    | 34% | 35% | 11%   |     |      | 20%    |
| <b>Neuropathology Group. MRC CFAS 2001</b> | 64% | 46% |       |     |      |        |

## 1.4 Vaskuläre Demenz

Das Konzept einer im Alter auftretenden und durch Gefäßprozesse bedingten “Senilität“ wurde bereits im 19. Jahrhundert durch namhafte Forscher wie Rudolf Virchow, Otto Binswanger und Alois Alzheimer beschrieben. Die heute weithin gültigen diagnostischen Kriterien stammen vom *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* und der *Association Internationale pour la Recherche et l' Enseignement en Neurosciences* (NINDS-AIREN; Roman et al. 1993). Sie beinhalten das Vorhandensein eines dementiellen Syndroms und den Nachweis einer zerebrovaskulären Erkrankung sowie eine Verknüpfung dieser beiden Kriterien (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: NINDS-AIREN-Kriterien für wahrscheinliche vaskuläre Demenz nach Roman et al. 1993 (DGN und DGPPN 2016)

|  |
|--|
| <b>I. Demenz</b>   |
| <p><b>Kognitive Verschlechterung, bezogen auf ein vorausgehendes höheres Funktionsniveau, manifestiert durch Gedächtnisstörung und mindestens zwei der folgenden Fähigkeiten:</b> Orientierung, Aufmerksamkeit, Sprache, visuell-räumliche Fähigkeiten, Urteilsvermögen, Handlungsfähigkeit, Abstraktionsfähigkeit, motorische Kontrolle, Praxie</p> <p><b>Alltagsaktivitäten müssen beeinträchtigt sein</b></p> <p><b>Ausschlusskriterien:</b> Bewusstseinsstörung, Delirium, Psychose, schwere Aphasie, ausgeprägte sensomotorische Störung (die Testung unmöglich macht), systemische oder andere Hirnerkrankungen (welche ihrerseits kognitive Störungen verursachen können)</p>                     |
| <b>II. Zerebrovaskuläre Erkrankung</b>   |
| <p><b>Zentrale fokal-neurologische Zeichen mit und ohne anamnestischen Schlaganfall und Zeichen einer relevanten zerebrovaskulären Erkrankung im CT/MR</b></p> <p><b>Schlaganfälle Großgefäßterritorien:</b> Bds. A. cerebri anterior, A. cerebri posterior, parietotemporale und tempoparietale Regionen, superiore frontale und parietale Regionen</p> <p><b>Kleingefäß Erkrankungen:</b> Basalganglien und frontale Marklagerlakunen, ausgedehnte periventrikuläre Marklagerläsionen, beidseitige Thalamusläsionen</p> <p><b>Ausmaß:</b> Großgefäßläsionen in der dominanten Hemisphäre, beidseitige hemisphärische Großgefäßläsionen, Leukoenzephalopathie <math>\geq 25\%</math> des Marklagers</p> |
| <b>III. Eine Verknüpfung von I. und II.</b>  |
| <p><b>Definiert durch mindestens eine der folgenden Bedingungen:</b> Beginn der Demenz innerhalb von drei Monaten nach einem Schlaganfall, abrupte Verschlechterung kognitiver Funktionen, fluktuierende oder stufenweise Progression der kognitiven Defizite</p> <p><b>Unterstützende Merkmale:</b> Früh auftretende Gangstörungen, motorische Unsicherheit und häufige Stürze, Blasenstörung (nicht urologisch erklärbar), Pseudobulbärparalyse, Persönlichkeitsstörungen und Stimmungsänderungen, Abulie, Depression, emotionale Inkontinenz, andere subkortikale Defizite</p>  |

### 1.4.1 Entitäten der vaskulären Demenz

Wie aus den in Tabelle 2 aufgeführten Daten zu schließen ist, bleibt die klinische und pathologische differentialdiagnostische Einordnung der dementiellen Syndrome in vielen Fällen unscharf. Erschwerend wirkt sich in diesem Zusammenhang die Tatsache aus, dass die vaskuläre Demenz eine heterogene Erkrankung ist, welche mehrere Krankheitsentitäten einschließt. Der ICD-10-Katalog der World Health Organization unterscheidet folgende vaskuläre Demenzen:

- Vaskuläre Demenz mit akutem Beginn nach Schlaganfällen als Folge von zerebrovaskulärer Thrombose, Embolie oder Blutung
- Multiinfarkt-Demenz mit allmählichem Beginn nach mehreren ischämischen Episoden, die eine Anhäufung von Infarkten im Hirngewebe verursachen
- Subkortikale vaskuläre Demenz mit ischämischen Herden im Marklager der Hemisphären
- Gemischte kortikale und subkortikale vaskuläre Demenz
- Sonstige vaskuläre Demenz

Neben der in diesen Katalog eingeflossenen Unterscheidung zwischen akutem und schleichendem Beginn sowie kortikalen und subkortikalen Läsionen wird häufig auch eine Einteilung gemäß Vorliegen einer Mikro- oder Makroangiopathie vorgenommen. Als wichtige Sonderformen der vaskulären Demenz gelten zudem auf Grund ihrer besonderen Ätiologie:

- Demenz bei Amyloidangiopathie mit wiederholten zerebralen Hämorrhagien durch Einlagerung von Proteinen in zerebralen Gefäßwänden und der daraus folgenden Degeneration
- Demenz bei ZNS-Vaskulitis durch wiederholte Ischämien und Hämorrhagien als Folge einer autoimmun vermittelten Inflammation der Gefäße
- Demenz bei Gendefekten, wie z. B. CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) durch wiederholte Ischämien als Folge einer Degeneration von Gefäßmuskelzellen, Morbus Fabry oder MELAS-Syndrom (Mitochondriale Enzephalopathie mit Laktatazidose und Schlaganfällen)

### **1.4.2 Demenz bei zerebraler Mikroangiopathie (CSVD)**

Die CSVD ist gemäß Studienlage die häufigste Ursache für vaskuläre Demenzen. Im Rahmen der VantagE-Studie ließen sich bei Patienten mit VD in 74% der Fälle mikroangiopathische, in 18% makroangiopathische und in 8% beide Formen zerebrovaskulärer Läsionen nachweisen (Staekenborg et al. 2008).

#### **1.4.2.1 Definition, Ätiologie**

Die CSVD betrifft die kleinen Arterien, Arteriolen und Kapillaren. Neuropathologisch lassen sich verschiedene für kognitive Defizite ursächliche Erscheinungsformen der CSVD definieren (nach Jellinger 2013):

- Multiple, durch Mikroinfarkte verursachte Lakunen des subkortikalen Hirnparenchyms bis hin zum „Status lacunaris“ oder „État criblé“
- Subkortikale Leukenzephalopathie (Morbus Binswanger)
- Multiple Mikroinfarkte mit konsekutiver granulärer Atrophie des Cortex
- hereditäre Angiopathien (CADASIL)

Zudem wird eine „Strategische Infarkt-Demenz“ (SID) beschrieben, bei der ein einzelner kleiner Infarkt in einem vulnerablen Bereich (z. B. Basalganglien/Thalamus, Hippocampus, fronto-basal) ohne eine darüber hinausgehende CSVD vorliegt.

Die zu Lakunen oder strategischen Läsionen führenden Mikroinfarkte können ebenso wie größere Infarkte durch arterielle Embolien oder hämodynamische Effekte verursacht werden. Es gelten die gleichen Risikofaktoren, wie bei anderen vaskulären Erkrankungen (arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie, Nikotinabusus und familiäre Disposition). Ferner können Mikroblutungen durch eine Amyloidangiopathie oder eine ZNS-Vaskulitis verursacht werden. Die subkortikale Leukenzephalopathie (auch subkortikale arteriosklerotische Enzephalopathie, SAE oder M. Binswanger) ist eine langsam progrediente Erkrankung, welche durch die bereits genannten Risikofaktoren begünstigt wird. An erster Stelle steht hier der arterielle Hypertonus. Laut gängigen Krankheitsmodellen kommt es im Rahmen arteriosklerotischer Veränderungen der kleinen Gefäße direkt zu chronischen Ischämien mit den daraus resultierenden Zellschäden oder aber zunächst zu einer endothelialen Dysfunktion der kleinen Gefäße und einer lokalen Störung der Blut-Hirn-Schranke. Daraus folgen Lipohyalinose und Nekrose der Gefäßwandzellen (Pantoni 2002). Es kommt zu einer Demyelinisierung des Marklagers,

was zur Schädigung der subkortikalen Fasern und sekundär auch zum Verlust von Nervenzellen führt.

#### **1.4.2.2 Diagnostik**

In der klinisch-neurologischen Untersuchung finden sich vor allem subkortikale neurologische Zeichen wie z.B. Gangunsicherheit, extrapyramidal-motorische Störungen und Harninkontinenz (Olsen und Clasen 1998). Es können auch affektive Störungen und Persönlichkeitsveränderungen auftreten. Bezüglich der kognitiven Symptome, zeigen sich neben der eingeschränkten Gedächtnisfunktion (als Teil der Demenzdefinition) vor allem exekutive Funktionen wie planerisches Denken, Aufmerksamkeit und Affektkontrolle beeinträchtigt (Ying et al. 2016). Zur Diagnostik stehen Kurztests z. B. MMSE, DemTect und Uhrentests oder ausführliche Testbatterien (z. B. CERAD-Batterie) zur Verfügung. Eine zerebrale Bildgebung ist gemäß Kriterien zur Diagnosestellung einer vaskulären Demenz unabdingbar. In einer cCT lassen sich Lakunen und WML zwar prinzipiell darstellen, die cMRT ist jedoch das Mittel der Wahl. Durch T2 und Flair-Wichtungen lassen sich WML gut nachweisen und differentialdiagnostisch einordnen. Zur Detektion von Mikroblutungen kann eine T2\* oder SWI-Wichtung sinnvoll sein. Die sogenannte DTI-Wichtung ermöglicht Aussagen über die strukturelle Integrität des Marklagers und korreliert laut Nitkunan und Kollegen (2008) am besten mit exekutiven Funktionen, wird jedoch klinisch nicht regelhaft angewendet. Es sollte eine Duplexsonographie der hirnversorgenden Gefäße zum Ausschluss einer Stenose erfolgen. PET-Untersuchungen zeigen keine spezifischen einheitlichen Befunde.

Abbildung 1: cCT und cMRT bei CSVD



cCT: Lakunen und WML

cMRT(T2): WML

cMRT(SWI): Mikroblutungen

Quelle: UMG, Abteilung Neuroradiologie, aus Probandendaten des ab Kapitel 2 beschriebenen Studienprojektes

Auch liquorchemische Untersuchungen spielen in Ermangelung spezifischer Marker vor allem in der Differentialdiagnostik eine Rolle. Der Ausschluss eines entzündlichen ZNS-Prozesses mittels Lumbalpunktion ist zwingend notwendig. CSF-Biomarker wie Tau-Protein, pTau, A $\beta$  1-42 und A $\beta$  1-40 können eine Abgrenzung zur Alzheimer-Demenz ermöglichen (Lewczuk et al. 2004, Wallin et al. 2016). Ein erhöhter Albumin-Quotient als Zeichen einer gestörten BBB-Funktion bei CSVD wird seit längerem kontrovers diskutiert (Farrall und Wardlaw 2009).

Die Blutuntersuchung ist ebenfalls zur Ausschlussdiagnostik (z. B. metabolische Enzephalopathien, Hypothyreose) und zur Detektion von Risikofaktoren angezeigt. Bei Verdacht auf CADASIL oder Thrombophilie kann eine genetische Untersuchung erwogen werden. Im EEG finden sich keine spezifischen Muster, es können jedoch ggf. Hinweise für eine symptomatische Epilepsie auf dem Boden der CSVD gefunden werden.

### **1.4.2.3 Therapie**

Die medikamentöse Therapie der VD bei CSVD zielt vor allem auf die Behandlung der Risikofaktoren ab. Es werden ggf. die Behandlung von arteriellem Hypertonus, Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämie empfohlen. Antikoagulanzen sind bei Vorhofflimmern als Primärprävention einer zerebralen Ischämie und Acetylsalicylsäure zur Sekundärprävention nach Schlaganfall indiziert. Darüber hinaus besteht für die Gabe von Acetylsalicylsäure zur Therapie einer VD laut eines Cochrane Reviews keine Evidenz (Williams et al. 2000).

Zur Behandlung der kognitiven Symptome und der Alltagsfähigkeiten gibt es keine zugelassene Medikation. Analog zur Therapie bei AD gibt es jedoch Hinweise auf eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten durch Acetylcholinesterase-Hemmer und Memantine (Kavirajan und Schneider 2007). Dabei waren die gemessenen Effekte jedoch geringer als bei der Therapie der AD. Neben der Pharmakotherapie sollten bei Demenzerkrankungen im Allgemeinen auch andere Verfahren wie kognitive Stimulation, Ergotherapie und körperliche Aktivierung durchgeführt werden.

Insgesamt erschweren jedoch die multiplen Entitäten und die weiterhin äußerst schwierige differentialdiagnostische Abgrenzung der VD von AD und MD die Generierung von Evidenzen.

### **1.5 „Mischdemenz“**

Gemäß IWG-Kriterien (Dubois et al. 2014) werden zur Diagnose einer MD i. S. einer Mischform aus AD und VD die klinischen Merkmale einer AD sowie pathologische CSF-Biomarker (Tau, pTau, A $\beta$ 42) oder eine positive Amyloid-PET vorausgesetzt. Zudem müssen klinische Zeichen und ein MR-basierter Nachweis einer zerebrovaskulären Erkrankung vorliegen. Dies entspricht im Wesentlichen einem Vorliegen der Kriterien für AD (z.B. nach Dubois et al. 2014) und VD (nach Roman et al. 1993). Des Weiteren wird eine Mischform von AD und DLB beschrieben. In einer österreichischen Autopsie-Studie zeigte sich, dass bei 24% aller untersuchten Individuen mit Alzheimer-Pathologie zusätzlich eine vaskuläre Pathologie vorlag (Jellinger und Attems 2007). Es wird weithin vermutet, dass es einen Zusammenhang zwischen beiden Erkrankungen gibt, sei es i. S. eines fakultativen oder gar i. S. eines für die klinische Manifestation zwingenden synergistischen Effektes (Román und Royall 2004, De la Torre 2002). Es bleibt jedoch auch unter Anwendung der klinischen Kriterien unklar, in welchem Ausmaß die jeweiligen Pathologien bei gemeinsamem Vorkommen zum dementiellen Syndrom beitragen. Dementsprechend variieren die epidemiologischen Angaben zur MD erheblich (Tab. 2).

### **1.6 Mild cognitive Impairment und Vascular Cognitive Impairment**

Das Konzept der „leichten kognitiven Beeinträchtigung“ (MCI) entstand aus der Annahme, dass bereits vor der klinischen Manifestation eines dementiellen Syndroms eine kognitive Beeinträchtigung des betroffenen Individuums mit neuropsychologischen Testverfahren feststellbar ist. Dabei ist entscheidend, dass die Alltagskompetenz erhalten bleibt. Entsprechende Kriterien wurden von der „International Working Group on Mild Cognitive Impairment“ (Winblad et al. 2004) empfohlen. Die sogenannte Konversionsrate (von MCI zum dementiellen Syndrom) liegt zwischen 5 und 10% pro Jahr und somit entwickeln viele betroffene Individuen auch nach 10 Jahren noch kein dementielles Syndrom (Mitchell et al. 2009). Es werden Unterformen je nach Profil der Defizite definiert, so z.B. „amnesic MCI“ als Risikofaktor für die Entwicklung einer AD (Petersen et al. 2001). Auch hier stehen Biomarker im Fokus der wissenschaftlichen Diskussion, da gezeigt werden konnte, dass z. B. Individuen mit pathologischen CSF-Biomarkern (A $\beta$  42, Tau, pTau) mit hoher Wahrscheinlichkeit in relativ kurzem Zeitraum eine AD entwickeln (Mattsson et al. 2009). Für die kognitive Beeinträchtigung bei vaskulärer Enzephalopathie wurde der Begriff „VCI“ als Frühform einer VD definiert (Hachinski et al. 2006). In einer neueren Studie wurde eine Konsensus-Klassifikation angestrebt (Skrobot et al. 2017).

## 1.7 Fragestellung

Am Beispiel des diagnostischen liquorchemischen Labors der Demenzforschungsgruppe (Abteilung Neurologie, UMG) zeigte sich, dass die VD eine wichtige Differentialdiagnose zur CJK insbesondere bei Patienten in fortgeschrittenem Lebensalter war (Tabelle 4, Bartl 2005).

Tabelle 4: Differentialdiagnosen dem Referenzzentrum vorgestellter, nicht bestätigter CJK-Verdachtsfälle in unterschiedlichen Altersgruppen (Bartl 2005)

| Lebensalter                         | < 50 | 50 - 60 | 60 - 70 | 70 – 80 | > 80 |
|-------------------------------------|------|---------|---------|---------|------|
| <b>AD</b>                           | 12%  | 49%     | 38%     | 31%     | 22%  |
| <b>VD</b>                           | 0    | 2%      | 9%      | 29%     | 33%  |
| <b>Neurodegenerative Erkrankung</b> | 21%  | 16%     | 15%     | 22%     | 22%  |
| <b>Entzündlich</b>                  | 24%  | 16%     | 9%      | 6%      | 0    |
| <b>Metabolisch</b>                  | 19%  | 7%      | 13%     | 2%      | 0    |
| <b>Tumor</b>                        | 7%   | 7%      | 9%      | 4%      | 11%  |
| <b>Psychiatrisch</b>                | 10%  | 4%      | 6%      | 4%      | 0    |
| <b>Andere</b>                       | 7%   | 0       | 1&      | 2%      | 11%  |

Auch und vor allem die Differenzierung zwischen AD, VD und den sogenannten Mischdemenzen kann durch die klinischen Kriterien häufig nicht gewährleistet werden (Pohjasvaara et al. 2000, O’Brian und Thomas 2015). Dies führt u.a. dazu, dass viele Studien keine eindeutig diagnostizierten Patientenkohorten aufweisen. Damit sind z. B. die beträchtlichen Unterschiede bei Angaben zu den relativen Häufigkeiten der verschiedenen Ursachen für dementielle Erkrankungen zu erklären (siehe Kapitel 1.3). Die neueren Forschungskriterien beziehen auch CSF-Marker und Amyloid-PET ein (McKhann et al. 2011 und Dubois et al. 2014). Es bleibt jedoch unklar, ob hinreichende diagnostische Spezifitäten und Sensitivitäten erreicht werden, da bis dato weiterhin keine einheitlichen neuropathologischen Kriterien vorliegen (Jellinger 2013). In diesem Zusammenhang sind auch die Rollen von WML und Biomarkern in der Diagnostik sowie ihre Bedeutung als prognostische Faktoren weiterhin Teil der wissenschaftlichen Diskussion.

Um diese Frage zu untersuchen, sollten Patienten der neurologischen Abteilung der UMG, die Zeichen einer Mikroangiopathie in der zerebralen Bildgebung zeigten, näher untersucht werden. Die erhobenen Daten bilden die Grundlage für die in den folgenden Kapiteln aufgeführten Arbeiten.



## 2. Methoden

### 2.1 Studienprojekt: Untersuchungen zur prognostischen Aussagekraft von liquor-chemischen Markern in der Diagnostik und Differentialdiagnostik der CJK und vaskulärer Demenzen

Die Studie wurde in der Demenzforschungsgruppe der Abteilung Neurologie (ab 2012 Teil des klinischen Demenzzentrums KDZ) der Universitätsmedizin Göttingen geplant und durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch die Leiterin der Arbeitsgruppe, Prof. Dr. Inga Zerr sowie durch Dr. med. Uta Heinemann und Peter Hermann, den Autor dieser Dissertation. Die Genehmigung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen unter Vorsitz von Prof. Dr. Jürgen Brockmöller erfolgte am 10. Oktober 2007 unter der Nummer 34/9/07. Es wurde eine Probandenzahl von ca. 200 Personen angestrebt, welche im Rahmen einer klinischen Querschnittstudie rekrutiert werden sollte. Probandenrekrutierung und Datenaufnahme erfolgten von Oktober 2007 bis September 2012 direkt durch oder koordiniert von Peter Hermann. Ansprechpartner für Rekrutierungen aus der kooperierenden Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der UMG war PD Dr. med. D. Degner, für Rekrutierungen aus dem Asklepios Fachklinikum für Psychiatrie und Psychotherapie in Göttingen Dr. med. A. Kouris.

### 2.2 Material und Methoden

#### 2.2.1 Einschlusskriterien

Die Einschlüsse überwiegend stationär aufgenommenener Patienten basierten auf cCT- und cMRT-Befunden, die durch die Fachärzte der neuroradiologischen Abteilung der UMG erstellt wurden.

#### Einschlusskriterien:

- In cMRT oder cCT nachgewiesene Läsionen im Sinne einer zerebralen Mikrongiopathie
- Schriftliche Einwilligung des Patienten bzw. eines gesetzlichen Betreuers liegt vor

#### Ausschlusskriterium:

- Klinisch zerebraler Infarkt innerhalb der letzten 8 Wochen oder radiologischer Nachweis einer abgelaufenen territorialen Ischämie oder Hämorrhagie

### **2.2.2 Bildgebung**

Die zerebrale Bildgebung wurde in der Abteilung Neuroradiologie der UMG durchgeführt. Lediglich einige der aus dem Asklepios Fachklinikum für Psychiatrie und Psychotherapie eingeschlossenen Probanden erhielten eine cMRT in externen radiologischen Praxen. Nach Studieneinschluss wurde das Ausmaß der WMLs als Zeichen der CSVD mittels zweier semiquantitativer Skalen, der Sheltens-Skala (nur cMRT; Sheltens et al. 1993) und der ARWMC-Skala (cCT und cMRT; Wahlund et al. 2001) erhoben. Die Auswertung erfolgte durch einen erfahrenen externen Neuroradiologen (Carlos Romero MD, Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia, Buenos Aires).

### **2.2.3 Klinische Daten und Interview**

Nach Einschluss und Unterzeichnung der Einverständniserklärungen durch Probanden oder ggf. gesetzliche Betreuer/Betreuerinnen erfolgte ein ausführliches Interview. Es wurden neben Alter, Größe, Gewicht, Händigkeit, Beruf und Ausbildungsstand auch Informationen zu Medikamentenanamnese und Risikofaktoren sowie die Familienanamnesen für Demenzerkrankungen und für kardiovaskuläre Erkrankungen erhoben. Zudem wurden ein Hachinski-Ischämie-Score (Hachinski et al. 1975, Rosen et al. 1980) und ein Barthel-Index (Mahoney und Barthel 1965) erhoben. Nach Abschluss des stationären Aufenthalts bzw. der ambulanten Vorstellung wurden die Diagnosen und der klinisch-neurologische Befund aus den jeweiligen Arztbriefen übernommen.

### **2.2.4 Testverfahren**

Nach dem Aufnahmeinterview wurde zunächst eine ausführliche neuropsychologische Testbatterie durchgeführt. Noch während des Aufenthalts in der Klinik fand ein zusätzliches Angehörigeninterview zur Erhebung des Frontal Behavioral Inventory statt. Des Weiteren wurden zusätzliche klinische Testungen durchgeführt. Die Tabelle 5 liefert einen Überblick über die angewandten Testverfahren.

Tabelle 5: Testverfahren des Studienprojekts

| <b>Kognitive Testverfahren</b>   |
|--|
| Mini Mental Status Examination, MMSE (Folstein et al. 1975)            |
| Uhrentest (Shulman et al. 1993)  |
| CLOX 1+2 (Royall et al. 1998)  |
| DEMTEC (Kalbe et al. 2004)   |
| Teil B des Camdex, CamCog (Roth et al. 1986)                           |
| Phonematische Wortflüssigkeit (K-Wörter)                               |
| Trail Making Test A+B (Oswald 1979)                                    |
| Boston-Naming-Test (Kaplan et al. 1983)                                |
| <b>Neurologische und motorische Testverfahren</b>                      |
| Unified Parkinson's Disease Rating Scale, UPDRS III (Fahn et al. 1987) |
| Sitting/Standing Balance Scale   |
| Timed up and go (Podsiadlo und Richardson 1991)                        |
| Ataxie-Skala (Klockgether 1990)  |
| <b>Psychologische Testverfahren</b>                                    |
| Hamilton Rating Scale For Depression (Hamilton 1960)                   |
| Frontal Behavioral Inventory, FBI (Kertesz et al. 1997)                |

### 2.2.5 Laborparameter

Die Proben der nach gesonderter Einwilligung durchgeführten Blutentnahme wurden durch das Labor der Prionforschung der UMG aufbereitet und eingefroren. Andere Untersuchungsparameter wurden aus den Befunden der Klinischen Chemie der UMG entnommen. Im Falle einer diagnostisch notwendigen Lumbalpunktion wurden mit Einverständnis der Probanden und nach Rücksprache mit den punktierenden Ärzten/Ärztinnen aus dem nach der diagnostischen Abklärung verbleibenden Restmaterial 2ml CSF asserviert und bei -80° Celsius eingelagert. Routinewerte wurden dem Befund des liquorchemischen Labors der UMG entnommen. Tau-Protein, phosphoryliertes Tau-Protein, Beta-Amyloid 40 und 42 wurden – soweit nicht in der Routineuntersuchung erfolgt – mittels ELISA nachbestimmt. Die Tabelle 6 bietet einen Überblick über die dokumentierten Biomarker.

Tabelle 6: Dokumentierte Laborparameter

| <b>Marker aus Blutproben</b>  |
|---|
| Vitamin B12-Spiegel (ng/l), Folsäure-Spiegel (ng/ml)<br>TSH( $\mu$ IU/ml), fT3 (pmol/l), fT4 (ng/dl)<br>Harnsäure–Serumspiegel (mg/dl)<br>HbA1c(%)<br>Homocystein-Spiegel ( $\mu$ mol/l)<br>Cholesterin, HDL, LDL, Triglyceride (mg/dl)<br>ANA, pANCA, Antiphospholipid-Antikörper<br>APC-Resistenz |
| <b>CSF-Marker</b>   |
| Zellzahl (Leukozyten/mm <sup>3</sup> )<br>Gesamteiweiß (mg/l)<br>Albuminquotient (CSF-Albumin/Serum-Albumin*10 <sup>3</sup> )<br>Beta-Amyloid 1-42, Beta-Amyloid 1-40 (pg/ml)<br>Tau-Protein, phosphoryliertes Tau-Protein (pg/ml)  |
| <b>Genetik</b>  |
| Polymorphismus des ApoE-Gens auf Chromosom 19   |

### 2.2.6. Archivierung und Datenschutz

Die im Rahmen des Studienprojekts erhobenen Daten wurden in Papierform auf dafür entworfenen Listen dokumentiert. Die Listen wurden in einem Raum archiviert, der nur den an dem Studienprojekt beteiligten Personen zugänglich ist. Im selben Raum wurde auf einem Computer ohne Datennetzanbindung eine elektronische Datenbank angelegt, welche von einem externen Programmierer in Zusammenarbeit mit dem Autor dieser Dissertation entworfen und programmiert wurde. Die Daten wurden ausschließlich anonymisiert in Form von wissenschaftlichen Vorträgen und Publikationen weitergegeben.

## 2.3 Studienverlauf, ausgewählte deskriptive Daten

Zwischen Oktober 2007 und September 2012 wurden insgesamt 236 Probanden eingeschlossen. Ein Proband wurde nachträglich aus allen Daten- und Biobanken entfernt, da die Einwilligung zurückgezogen wurde. Die ursprüngliche Rekrutierung der Probanden erfolgte aus Patienten der Kliniken für Neurologie, Klinische Neurophysiologie und

Psychiatrie der UMG sowie aus Patienten des Asklepios Fachklinikums für Psychiatrie und Psychotherapie in Göttingen (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Beteiligte Einrichtungen und Probandenzahl

|  | <b>Anzahl Probanden</b> |
|--|-------------------------|
| <b>Klinik für Neurologie, UMG</b>                                | 198                     |
| <b>Klinik für Klinische Neurophysiologie, UMG</b>                | 23                      |
| <b>Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, UMG</b>            | 4                       |
| <b>Asklepios Fachklinikum für Psychiatrie und Psychotherapie</b> | 10                      |

Es wurden Patienten im Lebensalter zwischen 37 und 89 Jahren eingeschlossen, der Median lag bei 74 Jahren zum Zeitpunkt der Datenaufnahme. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die erfassten Geschlechter (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Geschlecht und Alter eingeschlossener Probanden

|                 | <b>Anzahl</b> | <b>Alter (Median)</b> | <b>Alter (Min. – Max.)</b> |
|-----------------|---------------|-----------------------|----------------------------|
| <b>Gesamt</b>   | 235           | 74                    | 37 – 89                    |
| <b>Weiblich</b> | 115 (48,9%)   | 74                    | 37 – 89                    |
| <b>Männlich</b> | 120 (51,1%)   | 73                    | 37 – 87                    |

Insgesamt wurde die umfangreiche, im Kapitel 2.2. aufgeführte Datensammlung nicht bei allen rekrutierten Probanden komplettiert. Die Gründe hierfür waren vielfältig. So konnte z.B. bei einigen Probanden keine komplette neuropsychologische Testbatterie durchgeführt werden, weil die schwere des dementiellen Syndroms keine differenziertere Testung einzelner kognitiver Domänen mehr zuließ. Da eine Lumbalpunktion zu Studienzwecken nicht vorgesehen war, erfolgte die Untersuchung und Lagerung von CSF nur in 158 Fällen, in denen eine Lumbalpunktion im Rahmen der Diagnostik durchgeführt worden war. Von 187 Probanden konnte eine cMRT ausgewertet werden, bei 48 lag lediglich eine cCT vor. Der Einschluss erfolgte, wie im Kapitel 2.2. beschrieben, auf Grund des Nachweises einer CSVD in der zerebralen Bildgebung. Die Probanden stellten sich den teilnehmenden Kliniken jedoch mit verschiedenen Verdachtsdiagnosen, Vorbefunden oder Symptomen vor. Einen Überblick bietet die Tabelle 9. Hierbei ist erwähnenswert, dass das Vorliegen kognitiver Defizite oder gar eines dementiellen Syndroms in nur 27,2% der Fälle Grund für die Vorstellung war.

Tabelle 9: Verdachtsdiagnosen bzw. Leitsymptome bei stationärer Aufnahme

|                                      | <b>Anzahl<br/>Probanden</b> |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Kognitive Defizite/ Demenzerkrankung | 64                          |
| Andere fokal-neurologische Defizite  | 37                          |
| Epileptische Anfälle                 | 24                          |
| Parkinson-Syndrom                    | 20                          |
| Periphere Neuropathie                | 17                          |
| Depression                           | 16                          |
| Gangunsicherheit                     | 13                          |
| Bekannte zerebrale Vaskulitis        | 12                          |
| Schwindel                            | 8                           |
| Zephalgie                            | 7                           |
| Enzephalitis                         | 7                           |
| Arterielle Stenose                   | 4                           |
| Radiologischer Vorbefund: SAE        | 3                           |
| Synkopen                             | 3                           |

Die Abbildung 2 zeigt eine Zusammenfassung der für das Studienprojekt maßgeblichen Diagnosen bei Entlassung. In die Kategorie „CSVD ohne kognitive Defizite“ fielen die Probanden, deren Entlassungsdiagnosen zwar mit der Mikroangiopathie assoziiert waren (z.B. vaskuläres Parkinson-Syndrom, epileptische Anfälle etc.), die jedoch in den neuropsychologischen Testungen keine signifikanten kognitiven Einschränkungen zeigten. Bei Einschluss der Probanden waren in der Regel nur die Leitsymptome und die Bildgebung bekannt. Dies führte dazu, dass im Rahmen der weiteren Diagnostik auch relevante neurologische Pathologien nachgewiesen worden, die - soweit beurteilbar - keinen direkten Zusammenhang mit der zerebralen Mikroangiopathie hatten. So erfolgte z. B. bei einigen Probanden der Nachweis einer Enzephalitis in der CSF-Analyse. Des Weiteren fielen bei einigen Probanden in der cMRT akute bzw. subakute zerebrale Ischämien auf, welche in der initial vor Einschluss durchgeführten cCT aus methodischen Gründen nicht darstellbar waren. Diese Fälle werden in der Abbildung 2 unter „Andere“ zusammengefasst.

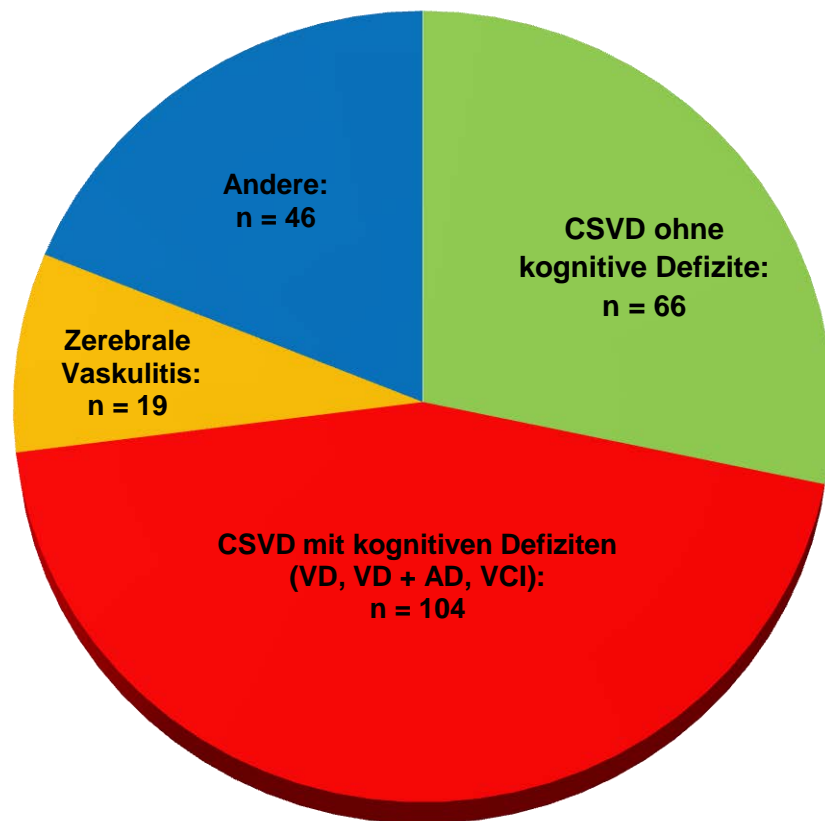


Abbildung 2: Diagnosen der eingeschlossenen Probanden

## 3. Zusammenfassungen der Publikationen

### 3.1. Publikation I:

Hermann P, Romero C, Schmidt C, Reis C, Zerr I (2014). CSF biomarkers and neuropsychological profiles in patients with cerebral small-vessel disease. PLoS One 9(8), e105000.

#### Hintergrund und Ziele

Vor dem Hintergrund einer schwierigen klinischen, wie auch neuropathologischen Diskrimination zwischen VD, AD und MD (Cavalieri et al. 2010) entstanden die Untersuchungen der Publikation im Sinne der in Kapitel 1.7 formulierten Fragestellung. Insbesondere trifft die Problematik auf die Unterscheidung zwischen VD und AD bzw. MD bei CSVD zu, da in diesen Fällen die klinische Präsentation oft nicht die typischen Zeichen bietet, welche in den Kriterien (Roman et al. 1993, Dubois et al. 2014) beschrieben werden. Die angesprochene Diskrimination kann ggf. mittels ausgedehnter neuropsychologischer Testung (Schmidtke und Hüll 2002) und CSF-Biomarkern gelingen, soweit dies bei fehlendem Vorliegen standardisierter neuropathologischer Kriterien (Jellinger 2013) möglich ist. Des Weiteren wird die Bedeutung von WML kontrovers diskutiert. Sie werden als diagnostischer Marker in den oben erwähnten Kriterien aufgeführt und sollen einen Risikofaktor für eine kognitive Einschränkung insbesondere der exekutiven Funktionen darstellen (Schmidt et al. 2012). Allerdings finden sie sich auch bei kognitiv gesunden älteren Menschen und insbesondere bei Patienten mit AD (O'Brian et al. 1996).

Im Rahmen der vorliegenden Publikation sollte untersucht werden, inwiefern sich CSF-Biomarker, kognitive Funktionen und die Ausprägung der WML in verschiedenen Subgruppen einer Kohorte von Patienten mit CSVD unterschiedlich darstellen.

#### Methoden

Alle Daten, bis auf die der Vergleichsgruppe „AD“, wurden aus der beschriebenen Studie entnommen, sofern die Probanden vor 05/2012 eingeschlossen waren. Dabei wurden Probanden ausgeschlossen, die Hinweise auf andere hirnorganische Erkrankungen aufwiesen (außer AD und CSVD), sowie Patienten, bei denen nicht der komplette untersuchte Datensatz aus cMRT, CSF, neuropsychologischer Testung vorlag.

Die 92 verbliebenen Probanden wurden anhand des Vorhandenseins kognitiver Defizite in Gruppen aufgeteilt. Als kognitiv nicht eingeschränkt (*controls*) wurden Patienten



angesehen, deren Punktzahl in der MMSE weniger als 1,5 Standardabweichungen unterhalb des Referenzwertes lagen. Die dafür nötige Auswertung erfolgte mit Hilfe populationsbasierter Daten der CERAD-Plus Online Datenbank der Memory Clinic der Universität Basel.

Die Probandengruppe kognitiv eingeschränkter Patienten wurde anhand der A $\beta$ -Ratio (1-42/1-40) unterteilt (Cut-off 0,975 nach Lewczuk et al. 2004). Ziel war es, eine Gruppe ohne Hinweise auf Amyloid-Pathologie (group1) einer Gruppe mit AD-typischer CSF-Biomarker-Signatur (group2) gegenüberzustellen. Aus der ebenfalls von der Demenzforschungsgruppe der Abteilung Neurologie der UMG durchgeführten RPAD-Studie wurden Daten entnommen, um eine Vergleichsgruppe zu erhalten, die die Kriterien einer AD erfüllten (Dubois et al. 2007) und dabei keine Zeichen einer relevanten CSVD im cMRT zeigten. Die Abbildung 3 bietet einen Überblick über die vier Gruppen.

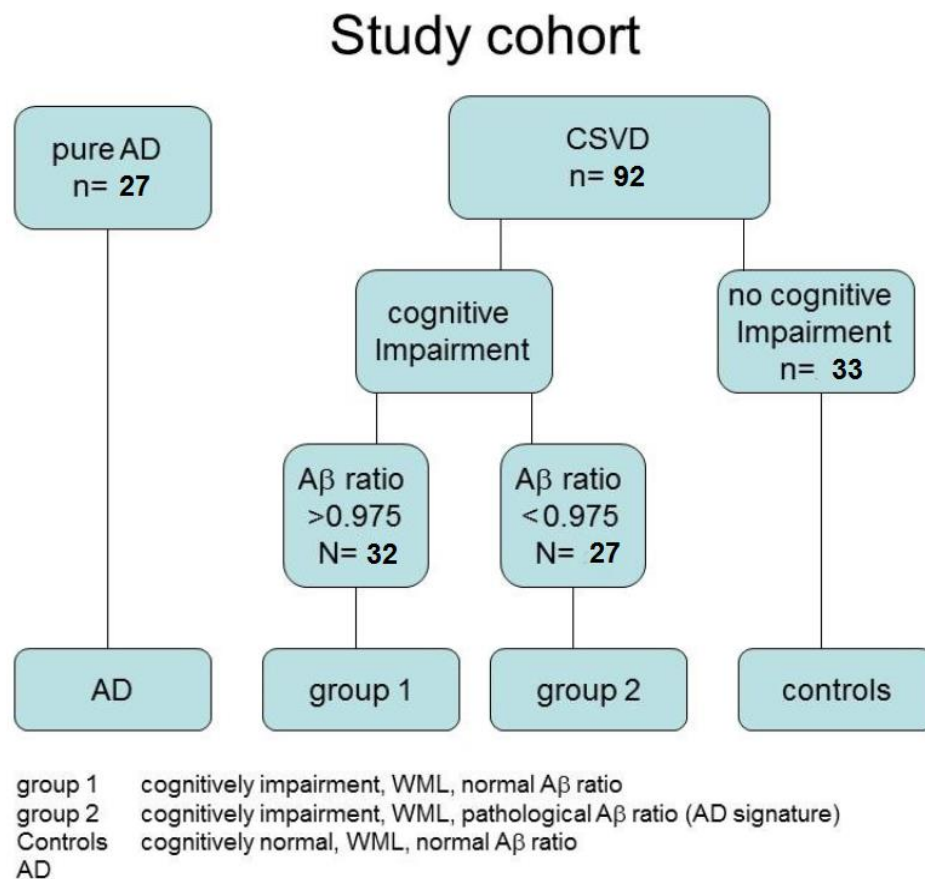


Abbildung 3: Gruppeneinteilung der Studienkohorte nach Diagnosen und CSF-Biomarkern

CSF Biomarker (Tau, p-Tau, Albumin-Ratio), Ergebnisse der MMSE sowie Punktzahlen der ARWMC-Skala sind in die Datenanalyse eingegangen. Zudem wurden die Subskalen für Gedächtnis und exekutive Funktionen der CAMCOG untersucht. Um das Verhältnis von Gedächtnisfunktionen (mem) zu exekutiven Funktionen (exec) beim jeweiligen

Probanden abzubilden, wurde ein Quotient berechnet (mem/exec). Für Vergleiche zwischen mehreren Gruppen wurden Varianzanalysen (ANOVA) bzw. Kovarianzanalysen (ANCOVA), welche Alter und Geschlecht berücksichtigten, angewandt. Post-Hoc Analysen erfolgten mittels Tukey-HSD. Zudem wurden Kruskal-Wallis Tests durchgeführt. Die Korrelationen zwischen jeweils zwei Variablen wurden mit der Spearman Rank Order Correlation berechnet. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant angesehen.

## **Ergebnisse**

Bezüglich des Alters zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen group1 und group2, die Kontrollgruppe war erwartungsgemäß jünger ( $p < 0,001$ ). Die Werte auf der ARWMC-Skala zeigten hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen group1, group2 und Kontrollen.

Für die CSF-Biomarker Tau und p-Tau zeigte sich, dass die Gruppen AD und group2 im Vergleich zur group1 und zu den Kontrollen jeweils erhöhte Werte aufwiesen ( $p < 0,001$ ). Der Albumin-Quotient hingegen war nur in group1 signifikant erhöht (im Vergleich zu: group2  $p=0,013$ , Kontrollen  $p=0,002$ , AD  $p < 0,001$ ). Zwischen group1 und 2 bestanden keine signifikanten Unterschiede bzgl. MMSE und CAMCOGexec Punktzahlen. Die CAMCOGmem Punktzahlen hingegen waren in group2 niedriger als in group1 ( $p=0,003$ ). Die CAMCOGratio war in group1 erhöht (im Vergleich zu: Kontrollen  $p=0,037$ , group2  $p=0,013$ ). Zwischen group2 und Kontrollen bestand diesbezüglich kein signifikanter Unterschied. Korrelationen wurden für die gesamte Kohorte CSVD berechnet.

Die Punktzahlen auf der ARWMC-Skala waren negativ mit Werten der MMSE ( $p=0,043$ ) und CAMCOGexec ( $p=0,083$ ) sowie positiv mit dem Albumin-Quotienten assoziiert ( $p=0,051$ ). Es zeigten sich jedoch keine oder nur grenzwertige Signifikanzen. Höhere Tau-Werte korrelierten positiv mit Alter ( $p=0,003$ ) sowie negativ mit MMSE- ( $p < 0,001$ ) und CAMCOGmem-Werten ( $p=0,004$ ). Der Albumin-Quotient korrelierte negativ mit den CAMCOGexec-Werten ( $p=0,013$ ). Darüber hinaus fanden sich keine signifikanten Korrelationen.

Alle Daten sind tabellarisch in der Publikation I und den Zusatztabelle zusammengefasst (Artikel ab Seite 37, *page 4*: table 2/figure 2; ANOVA und Kruskal-Wallis auf Seite 45; Korrelationen auf Seite 46). Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst, wobei hier Alterationen im Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen zu bestimmten Profilen interpretiert werden.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Marker-Profile aus Publikation I

|                                  | <b>Tau</b> | <b>P-Tau</b> | <b>Albumin-Quotient</b> | <b>WML (ARWMC)</b> | <b>CAMCOG mem/exec</b> |
|----------------------------------|------------|--------------|-------------------------|--------------------|------------------------|
| <b>Group1</b><br>(VD und VCI)    | ↔          | ↔            | ↑                       | ↔                  | ↑                      |
| <b>Group2</b><br>(AD+VD und MCI) | ↑          | ↑            | ↔                       | ↔                  | ↔                      |
| <b>AD</b>                        | ↑          | ↑            | ↔                       | ↓                  | keine Daten            |

### Zusammenfassung

Auf Grund der typischen Biomarker-Konstellation (A $\beta$ , Tau) war davon auszugehen, dass bei group2 pathophysiologische Vorgänge i. S. einer Alzheimer-Erkrankung vorlagen und sie somit als Gruppe mit einer Mischerkrankung bezeichnet werden konnte (nach IWG-2-Kriterien, Dubois et al. 2014). Bei group1 gingen wir von einer rein vaskulären Pathologie i.S. eines VCI bzw. einer VD aus. Mit dem CAMCOG-Quotienten konnte veranschaulicht werden, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe in group2 exekutive Funktionen und Gedächtnis gleichermaßen defizitär waren, während in group1 die exekutiven Funktionen stärker betroffen waren. Dies passte zu den bekannten Profilen der angenommenen Erkrankungen. Es zeigte sich insgesamt kein starker Zusammenhang zwischen der Kognition und dem Ausmaß der WML. In der gesamten Studienkohorte (außer AD, nicht untersucht), wie auch in den einzelnen Gruppen, bestand ein Zusammenhang zwischen erhöhtem Tau und p-Tau in Bezug auf schlechteres Abschneiden in MMSE und Gedächtnisfunktionstests sowie zwischen höheren Albumin-Quotienten und schlechterem Abschneiden bei Tests der exekutiven Funktionen.

### 3.2. Publikation II:

Schmitz M, Hermann P, Oikonomou P, Stoeck K, Ebert E, Poliakova T, Schmidt C, Llorens F, Zafar S, Zerr I (2015). Cytokine profiles and role of cellular PrP in patients with vascular dementia and vascular encephalopathy. *Neurobiol Aging* 36, 2597-2606

### Hintergrund und Ziele

Im Sinne der in Kapitel 1.7 formulierten Fragestellung sollten durch die publizierten Untersuchungen mögliche Biomarker zur differentialdiagnostischen Einordnung der verschiedenen Demenzformen (AD und VD) identifiziert werden.

Es gibt Hinweise auf den Einfluss inflammatorischer und somit Cytokin-vermittelter Mechanismen auf die Entstehung kognitiver Defizite bei neurodegenerativen Erkrankungen (Rubio-Perez und Morillas-Ruiz 2012) sowie bei VD (Wada-Isoe et al. 2004). Immunologische Marker-Profile können möglicherweise eine bessere Diskrimination zwischen VD und AD erlauben, wobei einige Marker (IL-1b, TNF- $\alpha$  und IL-6) bereits in unterschiedlichen Konzentrationen in CSF von Patienten mit AD oder VD gemessen wurden (Tarkowski et al. 2003). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Cytokine durch eine gestörte BBB in das periphere System einwandern oder dort durch andere Mechanismen induziert werden (De Simoni et al., 1995). Auch zelluläres Prionprotein PrPC spielt möglicherweise eine Rolle in der Regulation immunologischer Prozesse, da es in die Aktivierung von T-Zellen involviert ist (Hu et al. 2010). Zudem scheint es eine protektive Wirkung auf Zellen unter oxidativem Stress zu haben (Weise et al. 2006). Vor diesem Hintergrund wurden bei verschiedenen Probandengruppen Cytokin-Profile und PrPC-Konzentrationen in CSF und Serum bestimmt und anschließend mit bekannten Demenzmarkern sowie mit den Ergebnissen neuropsychologischer Testungen korreliert.

## **Methoden**

Cytokine, Chemokine und PrPC wurden in CSF und Serum bei Probanden der ab Kapitel 2 beschriebenen Studie gemessen (ausgenommen Gruppe AD). Dabei wurden Probanden ausgeschlossen, die Hinweise für andere hirnanorganische Erkrankungen (außer CSVD) zeigten, insbesondere wurden auch Probanden ausgeschlossen, die auf Grund auffälliger CSF-Biomarker (A $\beta$  42/40) Hinweise auf eine AD bzw. MD zeigten.

Die so entstandene Kohorte umfasste 87 Probanden und setzte sich aus den Gruppen VD für vaskuläre Demenz (nach NINDS-AIREN-Kriterien, n=42) und VE für vaskuläre Enzephalopathie ohne kognitive Defizite (n=41) zusammen. Zusätzlich wurden eine Vergleichsgruppe AD (n=52, aus der in Publikation I erwähnten RPAD-Studie) sowie eine Kontrollgruppe ohne nachgewiesene Pathologien des ZNS (C, n=41) erstellt. Cytokine und Chemokine wurden mittels Multiplex Assay (Bio-Plex human cytokine 17-plex Pro) in CSF- und Serum-Proben gemessen. Konzentrationen von PrPC, A $\beta$  1-40 und 1-42, Tau und p-Tau wurden mittels ELISA bestimmt. Des Weiteren wurden die Ergebnisse der MMSE sowie die Gesamtpunktzahl der CAMCOG analysiert. Es wurden Spearman Rank Order Correlation Tests (für Korrelationen), Mann-Whitney-Tests (für Vergleiche zwischen zwei Gruppen) und ANOVA-Analysen (für Vergleiche zwischen mehreren Gruppen) verwendet.

## Ergebnisse

Im Folgenden werden nur statistisch signifikante Unterschiede und Korrelationen beschrieben ( $p < 0,05$ ). Die p-Werte der Testungen können den entsprechenden Tabellen im Anhang entnommen werden.

Im Serum zeigten sich Erhöhungen von IL-1b, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 und G-CSF in den Gruppen VD und VE im Vergleich zu den Gruppen AD und C. IL-1b war zudem in der AD-Gruppe im Vgl. zu C erhöht. Die Konzentrationen von MCP-1 (erniedrigt in VD und VE vs. AD und C) und MIP-1b (erniedrigt in VD vs. AD) waren ebenfalls auffällig. MIP-1b korrelierte in der Gruppe VD negativ mit den Ergebnissen der MMSE. Die Daten sind in der Publikation II zusammengefasst Die CSF zeigte erhöhte Konzentrationen von IL-6 bei den Gruppen VD und AD im Vergleich zu VE und C. GM-CSF war in den Gruppen VD und VE im Vergleich zur Gruppe AD erniedrigt (Artikel ab Seite 47, *page 2600*: figure 1 A-I; Seiten 58-59: supplementary figure 1).

In der VD-Gruppe korrelierte MIP-1b mit MMSE und CAMCOG, IL-8 korrelierte negativ mit der CAMCOG. Die A $\beta$  1-40-Konzentrationen in der Gruppe VD korrelierten positiv mit IL-8 und negativ mit GM-CSF. Die A $\beta$ -Ratio korrelierte negativ mit IL-8 und TNF- $\alpha$ . MCP-1 korrelierte positiv mit dem Ausmaß der WML (Artikel ab Seite 47, *page 2601*: figure 2, A1-D; Seiten 58-59: supplementary figure 1). Die Tabelle 11 bietet einen Überblick über die verschiedenen Gruppen und führt alle signifikanten Alterationen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

Tabelle 11: Im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant abweichende Cytokine und Chemokine

|              | IL-1b | IL-4 | IL-5 | IL-6 | TNF- $\alpha$ | IFN- $\gamma$ | G-CSF | GM-CSF      | MCP-1 | MIP-1b  |
|--------------|-------|------|------|------|---------------|---------------|-------|-------------|-------|---------|
| <i>Serum</i> |       |      |      |      |               |               |       |             |       |         |
| <b>VE</b>    | ↑     | ↑    | ↑    | ↔    | ↑             | ↑             | ↑     | ↔           | ↓     | ↔       |
| <b>VD</b>    | ↑     | ↑    | ↑    | ↔    | ↑             | ↑             | ↑     | ↔           | ↓     | VD < AD |
| <b>AD</b>    | ↑     | ↔    | ↔    | ↔    | ↔             | ↔             | ↔     | ↔           | ↔     | AD      |
| <i>CSF</i>   |       |      |      |      |               |               |       |             |       |         |
| <b>VE</b>    | ↔     | ↔    | ↔    | ↔    | ↔             | ↔             | ↔     |             | ↔     | ↔       |
| <b>VD</b>    | ↔     | ↔    | ↔    | ↑    | ↔             | ↔             | ↔     | VD, VE < AD | ↔     | ↔       |
| <b>AD</b>    | ↔     | ↔    | ↔    | ↑    | ↔             | ↔             | ↔     |             | ↔     | ↔       |

Während PrPC im Serum der Gruppen VD und VE erniedrigt war, zeigte sich im CSF dieser Gruppen eine Erhöhung im Vergleich mit den Gruppen AD und C (Artikel ab Seite 47, *page 2602*: figure 3 A1-2).

PrPC korrelierte im Serum der Gruppe VD negativ mit den Konzentrationen von IL-1b, IL-6, MCP-1 und TNF- $\alpha$ . In der CSF bestand in dieser Gruppe eine negative Korrelation zwischen PrPC und IL-2 sowie MCP-1, während in der Gruppe VE eine positive Korrelation zwischen PrPC und IL-8 bestand. Tau- und pTau-Konzentrationen in der CSF waren in der Gruppe AD im Vergleich zu den anderen Gruppen erhöht. A $\beta$  1-42 war in der Gruppe AD vermindert, während A $\beta$  1-40 keine Unterschiede in den Gruppen aufwies (Anhang Seite 59: Abbildung 4). In der CSF der Gruppen VD und VE bestanden positive Korrelationen zwischen PrPC und A $\beta$  1-40, Tau sowie pTau (siehe Artikel, Anhang Seite 54: *page 2603*, figure 4 A-B). Die Tabelle 12 bietet einen Überblick über die CSF-Biomarker und PrPC in den verschiedenen Gruppen und führt alle signifikanten Alterationen auf.

Tabelle 12: CSF-Marker und PrPC im Vergleich zur Kontrollgruppe

|           | Tau | pTau | A $\beta$ 1-42 | A $\beta$ 1-40 | PrPC (Serum) | PrPC (CSF) |
|-----------|-----|------|----------------|----------------|--------------|------------|
| <b>VE</b> | ↔   | ↔    | ↔              | ↔              | ↓            | ↑          |
| <b>VD</b> | ↔   | ↔    | ↔              | ↔              | ↓            | ↑          |
| <b>AD</b> | ↑   | ↑    | ↓              | ↔              | ↔            | ↔          |

### Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Publikation ließen sich in Serum und CSF Muster mit signifikanten Alterationen mehrerer pro- und anti-inflammatorischer Cytokine in Gruppen VD und VE aufzeigen. Innerhalb der Kohorte mit CSVD (VD + VE) waren die Immunmarker-Profile eher vom Ausmaß der WML als von kognitiven Defiziten abhängig. IL-6 hingegen war in CSF von AD- und VD-Probanden erhöht, sodass hier im Einklang mit bekannten Studien eine Rolle bei der Entwicklung kognitiver Defizite vermutet werden kann (Stoeck et al. 2014). Ebenso zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung kognitiver Defizite und Erhöhungen von MIP-1b in CSF und Serum. PrPC war in den Gruppen mit vaskulären Erkrankungen (VD und VE) im Serum verringert, in CSF erhöht. Es ließ sich auf Grund der Korrelationen mit mehreren Immunmarkern zeigen, dass PrPC gerade bei Probanden mit VD stärker mit einer Immunantwort assoziiert ist.

### 3.3. Publikation III:

Llorens F, Schmitz M, Knipper T, Schmidt C, Lange P, Fischer A, Hermann P, Zerr I (2017). Cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease show different but partially overlapping profile compared to Vascular dementia. *Front Aging Neurosci* 9, 289

#### Hintergrund und Ziele

Im Sinne der in Kapitel 1.7 formulierten Fragestellung und mit Bezug auf die Publikation I sollten sich die Untersuchungen auf die Diskrimination der Krankheitsentitäten AD und VD mittels CSF-Biomarkern fokussieren.

Es liegen in der Literatur bereits Daten für die Diskrimination zwischen VD und AD mittels CSF Biomarkern vor (Lewczuk et al. 2004, Skillbäck et al. 2015) vor, sodass diese Marker in die neueren diagnostischen Kriterien für AD integriert wurden (McKhann et al. 2011, Dubois et al. 2014). Auch vorige Publikationen der Demenzforschungsgruppe der Abteilung Neurologie zu CSF-Biomarkern bei verschiedenen Demenzformen erscheinen vielversprechend (Publikation I sowie Kaerst et al. 2013). Spezifische Marker für VD fehlen jedoch, sodass die Differentialdiagnostik weiterhin im Wesentlichen eine Ausschlussdiagnostik ist, welche durch das häufige gemeinsame Vorkommen vaskulärer und primär neurodegenerativer Pathologien erschwert wird. Ziel der Untersuchungen war es, diagnostische Genauigkeiten einzelner bekannter CSF-Marker und ihrer Kombinationen in der Unterscheidung zwischen AD und VD (bei CSVD) sowie Patienten mit CSVD ohne kognitive Defizite zu evaluieren. Zudem wurde auch eine wichtige Sonderform der AD evaluiert, die *rapidly progressive AD* (rpAD). Sie zeichnet sich durch bestimmte klinische (frühe fokal-neurologische Zeichen, rascher kognitiver Abbau) und liquorchemische (14-3-3 häufig positiv) Aspekte aus (Schmidt et al. 2011).

#### Methoden

Die Untersuchungen wurden an CSF zweier unabhängig voneinander rekrutierten Kohorten durchgeführt. Die Studienkohorte (Cohort 1) setzte sich aus Patienten des klinischen Demenzentrums der Universität Göttingen zusammen. VaD\* (n=31) wurde nach NINDS-AIREN (Roman et al. 1993) und AD (n=65) nach Dubois et al. (2007) diagnostiziert.

\*Anmerkung: Statt der gängigen Abkürzung VD für vaskuläre Demenz wurde in Publ. III die ebenfalls häufig in der Literatur verwendete Abkürzung VaD benutzt. Beide Abkürzungen bezeichnen denselben Begriff.

Die Kontrollgruppe (n=50) bestand aus Patienten mit diversen anderen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen. Die Gruppen VaD (nach NINDS-AIREN, n=21) und VE (entsprechend der Gruppe CSVD no cognitive impairment in Publikation I, n=25) der Validierungskohorte (Cohort 2) bestanden aus Probanden der ab Kapitel 2 beschriebenen Studie. Die Gruppen AD (n=26) und rpAD (n=15, Definition nach Schmidt et al. 2011) stammten aus der bereits erwähnten RPAD-Studie. Die meisten CSF-Marker A $\beta$  1-42, Tau, pTau, NSE, 14-3-3, S-100b und YKL-40 wurden mittels ELISA quantitativ bestimmt. Lediglich für die Bestimmung der Proteine 14-3-3 wurde ein Western Blot genutzt. Für Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden der Mann-Whitney-U-Test, für multiple Vergleiche der Kruskal-Wallis-Test und Dunn's multiple comparison verwendet. Area Under the Curve (AUC) und 95% Konfidenzintervalle der Receiver Operating Characteristic (ROC) wurden berechnet. Zur Bestimmung der besten Cut-offs wurde der Youden-Index verwendet.

### Ergebnisse

In der Studienkohorte zeigte die AD-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhtes Tau, p-Tau, S100b und YKL-40 sowie vermindertes A $\beta$  1-42 in der CSF. Die VaD Gruppe zeigte erhöhtes Tau und vermindertes A $\beta$  1-42. Die AD-Gruppe unterschied sich von der VD-Gruppe durch erhöhtes Tau, p-Tau und vermindertes A $\beta$  1-42. Die Proteine 14-3-3 waren bei AD- und VaD-Patienten gleichermaßen häufiger als bei den Kontrollen nachzuweisen (Artikel ab Seite 60, *page 4*: figure 1 A-G). Eine Zusammenfassung signifikanter Alterationen bietet die Tabelle 13. In der Validierungskohorte konnten die gleichen Profile in Bezug auf Tau, p-Tau und A $\beta$  1-42 dargestellt werden. Zusätzlich zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der genannten Biomarker zwischen den Gruppen AD und rpAD sowie zwischen VaD und VE (Artikel ab Seite 60, *page 5*, figure 2 A-C).

Tabelle 13: Signifikante Biomarker-Alterationen (Studienkohorte)

|                   |          | <b>Tau</b> | <b>p-Tau</b> | <b>A<math>\beta</math> 1-42</b> | <b>YKL-40</b> | <b>S100b</b> | <b>NSE</b> | <b>14-3-3</b> |
|-------------------|----------|------------|--------------|---------------------------------|---------------|--------------|------------|---------------|
| <b>AD</b>         | vs.      | ↑          | ↑            | ↓                               | ↑             | ↑            | ↔          | ↑             |
| <b>VaD</b>        | controls | ↑          | ↔            | ↓                               | ↔             | ↔            | ↔          | ↑             |
| <b>AD vs. VaD</b> |          | ↑          | ↑            | ↓                               | ↔             | ↔            | ↔          | ↔             |



Die in den jeweiligen AD- und VaD-Gruppen unterschiedlich regulierten Marker Tau, p-Tau und A $\beta$  1-42 wurden auf ihre diagnostische Genauigkeit in Bezug auf die Differenzierung zwischen den beiden Entitäten geprüft. Dabei waren Spezifitäten und Sensitivitäten relativ gering, wenn nur einzelne Biomarker verwendet wurden. Die Biomarker-Kombinationen A $\beta$ -42/tau, A $\beta$ -42/p-tau und tau x p-tau/A $\beta$ -42 zeigten in beiden Kohorten gleichermaßen höhere Genauigkeiten, wobei der A $\beta$  1-42/pTau –Quotient am besten abschnitt. In der Studienkohorte lagen AUC bei 0,84 (95%-Konfidenzintervall: 0,75-0,93), Sensitivität bei 81% und Spezifität bei 80%. Unabhängig davon wurden in der Validierungskohorte AUC mit 0,90 (95%-Konfidenzintervall: 0,80-0,98), Sensitivität mit 77% und Spezifität mit 93% berechnet. (Artikel ab Seite 60, *page 6*, Table 2). Zusätzlich wurden die in Cohort 1 evaluierten Cut-offs i. S. einer Validierung auf Cohort 2 angewandt, was zu ähnlichen diagnostischen Genauigkeiten führte.

### **Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere bekannte CSF-Biomarker (Tau, p-Tau, A $\beta$ -42) und ihre unterschiedlichen Profile bei Patienten mit AD und VaD untersucht, die Ergebnisse wurden anhand einer zweiten, unabhängigen Kohorte validiert. Hierbei wurden auch die Subgruppen rpAD sowie Patienten mit CSVD ohne kognitive Einschränkungen (VE) berücksichtigt. Die AD- und VaD-Gruppen zeigten dabei charakteristische Profile, wobei sich die Subgruppen rpAD und AD sowie VE und VaD jeweils nicht signifikant voneinander unterschieden. Die bisher weniger untersuchten Marker S100b und YKL-40 waren nur bei der AD im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Die NSE zeigte keine signifikanten Alterationen. Die Proteine 14-3-3 waren hingegen bei AD und VaD im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Ein einzelner Marker mit hoher Spezifität für VaD war nicht zu identifizieren, auch eine Diskrimination zwischen AD und VaD anhand einzelner Marker war nicht zufriedenstellend. Es konnte jedoch eine hohe diagnostische Genauigkeit mittels Berechnung des A $\beta$  1-42/pTau–Quotienten erreicht werden.

## 4. Diskussion

Wie bereits in der Einleitung und in den Beschreibungen der Publikationen dargelegt, ist die Datenlage zur Differentialdiagnostik der VD trotz einer großen Anzahl vorhandener Studien weiterhin nicht zufriedenstellend. Dies hat vielfältige Gründe:

- Es liegen trotz einzelner Vorschläge keine einheitlichen neuropathologischen Kriterien als „Goldstandard“ in der Diagnostik der VD vor (Jellinger 2013)
- Auch die klinischen Kriterien der VD (Roman et al. 1993) erlauben weiterhin Überschneidungen mit AD und MD (Pohjasvaara et al. 2000)
- Die Entitäten der VD werden nach verschiedenen Kriterien unterschieden und in weitere Unterformen differenziert, teilweise ergeben sich dabei Überschneidungen (siehe Kapitel 1.3), zusätzlich gibt es „Frühformen“, die dann als VCI bezeichnet oder unter MCI subsummiert werden
- Es liegen nur wenige Biomarker-Studien (insbesondere CSF) vor

Die im Rahmen der Dissertation aufgeführten Publikationen beschäftigen sich mit Biomarkern in der Differentialdiagnostik der VD in Abgrenzung zur AD bzw. MD. Auch diese Arbeiten waren teilweise darauf angewiesen, die bestehenden klinischen diagnostischen Kriterien zu nutzen und beinhalten nur relativ geringe Fallzahlen. Es wurden jedoch einige weiterführende Ansätze verfolgt.

### 4.1 Publikation I

Die Publikation I konnte bzgl. der oben beschriebenen Problematik relevante Daten erzeugen, da sich die Gruppen nicht nur über die etablierten klinischen Kriterien voneinander abgrenzten. Es wurden komplexe Profile mit verschiedenen CSF-Markern, kognitiven Domänen und einer semiquantitativen Evaluierung der WML evaluiert. Es finden sich in der Literatur keine Studien, die diesen integrativen Ansatz verfolgen.

Wie jedoch in den meisten Studien mit Berücksichtigung von CSF-Biomarkern waren die Fallzahlen relativ gering. Es wurden keine Spezifitäten und Sensitivitäten berechnet, da dies vor dem Hintergrund der Fallzahlen und der komplexen Marker-Profile wenig sinnvoll erschien. Zudem setzten sich zwei der Gruppen aus jeweils uneinheitlichen Krankheitsentitäten zusammen (group1: VD und VCI, group2: MD und MCI+CSVD). Eine weitere Limitation bestand darin, dass sich die Kontrollgruppe aus Patienten mit CSVD zusammensetzte und keine Kontrolle gegen gesunde Probanden erfolgte. Andererseits lag hier auch eine Stärke der Untersuchung. Durch die Kontrolle gegen eine

Gruppe von Patienten mit einem dementiellen Syndrom mutmaßlich anderer als vaskulärer Genese (AD) und gegen eine Gruppe mit zerebrovaskulärer Erkrankung (CSVD) ohne kognitive Defizite konnte so schon methodisch eine relativ hohe Spezifität möglicherweise auffälliger Biomarker für das dementielle Syndrom bei vaskulärer Enzephalopathie gewährleistet werden. In diesem Zusammenhang wäre natürlich eine Kontrolle gegen weitere dementielle Erkrankungen erstrebenswert, zumal insbesondere für andere subkortikale Demenzen wie die DLB und die Demenz bei Parkinson-Syndrom ähnliche Biomarker-Profile beschrieben wurden (Jesse et al. 2015 und Llorens et al. 2015).

Der erhöhte Albumin-Quotient war der einzige Marker, der in der Differenzierung der rein vaskulär bedingten kognitiven Einschränkung in Abgrenzung zur AD und MD möglicherweise spezifisch schien. In der Literatur wird ein solcher Zusammenhang angenommen, da die Funktion der BBB (näherungsweise abgebildet durch den Albumin-Quotienten) in der Pathophysiologie der VD eine wichtige Rolle spielt (Ma und Olsson 1997). Die vorhandenen Daten waren jedoch bisher widersprüchlich bezüglich der Abgrenzung zur AD (Farrall und Wardlaw 2009). Im Gegensatz zu den meisten anderen Studien, die sich mit VD- und AD- Patienten beschäftigen, ist in der Publikation I jedoch davon auszugehen, dass es sich bei group1 auf Grund ihrer Merkmale (keine AD-typischen CSF Marker, Betonung der exekutiven kognitiven Defizite in Relation zu mnestischen Defiziten) um eine sehr gut charakterisierte Kohorte mit VD/VCI handelte. Group2 (MD/MCI) hingegen zeigte im Vergleich zur AD-Gruppe keinen erhöhten Albumin-Quotienten. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass in dieser Gruppe die pathophysiologischen Veränderungen der AD die Erkrankung prägten und sie somit eher als Gruppe mit mehrheitlich AD + CSVD zu bezeichnen wäre. Eine weitere Subgruppen-Charakterisierung (AD + ko-inzidentelle CSVD vs. MD) wurde jedoch auf Grund der geringen Probandenzahl nicht durchgeführt. Bei fehlenden neuropathologischen Befunden und Kriterien war hier auch keine Validierung möglich. Es konnten jedoch auf Grund der schlüssigen Ergebnisse neue Ansätze zur Diskrimination der verschiedenen Krankheitsentitäten untermauert werden.

Zudem konnten insgesamt Zusammenhänge zwischen erhöhten Tau bzw. p-Tau Konzentrationen und Gedächtnisdefiziten sowie zwischen erhöhten Albumin-Quotienten und Defiziten der exekutiven Funktionen dargestellt werden. Letztere gelten als Domäne der subkortikalen zerebralen Funktionen. Dies befindet sich im Einklang mit anderen Arbeiten, die eine Erhöhung des Albumin-Quotienten bei primär subkortikalen Erkrankungen wie Parkinson-Demenz (Jesse et al. 2015) und DLB (Llorens et al 2015) beschreiben.

## 4.2 Publikation II

Grundlage für die Untersuchungen der Publikation II war die Annahme, dass die Aktivierung des Immunsystems einen Einfluss auf die Entstehung gefäß- und neurodegenerativer Prozesse bei CSVD hat oder aber daraus resultiert. Bis dato lagen kaum Daten zur Rolle von Cytokinen und PrPC bei Menschen mit CSVD und VD vor. Auf Grund unserer Daten ist vom Vorliegen charakteristischer Immunmarker-Profile auszugehen, wie es bereits in früheren Studien für einzelne Marker beschrieben wurde (Wada-Isoe et al. 2004). Für einen unmittelbaren Zusammenhang von Inflammation und kognitiver Störung, wie in anderen Studien vermutet (Cunningham et al. 2009), ließen sich hingegen nur schwache Hinweise aufzeigen. Eine Aktivierung des Immunsystems scheint jedoch eine Rolle bei der Entstehung zerebrovaskulärer Läsionen zu spielen. Es sind auch an dieser Stelle weitere Daten notwendig, insbesondere um die bisher nicht verstandenen molekularen Mechanismen zu identifizieren. Die Untersuchungen der Publikation II ließen hier kaum Rückschlüsse zu. Die untersuchten Cytokine und PrPC sind jedoch potentiell dazu geeignet, als Biomarker in der Diskrimination der dementiellen Syndrome zu fungieren, da sich die Profile bei CSVD und VD deutlich von denen bei AD unterscheiden. Der Ausschluss von Probanden, bei denen klinisch oder neurochemisch der Verdacht auf eine MD bestand, diente dazu, die Krankheitsentitäten VD und AD sauber voneinander zu trennen. Diese Maßnahme führte jedoch auch dazu, dass bei der Gruppe AD kaum vaskuläre Pathologien vorlagen und ein Confounder eliminiert wurde, der im klinischen Alltag häufig vorliegt. In diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung einer weiteren Probandengruppe mit MD interessant, welche auf Grund mangelnder Probenanzahl nicht sinnvoll durchgeführt werden konnte.

## 4.3 Publikation III

Die Publikation III fokussierte sich auf die Untersuchung der klassischen AD-CSF-Biomarker sowie einiger anderer CSF-Proteine mit Potential als Biomarker. Es sollte vor allem die diagnostische Genauigkeit von Kombinationen der verschiedenen Marker untersucht werden. Die Ergebnisse zu den Markern Tau, pTau und A $\beta$  1-42 zeigten hohe Übereinstimmungen mit den wenigen bereits in der Literatur vorliegenden Daten und konnten aufzeigen, dass eine Diskrimination zwischen AD und VD trotz fehlender VD-spezifischer Marker möglich ist. Das bei AD im Vergleich zu VD erhöhte Tau-Protein ist vor allem als neuronaler Schadensmarker bekannt. Interessanterweise zeigten andere neuronale Schadensmarker wie NSE und 14-3-3 keine signifikant unterschiedlichen Konzentrationen bei AD und VD. Dies unterstützte die in der Literatur bereits

beschriebene Annahme, dass im Rahmen der spezifischen Pathophysiologie der AD eine Sekretion von Tau-Protein in die CSF erfolgt (Bright et al. 2015). Ein weiteres wichtiges Resultat bestand in der Beobachtung, dass sich die Gruppe VD in Bezug auf A $\beta$  1-42 und Tau-Protein von der Kontrollgruppe unterschied (Cohort 1) während sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen VD und VE zeigten (Cohort 2). Diese Marker unterscheiden somit im Rahmen einer zerebrovaskulären Pathologie nicht zwischen kognitiv gesunden und dementen Patienten.

#### **4.4 Zusammenfassung**

Zusammenfassend gesehen, konnten die Publikationen relevante Beiträge auf dem Gebiet der CSF-Biomarker in der Differentialdiagnostik der Demenzerkrankungen leisten. Die suffiziente klinische Differenzierung der Krankheitsidentitäten AD, VD und MD ist aktuell auf Grund der limitierten therapeutischen Optionen mehr wissenschaftlich als klinisch relevant. Sie ist jedoch unabdingbar, um das bisher unvollständige Verständnis der Pathomechanismen und ihrer histologischen Korrelate der VD und der AD zu verbessern.

Die Ergebnisse zu den Markern Tau, pTau, A $\beta$  1-42 und A $\beta$  1-40 zeigten hohe Übereinstimmungen mit den wenigen bereits in der Literatur vorliegenden Daten (Paraskevas et al. 2009, Skillbäck et al. 2015, Wallin et al. 2016) und konnten zeigen, dass eine Diskrimination trotz fehlender VD-spezifischer Marker möglich ist. Darüber hinaus können bestimmte Zytokine und der Albumin-Quotient möglicherweise vaskuläre Prozesse von den neurodegenerativen Prozessen abgrenzen. Die Ergebnisse bzgl. des Albumin-Quotienten wurden mittlerweile durch eine Arbeit, in der die Publikation I zitiert wurde, an Hand einer größeren Patientenkohorte bestätigt (Skillbäck et al. 2017). Die Ergebnisse der Publikation I legen die Vermutung nahe, dass die im cMRT darstellbaren WML für die Entwicklung einer VD bzw. als differentialdiagnostische Marker lediglich eine untergeordnete Rolle spielen. Es bestehen jedoch weiterhin diverse Limitationen, welche bereits eingangs der Diskussion aufgeführt worden und die Generierung belastbarer Daten erschweren. Letztlich sind mehr longitudinale Studien notwendig, die die Evaluation von Biomarkern und histopathologischen Daten beinhalten.

Die Studie „Untersuchungen zur prognostischen Aussagekraft von liquorchemischen Markern in der Diagnostik und Differentialdiagnostik der CJK und vaskulärer Demenzen“ stellte klinische Daten und Biomaterial für die Publikationen zur Verfügung. Neben den CSF- und Serum-Biomarkern bieten auch Bildgebung, ausführliche neuropsychologische Daten, dokumentierte Risikofaktoren und Komorbiditäten weitere Möglichkeiten für zukünftige Untersuchungen in der erfassten Kohorte von Probanden mit CSVD.

## 5. Literaturverzeichnis

- Bartl M: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung bei älteren Patienten. Med. Diss. Göttingen 2005
- Braak H, Braak E (1991): Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82(4), 239-59
- Bright J, Hussain S, Dang V, Wright S, Cooper B (2015): Human secreted tau increases amyloid-beta production. *Neurobiol Aging* 36(2), 693-709
- Brunnström H, Gustafson L, Passant U, Englund E (2009): Prevalence of dementia subtypes: a 30-year retrospective survey of neuropathological reports. *Arch Gerontol Geriatr* 49(1), 146-9
- Cavalieri M, Enzinger C, Petrovic K, Pluta-Fuerst A, Homayoon N, Schmidt H, Fazekas F, Schmidt R. (2010): Vascular dementia and Alzheimer's disease - are we in a dead-end road? *Neurodegener Dis* 7(1-3), 122-6
- Cunningham C, Champion S, Lunnon K, Murray CL, Woods JF, Deacon RM, Rawlins JN, Perry VH (2009): Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease. *Biol Psychiatry* 65, 304-312
- De la Torre JC (2002): Alzheimer disease as a vascular disorder: nosological evidence. *Stroke* 33(4), 1152-62
- De Pedro-Cuesta J, Virués-Ortega J, Vega S, Seijo-Martínez M, Saz P, Rodríguez F, Rodríguez-Laso A, Reñé R, de las Heras SP, Mateos R (2009): Prevalence of dementia and major dementia subtypes in Spanish populations: a reanalysis of dementia prevalence surveys, 1990-2008. *BMC Neurol* 9, 55
- De Simoni MG, Del Bo R, De Luigi A, Simard S, Forloni G (1995): Central endotoxin induces different patterns of interleukin (IL)- 1 beta and IL-6 messenger ribonucleic acid expression and IL-6 secretion in the brain and periphery. *Endocrinology* 136, 897-902
- DGN, DGPPN (2016): S3-Leitlinie Demenzen. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Hrsg.: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) und Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN). Online: [www.dgn.org/leitlinien](http://www.dgn.org/leitlinien) (abgerufen am 03.12.2016)
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, DeKosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G (2007): Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 6, 734-746
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Hampel H, Molinuevo JL, Blennow K, DeKosky ST, Gauthier S, Selkoe D, Bateman (2014): Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol* 13, 614-629

- Fahn S, Elton R, Memembers of the UPDRS Development Commmittee: Unified Parkinson's Disease Rating Scale. In Fahn S, Marsden CD, Calne DB, Goldstein M (Hrsg): *Recent Developments in Parkinson's Disease*, Vol 2. Macmillan Health Care Information, Florham Park 1987, 153-163.
- Farrall AJ, Wardlaw JM (2009): Blood-brain barrier: ageing and microvascular disease--systematic review and meta-analysis. *Neurobiol Aging* 30(3), 337-52
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975): "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12(3), 189-98
- Hachinski VC, Iliff LD, Zilhka E, Du Boulay GH, McAllister VL, Marshall J, Russell RW, Symon L (1975): Cerebral blood flow in dementia. *Arch Neurol* 32(9), 632-7
- Hachinski V, Iadecola C, Petersen RC, Breteler MM, Nyenhuis DL, Black SE, Powers WJ, DeCarli C, Merino JG, Kalaria RN (2006): National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Canadian Stroke Network vascular cognitive impairment harmonization standards. *Stroke* 37(9), 2220-41
- Hamilton M (1960): A rating scale for depression. *J NeurolNeurosurg Psychiatry* 23, 56-62
- Hu W, Nessler S, Hemmer B, Eagar TN, Kane LP, Leliveld SR, Müller-Schiffmann A, Gocke AR, Lovett-Racke A, Ben LH (2010): Pharmacological prion protein silencing accelerates central nervous system autoimmune disease via T cell receptor signalling. *Brain* 133, 375-388
- Jellinger KA, Attems J (2007): Neuropathological evaluation of mixed dementia. *J Neurol Sci.* 257, 80-87
- Jellinger KA (2013): Pathology and pathogenesis of vascular cognitive impairment-a critical update. *Front Aging Neurosci* 5, 17
- Jesse S, Brettschneider J, Sussmuth SD, Landwehrmeyer BG, von Arnim CA, Ludolph AC, Tumani H, Otto M (2015): Summary of cerebrospinal fluid routine parameters in neurodegenerative diseases. *J Neurol* 258, 1034–1041
- Kaerst L, Kuhlmann A, Wedekind D, Stoeck K, Lange P, Zerr I (2013): Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease, vascular dementia and ischemic stroke patients: a critical analysis. *J Neurol* 260, 2722-2727
- Kalbe E, Kessler J, Calabrese P, Smith R, Passmore AP, Brand M, Bullock R (2004): DemTect: a new, sensitive cognitive screening test to support the diagnosis of mild cognitive impairment and early dementia. *Int J Geriatr Psychiatry* 19(2), 136-43
- Kaplan EF, Goodglass H, & Weintraub S: *The Boston naming test*. 2. Auflage; Lea & Febiger. Philadelphia 1983.
- Kavirajan H, Schneider LS (2007): Efficacy and adverse effects of cholinesterase inhibitors and memantine in vascular dementia: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet Neurol* 6, 782-792

- Kertesz A, Davidson W, Fox H (1997): Frontalbehavioral inventory: diagnostic criteria for frontal lobe dementia. *Can J Neurol Sci* 24(1), 29-36
- Klockgether T, Schroth G, Diener HC, Dichgans J (1990): Idiopathic cerebellar ataxia of late onset: natural history and MRI morphology. *J Neurolo Neurosurg Psychiatr* 53, 297-305
- Lewczuk P, Esselmann H, Otto M, Maler JM, Henkel MK, Eikenberg O, Antz C, Krause WR, Reulbach U, Kornhuber J (2004): 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
- Llorens F, Schmitz M, Gloeckner SF, Kaerst L, Hermann P, Schmidt C, Vargas D, Zerr I (2015): Increased albumin CSF/serum ratio in dementia with Lewy bodies *J Neurol Sci*. 358(1-2), 398-403
- Ma KC, Olsson Y (1997): The role of chronic brain oedema in the formation of lacunes in Binswanger's encephalopathy. *Cerebrovasc Dis* 7, 324-31
- Mahoney FI, Barthel DW (1965): Functional Evaluation: The Barthel Index. *Md State Med J* 14, 61-5
- Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, Andreasen N, Parnetti L, Jonsson M, Herukka SK, van der Flier WM, Blankenstein MA, Ewers M (2009): CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* 302, 385-393.
- McKeith IG, Dickson DW, Lowe J, Emre M, O'Brien JT, Feldman H, Cummings J, Duda JE, Lippa C, Perry EK (2005): Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology* 65(12), 1863-72
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R (2011): The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 263-269.
- Mitchell AJ, Shiri-Feshki M (2009): Rate of progression of mild cognitive impairment to dementia-meta-analysis of 41 robust inception cohort studies. *Acta Psychiatr Scand* 119, 252-265
- Nearly D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S, Freedman M, Kertesz A, Robert PH, Albert M (1998): Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 51(6), 1546-54
- Neuropathology Group. Medical Research Council Cognitive Function and Aging Study (MRC CFAS) (2001): Pathological correlates of late-onset dementia in a multicentre, community-based population in England and Wales. *Lancet* 357(9251), 169-75
- Nitkunan A, Barrick TR, Charlton RA, Clark CA, Markus HS (2008): Multimodal MRI in cerebral small vessel disease: its relationship with cognition and sensitivity to change over time. *Stroke* 39(7), 1999-2005



- O'Brian JT, Thomas A (2015): Vascular Dementia. *Lancet* 386(10004), 1698-706
- O'Brien J, Desmond P, Ames D, Schweitzer I, Harrigan S, Tress B (1996): A magnetic resonance imaging study of white matter lesions in depression and Alzheimer's disease. *Br J Psychiatry* 168, 477-485
- Olsen CG, Clasen ME (1998): Senile dementia of the Binswanger's type. *Am Fam Physician* 58(9), 2068-74
- Oswald WD (1979): Psychometric procedures and questionnaires in geronto-psychological research. *Z Gerontol* 12(4), 341-50
- Pantoni L (2002): Pathophysiology of age-related white matter changes. *Cerebrovasc Dis.* 13 (suppl 2), 7-10
- Paraskevas GP, Kapaki E, Papageorgiou SG, Kalfakis N, Andreadou (2009): CSF biomarker profile and diagnostic value in vascular dementia. *Eur J Neurol* 16, 205-211.
- Petersen RC, Doody R, Kurz A, Mohs RC, Morris JC, Rabins PV, Ritchie K, Rossor M, Thal L, Winblad B (2001): Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 58, 1985-92
- Podsiadlo D, Richardson S (1991): The timed "Up & Go": a test of basic functional mobility for frail elderly persons. *J Am Geriatr Soc* 39(2), 142-8
- Pohjasvaara T, Mantyla R, Ylikoski R, Kaste M, Erkinjuntti T (2000) Comparison of different clinical criteria (DSM-III, ADDTC, ICD-10, NINDS-AIREN, DSM-IV) for the diagnosis of vascular dementia. National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences. *Stroke* 31(12), 2952-7
- Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP (2013): The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement* 9(1), 63-75
- Román GC, Royall DR (2004): A diagnostic dilemma: is "Alzheimer's dementia" Alzheimer's disease, vascular dementia, or both? *Lancet Neurol* 3(3), 141
- Román GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, Cummings JL, Masdeu JC, Garcia JH, Amaducci L, Orgogozo JM, Brun A, Hofman A (1993): Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology* 43, 250-260
- Rosen WG, Terry RD, Fuld PA, Katzman R, Peck A (1980): Pathological verification of ischemic score in differentiation of dementias. *Ann Neurol* 7(5), 486-8
- Roth M, Tym E, Mountjoy CQ, Huppert FA, Hendrie H, Verma S, Goddard R (1986): CAMDEX. A standardised instrument for the diagnosis of mental disorder in the elderly with special reference to the early detection of dementia. *Br J Psychiatry* 149, 698-709

- Royall DR, Cordes JA, Polk M (1998): CLOX: an executive clock drawing task. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64(5), 588-94
- Rubio-Perez, JM, Morillas-Ruiz JM (2012): A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *Scientific World Journal* 2012, 756357
- Scheltens P, Barkhof F, Leys D, Pruvo JP, Nauta JJ, Vermersch P, Steinling M, Valk J (1993): A semiquantitative rating scale for the assessment of signal hyperintensities on magnetic resonance imaging. *J Neurol Sci* 114(1), 7-12
- Schmidt C, Wolff M, Weitz M, Bartlau T, Korth C, Zerr I (2011): Rapidly progressive Alzheimer disease. *Arch Neurol* 68, 1124-1130.
- Schmidt R, Berghold A, Jokinen H, Gouw AA, van der Flier WM, Barkhof F, Scheltens P, Petrovic K, Madureira S, Verdelho A; LADIS Study Group (2012): White matter lesion progression in LADIS: frequency, clinical effects, and sample size calculations. *Stroke* 43(10), 2643-7
- Schmidtke K, Hüll M (2002): Neuropsychological differentiation of small vessel disease, Alzheimer's disease and mixed dementia. *J Neurol Sci* 203–204, 17–22
- Schneider JA, Arvanitakis Z, Bang W, Bennett DA (2007): Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons *Neurology*. 69(24), 2197-204
- Seno H, Ishino H, Inagaki T, Iijima M, Kaku K, Inata T, Hirai M (1999): A neuropathological study of dementia in nursing homes in Shimane prefecture, Japan: evaluation of the age and gender effect. *J Gerontol A BiolSci Med Sci* 54(6), M312-4
- Shulman KI, Pushkar D, Cohen CA, Zuccherro CA (1993): Clock-drawing and dementia in the community: a longitudinal study. *International Journal of Geriatric Psychiatry* 8(6), 487–496
- Sieben A, Van Langenhove T, Engelborghs S, Martin JJ, Boon P, Cras P, De Deyn PP, Santens P, Van Broeckhoven C, Cruts M (2012): The genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol* 124(3), 353-72
- Skillbäck T, Farahmand BY, Rosen C, Mattsson N, Nagga K, Kilander L, Religa D, Wimo A, Winblad B, Schott JM (2015): Cerebrospinal fluid tau and amyloid-beta1-42 in patients with dementia. *Brain* 138(9), 2716-31.
- Skillbäck T, Delsing L, Synnergen J, Mattson N, Janelidze S, Nägga K, Kilander L, Hicks R, Wimo A, Winblad B et al. (2017): CSF/ serum albumin ratio in dementias: a cross-sectional study on 1861 patients. *Neurobiol Aging* 59, 1-9
- Skrobot OA, O'Brien J, Black S, Chen C, DeCarli C, Erkinjuntti T, Ford GA, Kalaria RN, Pantoni L, Pasquier F (2017): The Vascular Impairment of Cognition Classification Consensus Study. *Alzheimers Dement* 13(6), 624-633

- Staeckenborg SS, van Straaten EC, van der Flier WM, Lane R, Barkhof F, Scheltens P (2008): Small vessel versus large vessel vascular dementia: risk factors and MRI findings. *Neurol* 255(11), 1644-51; discussion 1813-4
- Stoeck K, Schmitz M, Ebert E, Schmidt C, Zerr I (2014): Immune responses in rapidly progressive dementia: a comparative study of neuroinflammatory markers in Creutzfeldt-Jakob disease, Alzheimer's disease and multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 11, 170
- Tarkowski E, Liljeroth AM, Minthon L, Tarkowski A, Wallin A, Blennow K (2003): Cerebral pattern of pro- and anti-inflammatory cytokines in dementias. *Brain Res Bull* 61, 255-260
- Wada-Isoe K, Wakutani Y, Urakami K, Nakashima K (2004): Elevated interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid of vascular dementia patients. *Acta Neurol Scand* 110(2), 124-7
- Wahlund LO, Barkhof F, Fazekas F, Bronge L, Augustin M, Sjogren M, Wallin A, Ader H, Leys D, Pantoni L (2001): A new rating scale for age-related white matter changes applicable to MRI and CT. *Stroke* 32(6), 1318-22
- Wallin A, Noedlund A, Johnsson M, Blennow K, Zetterberg H, Öhrfelt A, Sålhammar J, Eckerström M, Carlsson M, Olsson E (2016): Alzheimer's disease-subcortical vascular disease spectrum in a hospital-based setting: Overview of results from the Gothenburg MCI and dementia studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 36(1), 95-113
- Weise J, Sandau R, Schwarting S, Crome O, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Bähr M (2006): Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* 37, 1296-1300.
- WHO, Dilling H, Mombour W, Schmidt MH.: Internationale Klassifikation psychischer Störungen. ICD-10 Kapitel V (F), Klinisch-diagnostische Leitlinien. 6. Auflage, Huber, Bern 2008
- Williams PS, Rands G, Orrel M, Spector A (2000): Aspirin for vascular dementia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001296.
- Wimo A, Guerchet , Ali GC, Wu YT, Prina AM, Winblad B, Jönsson L, Liu Z, Prince M (2016): The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010. *Alzheimers Dement* 13, 1-7
- Winblad B, Palmer K, Kivipelto M, Jelic V, Fratiglioni L, Wahlund LO, Nordberg A, Bäckman L, Albert M, Almkvist O (2004): Mild cognitive impairment--beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. *J Intern Med* 256(3), 240-6
- Ying H, Jianping C, Jianqing Y, Shanquan Z (2016): Cognitive variations among vascular dementia subtypes caused by small-, large-, or mixed-vessel disease. *Arch Med Sci* 12(4), 747-53

## **6. Anhang**

### **6.1.**

Hermann P, Romero C, Schmidt C, Reis C, Zerr I (2014).

#### **CSF Biomarkers and Neuropsychological Profiles in Patients with Cerebral Small-Vessel Disease**

PLoS One. 9(8), e105000



# CSF Biomarkers and Neuropsychological Profiles in Patients with Cerebral Small-Vessel Disease

Peter Hermann<sup>1</sup>, Carlos Romero<sup>3</sup>, Christian Schmidt<sup>1</sup>, Clemens Reis<sup>1</sup>, Inga Zerr<sup>1,2\*</sup>

**1** Department of Neurology, Dementia Research Group, Georg-August University Goettingen, Goettingen, Germany, **2** German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Bonn, Germany, **3** Department of Neuroradiology, and # Department of Neuropathology, FLENI, Buenos Aires, Argentina

## Abstract

Despite existing criteria, differential diagnosis of Vascular Dementia (VD) and Alzheimer's disease (AD) remains difficult. The aim of this study is to figure out cognitive and biomarker profiles that may help to distinguish between VD, AD and AD + Cerebral Small Vessel Disease (CSVD). We examined a cohort of patients with CSVD (n = 92). After stratification of cognitive impaired patients (n = 59) using the standard CSF beta-amyloid 42/40 ratio cut-off point of 0.975, we obtained two groups which differed with respect to several features: 32 patients with normal beta-amyloid 42/40 ratio (>0.975) showed markedly impaired blood-brain-barrier function as indicated by an elevated albumin ratio (median 8.35). They also differed in cognitive profiles when compared to 27 patients with AD typical beta-amyloid ratio and normal albumin ratio. We also enrolled an additional group of patients with AD (no significant CSVD on MRI, n = 27) which showed no impairment of the blood-brain-barrier. We showed a negative correlation between the albumin ratio and executive cognitive function (p = 0.016) and a negative correlation between memory function and typical AD markers like Tau (p = 0.004) and p181-Tau (p = 0.023) in our cohort. We suppose that the group of patients with normal beta-amyloid ratio represents VD while patients in the other groups represent AD+CSVD and pure AD. Our results support the idea that a dysfunction of the blood-brain-barrier might be contributing factor in the development of cognitive decline in CSVD as it seems to be of more importance than the severity of white matter lesions.

**Citation:** Hermann P, Romero C, Schmidt C, Reis C, Zerr I (2014) CSF Biomarkers and Neuropsychological Profiles in Patients with Cerebral Small-Vessel Disease. PLoS ONE 9(8): e105000. doi:10.1371/journal.pone.0105000

**Editor:** Hemachandra Reddy, Oregon Health & Science University, United States of America

**Received:** June 2, 2014; **Accepted:** July 3, 2014; **Published:** August 22, 2014

**Copyright:** © 2014 Hermann et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability:** The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All data underlying the findings in our study are freely available in the manuscript or supplemental files.

**Funding:** Part of the study was supported by the mobility exchange program BMBF ARG 07/008. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* Email: ingazerr@med.uni-goettingen.de

## Introduction

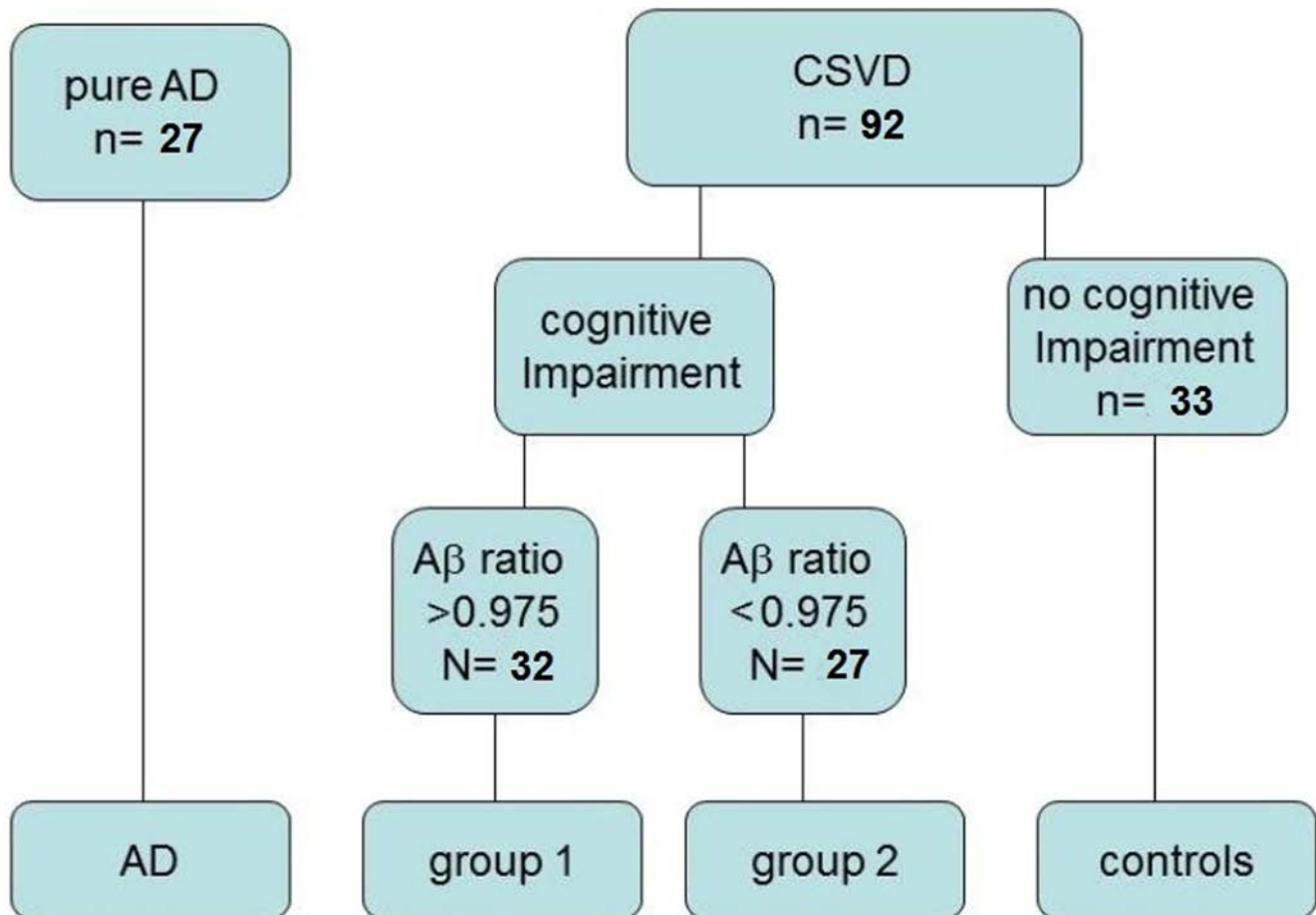
There is an ongoing discussion on pathophysiology, diagnostic criteria and phenotypic diversity of vascular dementia (VD). It is supposed to be the second leading cause of dementia after Alzheimer's disease (AD) but its prevalence remains unclear since studies differ from 0.03-58% in autopsy series [1]. Several criteria have been developed to diagnose VD in a clinical setting and for research studies. Criteria like NINDS-AIREN [2] refer to different entities of VD including the use of imaging (territorial or lacunar strokes), clinical features and causal relation with cerebral ischemic stroke. Dementia following stroke is easy to define, but the diagnosis of subcortical ischemic dementia caused by small vessel disease remains controversial. Over the last years many studies have reported that vascular risk factors contribute to both, VD and AD. Many cases of dementia are considered mixed VD and AD and vascular risk factors might play a major role [3]. Current clinical criteria allow a huge overlap between the aforementioned entities [4] and a distinction as separate entities is not always clearly made [5]. Mixed forms of AD and VD, especially dementia caused by CVSD, do not appear in most criteria and therefore they are not considered in most studies [6].

Subcortical white matter lesions (WML) have been reported to cause VD [7]. The severity of WML on MRI can be measured through qualitative visual rating scales like the Age Related White Matter Changes (ARWMC) scale [8]. Neuropsychological testing is supposed to classify CSVD and AD+CSVD (mixed dementia) correctly [9]. Strong impairment of executive cognitive function with working memory less affected seems to indicate subcortical dementia. Specific neuropsychological batteries are needed for diagnosis and for research to make studies comparable [10].

## CSF Biomarkers

CSF biomarkers are becoming more important in the differential diagnosis of dementia and degenerative neurological diseases. Tau isoforms and beta-amyloid peptides are in focus and many studies attempt to define an AD-specific profile [11]. A ratio of phosphorylated tau to total is supposed to allow AD diagnosis with high specificity against other dementia [12]. A huge amount of studies also demonstrates that the ab 42/40 ratio (ab-ratio) clearly differentiates patients with AD from patients with other dementia. An ab-ratio cut-off point of 0.975 has been calculated to correctly classify AD versus patients with other cause for dementia with a specificity of 90% [13]. Ab peptides and ratios are also discussed to indicate participation of AD-pathology in patients with clinical

# Study cohort



group 1    cognitively impairment, WML, normal A $\beta$  ratio  
 group 2    cognitively impairment, WML, pathological A $\beta$  ratio (AD signature)  
 Controls    cognitively normal, WML, normal A $\beta$  ratio  
 AD

**Figure 1. Stratification of study cohort.**  
 doi:10.1371/journal.pone.0105000.g001

possible or probable VD [14]. However, a CSF biomarker with high specificity for VD in differential diagnosis of dementia has not been established yet. Some studies have shown that the neurofilament light protein in CSF is related with volume of WML and is probably a marker for axonal damage due to small vessel disease [15,16]. While correlation between CSF biomarkers and disease progression in AD has been shown, for patients with CVSD it still needs to be examined.

## Objectives of this study

The main objective of this study is to identify parameters such as neuropsychological test profiles and/or CSF biomarkers which will allow the discrimination between patients with sole CSVD from those with AD+CSVD and pure AD. Another objective was to

identify other than neuropsychologic diagnostic markers, which differentiate VD from CSVD without dementia.

## Methods

### Study design and patients

For this case control study, inclusion criteria was the presence of white matter lesion (score on ARWMC-Scale  $\geq 3$ ). Patients were referred to the Department of Neurology, Georg-August University, Goettingen, Germany and received MRI for various diagnostic reasons, e.g. gait disturbance, headaches, vertigo or cognitive deficits. However, dementia was not necessarily the primary reason for the MRI, which was performed in clinical routine. Patients suffering from major depression, inflammatory disease of the central nervous system, metabolic encephalopathy,

**Table 1.** Description of groups.

|                            | Gender |      | Age [years] |         | ARWMC [score] |         |        | MMSE [score] |  |  |
|----------------------------|--------|------|-------------|---------|---------------|---------|--------|--------------|--|--|
|                            | female | male | Median      | min-max | Median        | min-max | Median | min-max      |  |  |
| <b>Controls</b> (n = 33)   | 13     | 20   | 69.0        | 37–83   | 8.0           | 3–19    | 29.0   | 27–30        |  |  |
| <b>Group 1</b> (n = 32)    | 13     | 19   | 74.0        | 46–88   | 10.0          | 3–30    | 23.5   | 9–27         |  |  |
| <b>Group 2</b> (n = 27)    | 18     | 9    | 78.0        | 65–87   | 9.0           | 3–16    | 23.0   | 11–26        |  |  |
| <b>AD no CSVD</b> (n = 27) | 18     | 9    | 72.0        | 53–88   |               |         | 22.0   | 11–27        |  |  |

doi:10.1371/journal.pone.0105000.t001

recent stroke (less than 8 weeks), territorial infarction, space occupying lesion or cerebral hemorrhage were excluded. Further, only patients who received lumbar puncture on diagnostic purpose (exclusion of inflammatory or neoplastic disease) were included in this study.

Ninety-two patients, 44 males and 48 females, aged 37 to 88 years were included. All patients were examined by a study physician (P.H., C.R.), blind to results of CSF analysis. Medical history was collected. All human studies were approved by the local ethics committee in Goettingen (Ethic committee at the Medical University of Goettingen, Germany (No. 34/9/07)). All participants or respectively their legal representatives signed informed consent to participate in this study.

### Imaging, neuropsychological assessment and CSF Biomarkers

All patients received T2 or FLAIR weighted 3 Tesla MRI using standard protocols for dementia diagnosis or, if suspected, for ischemic cerebral disease including diffusion weighted images. An experienced neuroradiologist (C.R.), rated the scans using the ARWMC-Scale and analyzed them for pathological findings matching exclusion criteria. Patients received a neuropsychological assessment including the MMSE and a German version of the Cambridge Cognitive Examination battery (CAMCOG) from the CAMDEX-R [17]. For further analysis we focused on two subscales for memory and executive function. CSF analyses for tau protein and amyloid ratio [(abeta1-42/abeta1-40)\*10<sup>3</sup>] have been performed using standard methods in the research laboratory of the dementia research group, University of Goettingen. Analysis of standard CSF parameters and albumin ratio [Qalb = (CSF albumin/serum albumin)\*10<sup>3</sup>] have been performed by the Neurochemistry Laboratory at the University Hospital according to standard methodology.

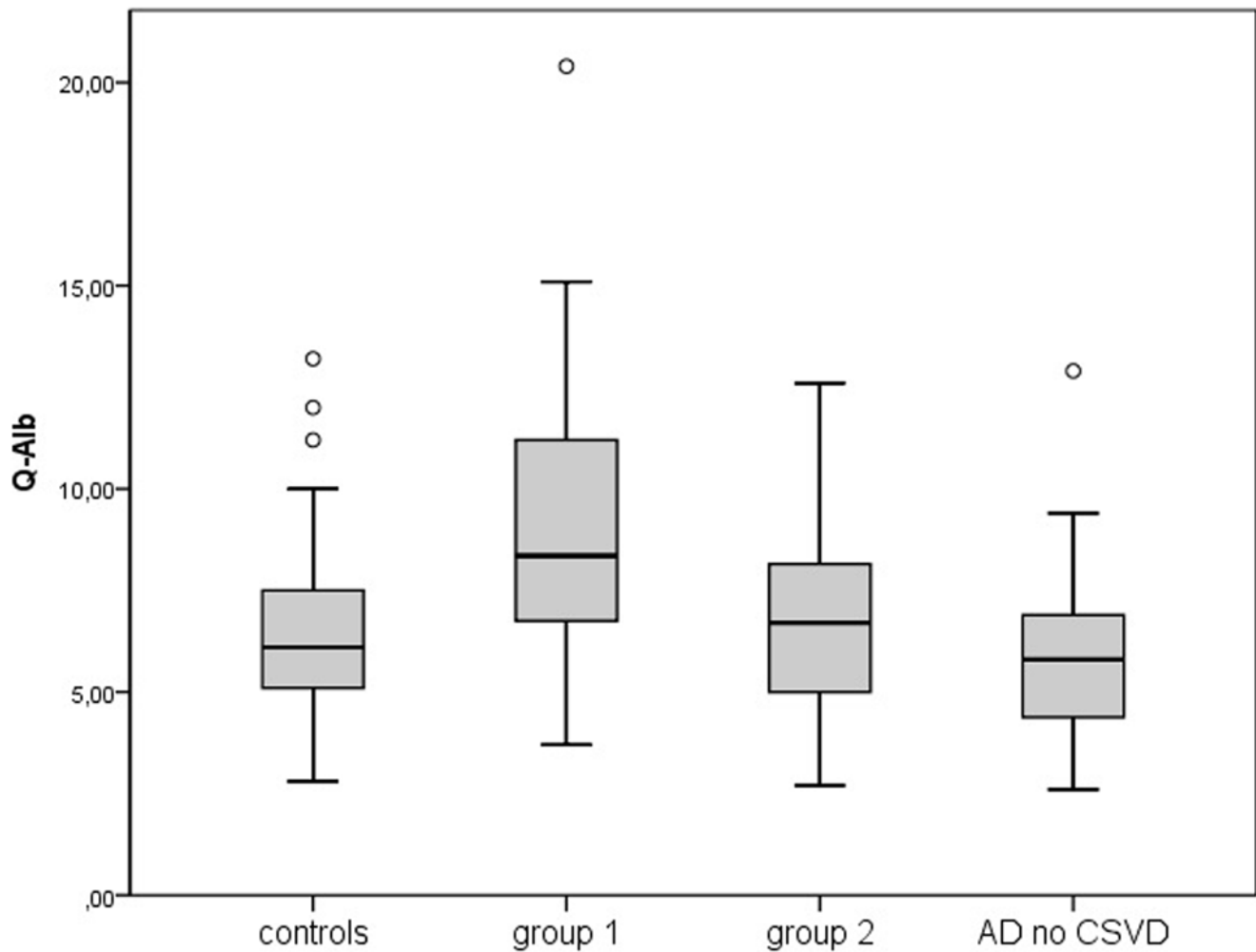
### CAMCOG ratio

We looked for a score that would allow us to compare performances in executive function and memory function between groups of heterogeneous global cognitive condition. Dividing subscale scores from CAMCOG memory function by CAMCOG executive function results in a ratio [mem/exec]. This relative value is independent from absolute scores and was used as a mathematical tool in our group comparisons. Our aim was not to establish a new cognitive score and therefore no validation has been performed. A higher CAMCOG ratio indicates better performance in memory function and worse performance in executive function towards a lower CAMCOG ratio.

### Groups and controls

To separate those individuals from our cohort that did not show relevant cognitive decline, we used the Mini Mental Status Examination (MMSE). Freely accessible population based reference data from the ETH, Zurich were used as reference. All patients with MMSE scores not lower than 1.5 standard deviations below reference (adjusted for age, sex and education) were considered cognitively unimpaired have been marked as ('healthy') controls (n = 33).

Due to overlap, patients with AD+CSVD regularly fulfill criteria for AD and for VD. So we analyzed the data of 59 cognitively impaired individuals from our cohort after stratification into two groups using the CSF ab-amyloid-ratio and a cut-off point at 0.975 [13]. Individuals with normal CSF ab-ratio were assigned as group1 (none AD CSF signature, n = 32) and individuals showing a decreased ab-ratio as group2 (AD CSF signature, n = 27). For comparative CSF analyses including cases of 'pure AD', we selected an additional group of patients with clinical



**Figure 2. CAMCOG [subscores] in groups.**  
[doi:10.1371/journal.pone.0105000.g002](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105000.g002)

diagnosis of AD showing no relevant WML on MRI (ARWMC < 3). Those patients were recruited in another prospective study on risk factors for disease progression in AD (n = 27). An overview on our groups is given in figure 1.

**Statistical analysis**

All statistical analysis have been performed using SPSS 19.0 software. Comparisons between multiple groups were done using ANOVA respectively ANCOVA adjusted for age and gender and

**Table 2.** Description of CSF biomarker and CAMCOG in groups.

|                   | Tau [pg/ml]           |            | P181-Tau [pg/ml]       |           | Alb. ratio [csf/serum] |             |
|-------------------|-----------------------|------------|------------------------|-----------|------------------------|-------------|
|                   | Median                | min-max    | Median                 | min-max   | Median                 | min-max     |
| <b>Controls</b>   | 156                   | <75 – 635  | 39                     | 16 – 78   | 6.10                   | 2.8 – 13.2  |
| <b>Group 1</b>    | 148                   | <75 – 1033 | 34                     | 16 – 87   | 8.35                   | 3.7 – 28.6  |
| <b>Group 2</b>    | 390                   | <75 – 2120 | 94                     | 15 – 224  | 6.70                   | 2.7 – 12.6  |
| <b>AD no CSVD</b> | 610                   | 195 – 2022 | 101                    | 52 – 295  | 5.8                    | 2.6 – 12.9  |
|                   | Mem. function [score] |            | Exec. function [score] |           | Ratio [mem/exec]       |             |
|                   | Median                | (min-max)  | Median                 | (min-max) | Median                 | (min-max)   |
| <b>Controls</b>   | 21.0                  | 14 – 25    | 19.5                   | 9 – 27    | 1.10                   | 0.63 – 2.44 |
| <b>Group 1</b>    | 17.9                  | 5 – 25     | 11.0                   | 6 – 19    | 1.30                   | 0.75 – 2.67 |
| <b>Group 2</b>    | 11.5                  | 4 – 21     | 11.5                   | 4 – 23    | 1.0                    | 0.31 – 2.33 |

doi:10.1371/journal.pone.0105000.t002



for Post hoc analysis Turkey-HSD. Correlations between two variables were calculated with the Spearman Rank Order Correlation. P was considered significant when < 0.05.

**Results**

The median age at enrollment in patients with CSVD was 73 years and did not differ significantly from those with AD no CSVD (72). Within CSVD, controls were younger than group1 (p = 0.03) and group2 (p<0.001). The median ARWMC score was 9.0 points (range 3–30). Group1 had a non-significant higher median score on the ARWMC scale than controls and group2. The median CAMCOG ratio had a value of 1.15. There are less female patients in the control group (33.4%) and group1 (40.6%) than in group2 (66.7%) and AD group (66.7%). The data is shown on table 1.

Concerning CSF parameters, the median albumin ratio in our cohort was 6.4, which is age-corrected a normal level (age group 70-80). The most striking result was the difference of the albumin ratio between groups. It was significantly elevated in group1 (8.35) when compared to group2 (p = 0.013), controls (p = 0.002) and AD no CSVD (p<0.001) as shown in figure 2.

Levels of tau protein and p-tau protein in CSF were elevated in group2 as well as AD no CSVD with high significance when compared to group 1 and controls in a similar way for both proteins (p<0.001). We saw no significant difference between controls and group1. Group2 also showed a lower median tau level than AD no CSVD but when ANOVA has been performed, no significant difference between mean levels could be observed. The data are shown on table 2. The results from ANOVA are summarized on table S1.

Due to our stratification criteria, group1 and group2 showed lower scores on all neuropsychiatric scales than controls, no significant difference between group1, group2 has been found regarding MMSE scores and scores of CAMCOG executive

functions. CAMCOG memory function scores in group2 were lower in group1 (p = 0.003). The CAMCOG ratio was higher in group1 when compared to group2 (p = 0.013) and controls (p = 0.037). The data are shown on table 2. The results from ANOVA are summarized on table S1.

In another step, we analyzed CSF biomarker correlations in our cohort.

Higher scores on the ARWMC scale were associated with lower score in the MMSE (p = 0.043) and CAMCOG executive function (p = 0.082) and higher albumin ratio (p = 0.051). These associations showed no or at highest borderline significance. CSF tau and p-tau levels were strongly correlated (p<0.001). Higher tau levels were also associated significantly with higher age (p = 0.003) as well as lower MMSE scores (p<0.001) and memory function (p = 0.004). We saw no significant correlation between tau and executive function or CAMCOG ratio. The albumin ratio showed negative correlation with CAMCOG executive function (p = 0.016) while it was not associated significantly with age, tau and memory function. The results are shown on table S2. Biomarker correlations were also calculated in each group. All results showed tendencies similar to results from the cohort but were less or non-significant (data not shown).

**Discussion**

In this study, we analyzed a cohort of patients with CVSD with respect to clinical data, neuroimaging, CSF biomarkers and neuropsychological test profiles. Among these, we identified a great variety of cognitive disturbances, which ranged from cognitively normal individuals to severely impaired dementia patients. With respect to CSF biomarker profiles, we identified a cohort of patients who displayed an "AD-signature", which is defined by low ab-ratio and high levels of protein tau and its phosphorylated isoforms (group2). In neuropsychological tests, they had greater impairment of memory functions than executive

|                                      | <b>Tau</b> | <b>p-tau</b> | <b>aβ-ratio</b> | <b>alb. ratio</b> | <b>ARWMC</b> |
|--------------------------------------|------------|--------------|-----------------|-------------------|--------------|
| <b>Pure VD</b>                       | √          | √            | √               | ↑                 | ↑↑↑*         |
| <b>AD + CVSD (MD)</b>                | ↑          | ↑            | ↓               | √ - ↑             | ↑            |
| <b>Pure AD</b>                       | ↑↑         | ↑↑           | ↓               | √                 | √            |
| <b>*tendency but not significant</b> |            |              |                 |                   |              |

**Figure 3. Albumin ratio [CSF/serum] in groups.**  
doi:10.1371/journal.pone.0105000.g003

functions. Taking all these results into account, we have to discuss that these patients most likely represent a subgroup which is very close to pure AD patients. Still, the significance of WML in MRI in these patients is not clarified to date, but seems to be of minor importance or could be a by chance finding.

The characteristics of the other group are summarized as following: slightly higher WML score, normal tau and p-tau levels in CSF but disturbed blood-brain-barrier as determined by the albumin ratio, severely impaired executive cognitive functions. We have to discuss, that most likely the mechanisms of pathogenesis that are involved here are different from those in group2. This idea is supported by the fact that in our cohort the albumin ratio (elevated in group1) is associated with executive function while tau and ptau (elevated in group2) are associated with memory function. Patients in group1 are more likely to represent patients with pure CSVD or VD.

In recent years, there has been a considerable amount of studies on biomarker identification and validation in patients with AD, VD and AD plus WML. Only few studies with small cohorts are available on the albumin ratio in this context, but they also revealed that in VD the ratio is elevated and the blood-brain-barrier is thus impaired [18]. Other studies which analyze multiple parameters (albumin ratio and common CSF biomarkers for dementia) are not available. Our CSF results are in accordance with the current ideas on pathogenesis of small-vessel disease of the brain: small vessel structural changes are characterized by vessel wall thickening leading to a structural breakdown and perivascular changes like edema and enlarged perivascular spaces [19]. The blood-brain-barrier as an endothelial function is affected early and its breakdown is a leading factor in progression of the pathological process. Elevated albumin and other serum proteins have been found in CSF and in the brain of patients with vascular dementia [18].

Controversial data are obtained with regard to the significance of WML in MRI and clinical syndrome. Some support the idea, that severity or progression of WML in an elderly population is an independent predictor for the occurrence of cognitive decline [20–22]. Other studies showed that the presence of WML in cognitively impaired patients had no effect on the progression rate of dementia [23]. Of interest and with respect to the brain imaging data, we hypothesize that WML represent abnormalities, which do not necessarily indicate development of cognitive decline. In patients from group1, WML might correspond to microvascular pathology and may lead to dementia, whereas in patients from group2, we must assume another pathogenesis of cognitive decline. The role of WML and their relevance as a marker for pure vascular dementia also remains uncertain, since the control group represents a cohort of patients with WML showing no cognitive decline. These conclusions are substantiated

by our findings on neuropsychological tests. We only found a tendency of borderline significance between severity of WML and cognitive performance. In addition, the difference of the severity of WML between cognitively healthy and impaired patients did not turn out to be significant.

With regard to the literature, we assume that cognitive decline and WML are associated and may share pathogenic pathways, but WML do not seem to be the best marker to differentiate VD from other dementia. Therefore we have to search for other parameters that are linked to the pathophysiology of cerebral small vessel disease. Markers of blood brain barrier function like the albumin ratio seem to be promising targets for prospective studies.

In summary, we found significant differences between CSF biomarker levels and neuropsychological test profiles in two groups of cognitively impaired and demented patients, both showing white matter lesions on MRI. We assume that these groups represent patients with pure VD and AD+CSVD. Studies on therapy and diagnostic markers in AD and VD still suffer from a very difficult differentiation between these two entities and the common case of a mixed disease. In recent years, CSF biomarker proteins have become a widely used diagnostic instrument. Our results demonstrate the importance of these markers. A combination of neuropsychological profile, albumin ratio and common CSF biomarkers for Alzheimer's disease could help to distinguish between pure dementia due to cerebral small vessels disease, Alzheimer's disease and AD + CSVD (for a synopsis, see figure 3, patients from group1 are indicated as 'pure VD' and patients from group2 as 'AD+CSVD').

## Supporting Information

**Table S1 Multiple comparisons (ANOVA – adjusted for age and gender).**  
(DOC)

**Table S2 Correlations in cohort CSVD (n = 92).**  
(DOC)

## Acknowledgments

The study was performed within the recent established Clinical Dementia Center at the University Medical School Goettingen and the German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE).

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PH IZ. Performed the experiments: PH C. Reis. Analyzed the data: PH C. Romero. Contributed reagents/materials/analysis tools: CS. Contributed to the writing of the manuscript: PH IZ.

## References

- Jellinger KA (2008) The pathology of "vascular dementia": a critical update. *J Alzheimers Dis* 14(1): 107–23.
- Roman GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, Cummings JL, Masdeu JC, et al. (1993) Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology* 43(2): 250–60.
- Broderick DF, Schweitzer KJ, Wszolek ZK (2009) Vascular risk factors and dementia: how to move forward? *Neurology* 73(22): 1934–5.
- Pohjasvaara T, Mantyla R, Ylikoski R, Kaste M, Erkinjuntti T (2000) Comparison of different clinical criteria (DSM-III, ADDTC, ICD-10, NINDS-AIREN, DSM-IV) for the diagnosis of vascular dementia. National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences. *Stroke* 31(12): 2952–7.
- Roman GC, Erkinjuntti T, Wallin A, Pantoni L, Chui HC (2002) Subcortical ischaemic vascular dementia. *Lancet Neurol* 1(7): 426–36.
- Cavalleri M, Enzinger C, Petrovic K, Pluta-Fuerst A, Homayoon N, et al. (2010) Vascular dementia and Alzheimer's disease - are we in a dead-end road? *Neurodegener Dis* 7(1–3): 122–6.
- Hachinski VC, Potter P, Merskey H (1987) Leuko-araiosis. *Arch Neurol* 44(1): 21–3.
- Wahlund LO, Barkhof F, Fazekas F, Bronge L, Augustin M, et al. (2001) A new rating scale for age-related white matter changes applicable to MRI and CT. *Stroke* 32(6): 1318–22.
- Schmidtke K, Hüll M (2002) Neuropsychological differentiation of small vessel disease, Alzheimer's disease and mixed dementia. *J Neurol Sci* 203–204: 17–22.
- Hachinski V, Iadecola C, Petersen RC, Breteler MM, Nyenhuis DL, et al. (2006) National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Canadian Stroke Network vascular cognitive impairment harmonization standards. *Stroke* 37(9): 2220–41.

11. Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33(1): 95–130.
12. Hu YY, He SS, Wang X, Duan QH, Grundke-Iqbal I, et al. (2002) Levels of nonphosphorylated and phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients: an ultrasensitive bienzyme-substrate-recycle enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Pathol* 160(4): 1269–78.
13. Lewczuk P, Esselmann H, Otto M, Maler JM, Henkel MK, et al. (2004) 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.
14. Bibl M, Mollenhauer B, Esselmann H, Schneider M, Lewczuk P, et al. (2008) Cerebrospinal fluid neurochemical phenotypes in vascular dementias: original data and mini-review. *Dement Geriatr Cogn Disord* 25(3): 256–65.
15. Jonsson M, Zetterberg H, van Straaten E, Lind K, Syversen S, et al. (2009) Cerebrospinal fluid biomarkers of white matter lesions - cross-sectional results from the LADIS study. *Eur J Neurol* 17(3): 377–82.
16. Sjogren M, Blomberg M, Jonsson M, Wahlund LO, Edman A, et al. (2001) Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a marker of white matter changes. *J Neurosci Res* 66(3): 510–6.
17. Roth M, Tym E, Mountjoy CQ, Huppert FA, Hendrie H, et al. (1986) CAMDEX. A standardised instrument for the diagnosis of mental disorder in the elderly with special reference to the early detection of dementia. *Br J Psychiatry* 149: 698–709.
18. Farrall AJ, Wardlaw JM (2009) Blood-brain barrier: Ageing and microvascular disease - systematic review and meta-analysis. *Neurobiol Aging* 30(3): 337–52.
19. Ma KC, Olsson Y (1997) The role of chronic brain oedema in the formation of lacunes in Binswanger's encephalopathy. *Cerebrovasc Dis* 7: 324–31.
20. Verdelho A, Madureira S, Moleiro C, Ferro JM, Santos CO, et al. (2010) White matter changes and diabetes predict cognitive decline in the elderly: the LADIS study. *Neurology* 75(2): 160–7.
21. Nitkunan A, Barrick TR, Charlton RA, Clark CA, Markus HS (2008) Multimodal MRI in cerebral small vessel disease: its relationship with cognition and sensitivity to change over time. *Stroke* 39(7): 1999–2005.
22. Silbert LC, Howieson DB, Dodge H, Kaye JA (2009) Cognitive impairment risk: white matter hyperintensity progression matters. *Neurology* 73(2): 120–5.
23. Bronge L, Wahlund LO (2003) Prognostic significance of white matter changes in a memory clinic population. *Psychiatry Res* 122(3): 199–206.

### 6.1.1. Supplemental Data

**Tabelle 14:**

Table 3. (supplemental): Multiple comparisons

|                        | <b>ANOVA (mean difference)</b>   |  |
|------------------------|--|--|
| <b>Age</b>             | controls are younger than group 1: $p = 0.030$ (-7.02)<br>controls are younger than group 2: $p < 0.001$ (-11.07)<br><br>no significant differences between other groups   | Kruskal–Wallis<br>one-way analysis of variance:<br>$p = 0.002$<br>→ reject null hypothesis |
| <b>ARWMC</b>           | no significant differences between controls, group 1 and group 2   |  |
| <b>Albumin Ratio</b>   | group 1 has a higher ration than controls: $p = 0.002$ (3.03)<br>group 1 has a higher ration than group 2: $p = 0.013$ (2.62)<br>group 1 has a higher ration than group 3: $p < 0.001$ (3.85)<br><br>no significant differences between other groups   | Kruskal–Wallis<br>one-way analysis of variance:<br>$p < 0.001$<br>→ reject null hypothesis |
| <b>CSF Tau</b>         | controls have a lower level than group 2: $p < 0.001$ (-382.73)<br>controls have a lower level than AD no CSVD: $p < 0.001$ (-456.66)<br><br>group 1 has a lower level than group 2: $p < 0.001$ (-337.66)<br>group 1 has a lower level than AD no CSVD: $p < 0.001$ (-411.59)<br><br>no significant difference between group 2 and AD no CSVD<br>no significant difference between controls and group 1 | Kruskal–Wallis<br>one-way analysis of variance:<br>$p < 0.001$<br>→ reject null hypothesis |
| <b>CSF P181 Tau</b>    | controls have a lower level than group 2: $p < 0.001$ (-54.47)<br>controls have a lower level than AD no CSVD: $p < 0.001$ (-70.46)<br>group 1 has a lower level than group 2: $p < 0.001$ (-56.23)<br>group 1 has a lower level than AD no CSVD: $p < 0.001$ (-72.32)<br><br>no significant difference between group 2 and AD no CSVD<br>no significant difference between controls and group 1         | Kruskal–Wallis<br>one-way analysis of variance:<br>$p < 0.001$<br>→ reject null hypothesis |
| <b>CAMCOG mem</b>      | group 1 has a higher score than group 2: $p = 0.003$ (4.13)<br>controls have a higher score than group 1 and 2 ( $p < 0.001$ )<br><br>for AD no CSVD no data has been obtained   | Kruskal–Wallis<br>one-way analysis of variance:<br>$p < 0.001$<br>→ reject null hypothesis |
| <b>CAMCOG exec</b>     | controls have a higher score than group 1 and 2 ( $p < 0.001$ )<br><br>no significant difference between group 1 and 2<br>for AD no CSVD no data has been obtained   | Kruskal–Wallis<br>one-way analysis of variance:<br>$p < 0.001$<br>→ reject null hypothesis |
| <b>CAMCOG mem/exec</b> | group 1 has a higher ratio than controls: $p = 0.037$ (0.284)<br>group 1 has a higher ratio than group 2: $p = 0.013$ (3.44)<br><br>no significant difference between controls and group 2<br>for AD no CSVD no data has been obtained   | Kruskal–Wallis<br>one-way analysis of variance:<br>$p = 0.005$<br>→ reject null hypothesis |

**Tabelle 15:**

Table 4. (supplemental): Correlations in cohort CSVD (n = 92)

| Variable 1                           | Variable 2              | Corr   | P-value   |
|--------------------------------------|-------------------------|--------|-----------|
| <b>ARWMC</b>                         | Age                     | 0.075  | 0.475     |
|                                      | MMSE                    | -0.211 | 0.043*    |
|                                      | CamCog exec             | -0.187 | 0.082     |
|                                      | CamCogmem               | -0.041 | 0.703     |
|                                      | CamCog ratio (mem/exec) | 0.063  | 0.563     |
|                                      | Total – Tau             | -0.016 | 0.880     |
|                                      | P181 – Tau              | -0.050 | 0.651     |
|                                      | Albumin ratio           | 0.204  | 0.051     |
| <b>Albumin ratio<br/>[CSF/serum]</b> | Age                     | 0.169  | 0.067     |
|                                      | MMSE                    | -0,038 | 0.684     |
|                                      | CamCog exec             | -0.259 | 0.016**   |
|                                      | CamCogmem               | -0.056 | 0.609     |
|                                      | CamCogratio (mem/exec)  | 0.192  | 0.156     |
|                                      | Total – Tau             | -0.034 | 0.715     |
|                                      | P181 – Tau              | -0.117 | 0.224     |
|                                      | <b>Tau</b>              | Age    | 0.266     |
| MMSE                                 |                         | 0.355  | < 0.001** |
| CamCog exec                          |                         | -0.132 | 0.246     |
| CamCogmem                            |                         | -0.308 | 0.004**   |
| CamCogratio (mem/exec)               |                         | -0.151 | 0.162     |
| P181 – Tau                           |                         | 0.805  | < 0.001** |

Spearman Rank Order Correlation

\*p &lt; 0.05

\*\*p &lt; 0.02

**6.1.2. Erratum zur Publikation I**

Im Januar 2017 wurde eine Anfrage bzgl. eines Erratums an die Editoren des Journals PlosOne gestellt. Es wurde darauf hingewiesen, dass eine fehlerhafte Titulierung (bei inhaltlich korrekter Darstellung) der Abbildung 2 auf Seite 4 der Publikation vorlag.

Der fehlerhafte Titel war: Figure 2. CAMCOG [subscores] in groups.

Der korrekte Titel wäre: Figure 2. Albumin ratio [CSF/serum] in groups

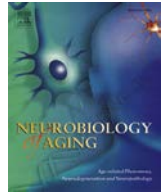
Das Korrekturgremium von PLoS ONE stufte dies als „minor error“ ein, verwies auf die Online-Kommentarfunktion und strebte keine Veröffentlichung eines Erratums an.

**6.2.**

Schmitz M, Hermann P, Oikonomou P, Stoeck K, Ebert E, Poliakova T,  
Schmidt C, Llorens F, Zafar S, Zerr I (2015).

**Cytokine profiles and the role of cellular prion protein in patients with  
vascular dementia and vascular encephalopathy.**

Neurobiol Aging 36, 2597-2606



## Cytokine profiles and the role of cellular prion protein in patients with vascular dementia and vascular encephalopathy



Matthias Schmitz<sup>a,\*</sup>, Peter Hermann<sup>a</sup>, Pantelis Oikonomou<sup>a</sup>, Katharina Stoeck<sup>a</sup>, Elisabeth Ebert<sup>a</sup>, Tatjana Poliakova<sup>b</sup>, Christian Schmidt<sup>a</sup>, Franc Llorens<sup>a</sup>, Saima Zafar<sup>a</sup>, Inga Zerr<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Neurology, University Medical Center Göttingen, and German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE)—site Göttingen, Göttingen, Germany

<sup>b</sup> Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 October 2014

Received in revised form 28 April 2015

Accepted 20 May 2015

Available online 11 June 2015

#### Keywords:

Neuroinflammation

Cellular prion protein

Cytokines

Vascular dementia

Vascular encephalopathy

### ABSTRACT

Understanding inflammatory mechanisms in vascular dementia (VD) is pivotal for achieving better insights into changes in brain metabolism. We performed cytokine profiling and measured levels of the cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) in serum and cerebrospinal fluid (CSF) samples from patients with VD and with vascular encephalopathy (VE). Significant changes were observed for interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, tumor necrosis factor alpha, interferon gamma, granulocyte-colony stimulating factor, monocyte chemoattractant protein 1, and macrophage inflammatory protein 1 beta in serum and for IL-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor in CSF of VD and VE patients, suggesting that most of immune markers depend on vascular lesions, while only IL-6 was related to dementia. In VD patients, the severity of dementia as defined by the Mini-Mental Status Test or Cambridge Cognitive Examination battery test was significantly correlated with the levels of IL-8 (CSF) and macrophage inflammatory protein 1 beta (serum and CSF). Additionally, in CSF of VD patients, our data revealed a correlation between immune and neurodegenerative marker proteins. Both indicate an association of neuroinflammation and cognitive decline. Levels of PrP<sup>C</sup> were regulated differentially in VD and VE patients compared with Alzheimer's disease patients and controls. Moreover, we observed a significant negative correlation between cytokine levels and PrP<sup>C</sup> in VD patients in CSF and serum, as well as a correlation between PrP<sup>C</sup> expression with levels of neurodegenerative marker proteins in CSF (in VD and VE patients). Our data suggest that immunological modifiers play a role in VD and VE patients and provide evidence for an association of PrP<sup>C</sup> with immune and neurodegenerative markers.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Subcortical vascular encephalopathy (SVE) mediated by small-vessel disease is a major cause of vascular cognitive impairment leading to vascular dementia (VD) (Moorhouse and Rockwood, 2008). The main characteristics are white matter lesions on brain imaging (as related to vascular encephalopathy, VE), combined with clinical symptoms (including cognitive impairment, gait disturbance, and various focal neurological signs as well as incontinence) (Baezner and Daffertshofer, 2003). Inflammatory mechanisms are suspected to play an important role in the pathophysiology of VD

(Iadecola, 2010) and immunological responses in other neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD).

Investigating immune markers in neurodegenerative diseases may be relevant for a better understanding of the role of inflammation in pathological processes related to cognitive impairment. Moreover, identifying specific inflammatory processes with a characteristic immunological profile might help to discriminate between different kinds of dementia diseases, for example, between VD and AD (Wada-Isoe et al., 2004).

There is abundant evidence that cytokine-mediated interactions between neurons and glia cells contribute to cognitive impairment (Rubio-Perez and Morillas-Ruiz, 2012), suggesting that the brain's innate immune system has a major influence on the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

A number of different cytokines such as interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), and IL-6 have already been found to be differentially regulated in the cerebrospinal fluid (CSF)

\* Corresponding author at: Department of Neurology, Georg-August University, Robert-Koch-Str.40, 37075 Göttingen, Germany. Tel.: +49 551 3910454; fax: +49 551 397020.

E-mail address: [matthias.schmitz@med.uni-goettingen.de](mailto:matthias.schmitz@med.uni-goettingen.de) (M. Schmitz).

of VD or AD patients (Tarkowski et al., 2003; Wada-Isoe et al., 2004), indicating a potential role in both diseases. In AD, a colocalization of immune markers and amyloid beta plaques have been observed (Cacquevel et al., 2004). Moreover, certain gene polymorphisms for IL-1 and TNF- $\alpha$  have already been associated with an increased risk of developing AD (Di Bona et al., 2008).

In patients with dementia, an acute inflammatory stimulus in the brain (e.g. amyloid or stroke) is thought to initiate the production of inflammatory cytokines. Although the blood-brain barrier effectively hinders cytokines traveling to the periphery, other communication pathways may also induce cytokine production in peripheral blood tissue (De Simoni et al., 1995). The variety of immune responses and the regulatory mechanisms are very complex.

A potential regulator of immunological processes is the cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>), which is expressed in caveolin-containing microdomains (Peters et al., 2003), important for signal transduction (Schmitz et al., 2010a, 2013). Previous studies have shown that PrP<sup>C</sup> is highly expressed in peripheral blood leukocytes (Durig et al., 2000) and human CSF (Schmitz et al., 2010b, 2014a). Furthermore, PrP<sup>C</sup> may interact with the T-cell receptor and is involved in T-cell activation processes (Hu et al., 2010; Mattei et al., 2004). Moreover, PrP<sup>C</sup> protects neurons under oxidative and ischemic stress conditions (Weise et al., 2004, 2006), putting PrP<sup>C</sup> at the intersection of neuroinflammation and neurodegeneration.

The idea of the present study is to address the role of inflammation, as well as the role of PrP<sup>C</sup>, in VD and VE in comparison to AD patients and control donors. We performed a cytokine profiling in the CSF and serum of VD, VE, AD, and control donors without neurodegenerative diseases, using a human cytokine 17-plex xMAP-based assay. Additionally, we determined the levels of PrP<sup>C</sup> in different body fluids of VD and VE patients, and we correlated cytokine levels with known dementia marker proteins, PrP<sup>C</sup> and the severity of dementia as defined by neuropsychological assessment tests.

## 2. Material and methods

### 2.1. Patients and sample collection

We analyzed CSF and serum samples from 87 SVE patients. Both were obtained from the same patient (blood and CSF were not collected at the same time, but the difference was kept to a minimum of 60 days).

The SVE cohort was divided into subgroups: patients with clinical manifestation of dementia (VD,  $n = 42$  patients) and patients with VE but without dementia (VE,  $n = 41$  patients), 4 patients with an amyloid copathology were excluded. The SVE cohort and the AD cohort were diagnosed according to the McKhann criteria (McKhann et al., 2011). The gender distribution in the patient cohort was not significantly different (Table 1). Inclusion criteria for the SVE cohort were the presence of white-matter lesions on magnetic resonance imaging (MRI), which patients received during clinical routine for various reasons (e.g., cognitive impairment, gait disturbance, headaches). MRIs were rated by a neuroradiologist using the age-related white matter changes scale (ARWMC) (Wahlund et al., 2001) considering a score  $>3$  as relevant. Patients with acute ischemia or chronic territorial infarction were excluded. Other exclusion criteria were: central nervous system inflammation and tumors, but for the control group ( $n = 41$ ), we used samples from patients with no vascular or neurodegenerative diseases. An organic disease of the central nervous system was excluded during the diagnostic workup of the controls. Differential diagnoses of the control group included mainly depression, headache, and vertigo or pain syndromes.

The study was approved by the local ethics committee in Göttingen (No. 34/9/07). Our experiments were undertaken with the

**Table 1**

Patient cohort of this study

| Groups                                   | N  | Gender                |               | Age (in years)      |                          |
|--|----|-----------------------|---------------|---------------------|--------------------------|
|  |    | Female (%) / male (%) |               | Mean value $\pm$ SD | Median (minimum–maximum) |
| SVE                                      | 87 | 42 (48.3)             | 45 (51.7)     | 73.22 $\pm$ 9.9     | 75 (40–87)               |
| AD                                       | 52 | 29 (55.8)             | 23 (44.2)     | 67.62 $\pm$ 10.61   | 68.5 (50–87)             |
| Control                                  | 41 | 23 (52.7)             | 18 (43.3)     | 64.21 $\pm$ 14.58   | 68 (24–74)               |
| SVE subgroups                            |    |                       |               |                     |                          |
| VD                                       | 42 | 17 (41.5)             | 24 (58.5)     | 76.66 $\pm$ 7.3     | 76 (55–88)               |
| VE                                       | 41 | 25 (61)               | 16 (39)       | 69.63 $\pm$ 11.4    | 73 (40–84)               |
| Differences between groups and subgroups |    |                       | Significances | <i>p</i> -values    |                          |
| SVE versus C                             |    |                       | ns            | 0.4358              |                          |
| SVE versus AD                            |    |                       | ns            | 0.4834              |                          |
| VD versus VE                             |    |                       | ns            | 0.2039              |                          |
| AD versus C                              |    |                       | ns            | 1.0000              |                          |

Analysis of potential differences in gender distribution using the  $\chi^2$  test. No significant differences in gender distribution in the patient cohort could be observed. Key: AD, Alzheimer's disease; C, control; ns, nonsignificant; SD, standard deviation; SVE, subcortical vascular encephalopathy; VD, vascular dementia; VE, vascular encephalopathy.

understanding and written consent of each subject and the study conformed to the Code of Ethics of the World Medical Association. Informed consent was given by all study participants or their legal next of kin. All samples were anonymized.

### 2.2. Samples

CSF samples were stored at  $-80$  °C before analysis. Those stained with blood were excluded from the study. Blood was centrifuged at 2000 rpm (720g, Eppendorf 5804r) for 10 minutes. Serum in the supernatant was collected and stored in 2 mL Eppendorf tubes at  $-80$  °C.

### 2.3. Cytokine multiplex assay

Cytokine levels in CSF and serum samples were measured with a Bio-Plex 200-system based on the Luminex xMAP technology (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). In the present study, we screened CSF and serum samples by using the Bio-Plex human cytokine 17-plex Pro assay, cytokine group 1 (Bio-Rad, Munich, Germany). We detected the following cytokines simultaneously: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) macrophage inflammatory protein 1 beta (MIP-1 $\beta$ ), and TNF- $\alpha$ .

The cytokine assay was performed according to the manufacturer's instructions. Very briefly, all samples were thawed on ice and mixed by vortexing and then diluted 1:4 (50  $\mu$ L sample + 150  $\mu$ L sample diluent buffer). The incubation with the bead-coupled and the biotinylated detection antibodies (human group I antibodies) took 30 minutes at room temperature with shaking at 300 rpm. The signal detection was performed using the Bio-Plex 200-system and the Bio-Plex Manager software version 6.0.

### 2.4. Determination of A $\beta$ 1–40 and A $\beta$ 1–42 concentration in CSF

Levels of A $\beta$ 1–40 were ascertained using the full-length A $\beta$ 1–40 assay enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) obtained from IBL (Hamburg, Germany). Levels of A $\beta$ 1–42 were determined with a commercially available ELISA kit (INNOTEST-AMYLOID (1–42), Innogenetics, Gent, Belgium).



All ELISA measurements were performed according to the protocol of the manufacturer as described previously (Schmitz et al., 2014b). The colorimetric reaction was measured at 450 nm with a 1420 Multilabel Counter Victor 2 (Wallac) (PerkinElmer, MA, USA). Each sample was measured in duplicates. For analysis we calculated the median.

### 2.5. Determination of tau and p-tau 181 concentration in CSF

CSF total tau protein was measured using a commercially available ELISA kit (INNOTEST hTAU Ag, Innogenetics). For the determination of tau level, we followed the manufacturer's instructions. Human tau, phosphorylated at threonine 181 (p-tau) was analyzed quantitatively with a commercially available ELISA kit [INNOTEST PHOSPHO-TAU (181P), Innogenetics].

Briefly, before antibody incubations, each sample (75 mL) was diluted 1:1 in sample diluent buffer. The colorimetric reaction was measured at 450 nm with a 1420 Multilabel Counter Victor 2 (Wallac) (PerkinElmer). Each sample was measured in duplicates.

### 2.6. Determination of PrP<sup>C</sup> concentration

We used an ELISA based on the Luminex xMAP technology to measure the concentration of PrP in human CSF. All chemicals and equipment were obtained from Bio-Rad (Munich, Germany). Sodium azide was removed by using Micro Bio-Spin 6 chromatography columns (Bio-Rad). We followed a previously published protocol (Schmitz et al., 2014a). CSF or serum samples were incubated overnight with the bead-coupled detection antibody (diluted 1:50). After washing in a Bio-Plex Prol wash station, the samples were incubated with 50  $\mu$ L of biotinylated antibody (SAF32, diluted 1:200). PrP<sup>C</sup> concentration was measured using the Bio-Plex 200 system.

To exclude possible variations caused by sample storage conditions, we ensured that the investigated CSF samples were stored for not longer than 4 days at room temperature or 4 °C, respectively and avoided repeated freeze and thaw cycles (>8 times). Under these conditions, there would be no significant loss of >20% total PrP<sup>C</sup> amount in CSF (Schmitz et al., 2014a).

### 2.7. Neuropsychological assessment

All patients received a neuropsychological assessment including German versions of the Mini-Mental State Test (MMST) and the Cambridge Cognitive Examination (CAMCOG) from CAMDEX-R (Roth et al., 1986). Neuropsychological testing as well as neurological examination has been assessed by a study physician.

### 2.8. Statistical analysis

Statistical evaluation of the data was performed using the statistical software Graph Path Prism (version 5). All correlation studies were computed by using the nonparametric Spearman correlation test (2-tailed) in a confidence interval of 95%. The optimal Spearman correlation of +1 or –1 can be observed when each of the variables is a perfect monotone function of the other. The Mann-Whitney test was used for comparison between 2 groups. For comparison between >2 groups, we used the 1-way ANOVA analysis of variance followed by Tukey post hoc analysis. All *p*-values <0.05 are considered as significant. The standard of the mean was calculated for individual samples to assess the variations between individuals of the same group and depicted as error bars.

## 3. Results

### 3.1. Cytokine profiling in serum of patients with VD and VE

The levels of a cytokine panel, consisting of 17 different cytokines (14 proinflammatory and anti-inflammatory as well as 3 chemokines) were measured in serum samples from VD, VE, AD, and control patients using the Bio-Plex human cytokine 17-plex Pro assay. We found significantly elevated levels of 3 proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), of 2 anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-5) and 1 chemokine (G-CSF) in serum of patients with VD and VE compared with AD patients and controls (Fig. 1A–F). Additionally, we found a slightly increased level of IL-1 $\beta$  in AD patients (*p* < 0.05) (Fig. 1A). Intriguingly, levels of the chemokines MCP-1 and MIP-1 $\beta$  were significantly lower in VD and/or VE patients when compared with AD (Fig. 1G and H), whereas the chemokine MCP-1 was significantly higher in controls than in VD and VE patients (Fig. 1G). When we correlated the cytokine expression of VD patients with the MMST score, we observed MIP-1 $\beta$  significantly correlated (graph 1 in Fig. 1I). In VE patients, we obtained a significant correlation of IL-13 expression with MMST scores (graph 2 in Fig. 1I). Other cytokines showed no correlation with the MMST score (Supplementary Fig. 1).

The expression of IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, and GM-CSF was either under the detection limit or not significantly changed in the serum of our patient cohort (data not shown).

### 3.2. Cytokine profiling in CSF of patients with VD and VE

The levels of a cytokine panel, consisting of 17 different cytokines, were measured in the CSF samples from VD, VE, AD, and control patients using the same assay system as for serum analysis.

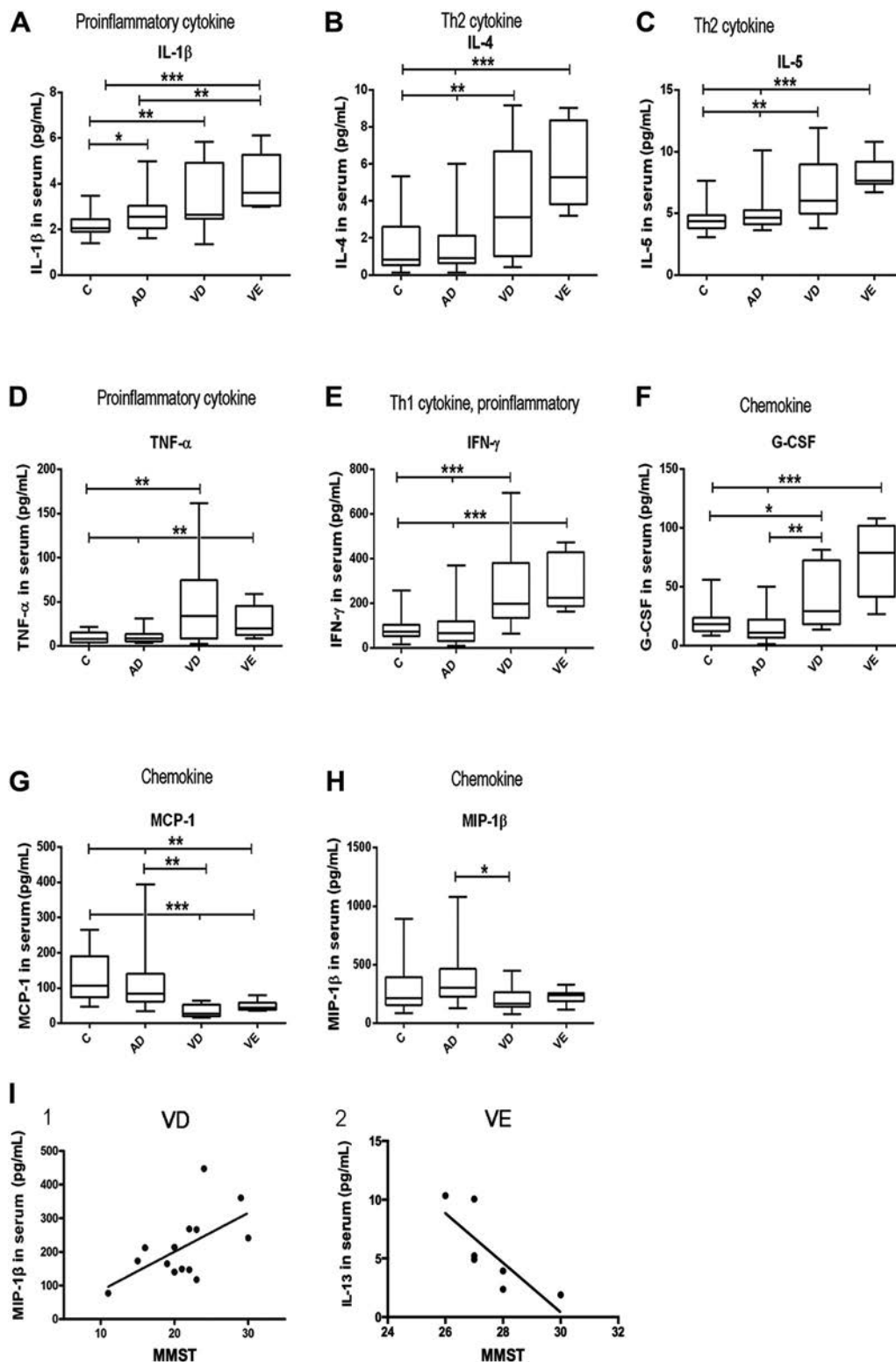
In CSF, our data revealed significantly increased levels of the proinflammatory cytokine IL-6 in VD and AD patients compared with VE and control donors (graph 1 in Fig. 2A). In contrast, the chemokine GM-CSF was lower in VD and VE patients compared with AD patients (graph 2 in Fig. 2A). The expression of IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF, IFN- $\gamma$ , MCP-1, MIP-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  was either not measurable or not significantly changed in the CSF of our patients cohort (data not shown).

Additionally, we correlated the cytokine concentration in CSF of VD patients with the MMST score and CAMCOG score, as well as with the expression of neurodegenerative marker proteins, such as tau, p-tau, and amyloid beta. In VD patients, we observed the MMST and CAMCOG score significantly correlated with the cytokine levels of MIP-1 $\beta$  (graphs 1 and 2 in Fig. 2B), while IL-8 was negatively correlated with CAMCOG scores of VD patients (graph 3 in Fig. 2B).

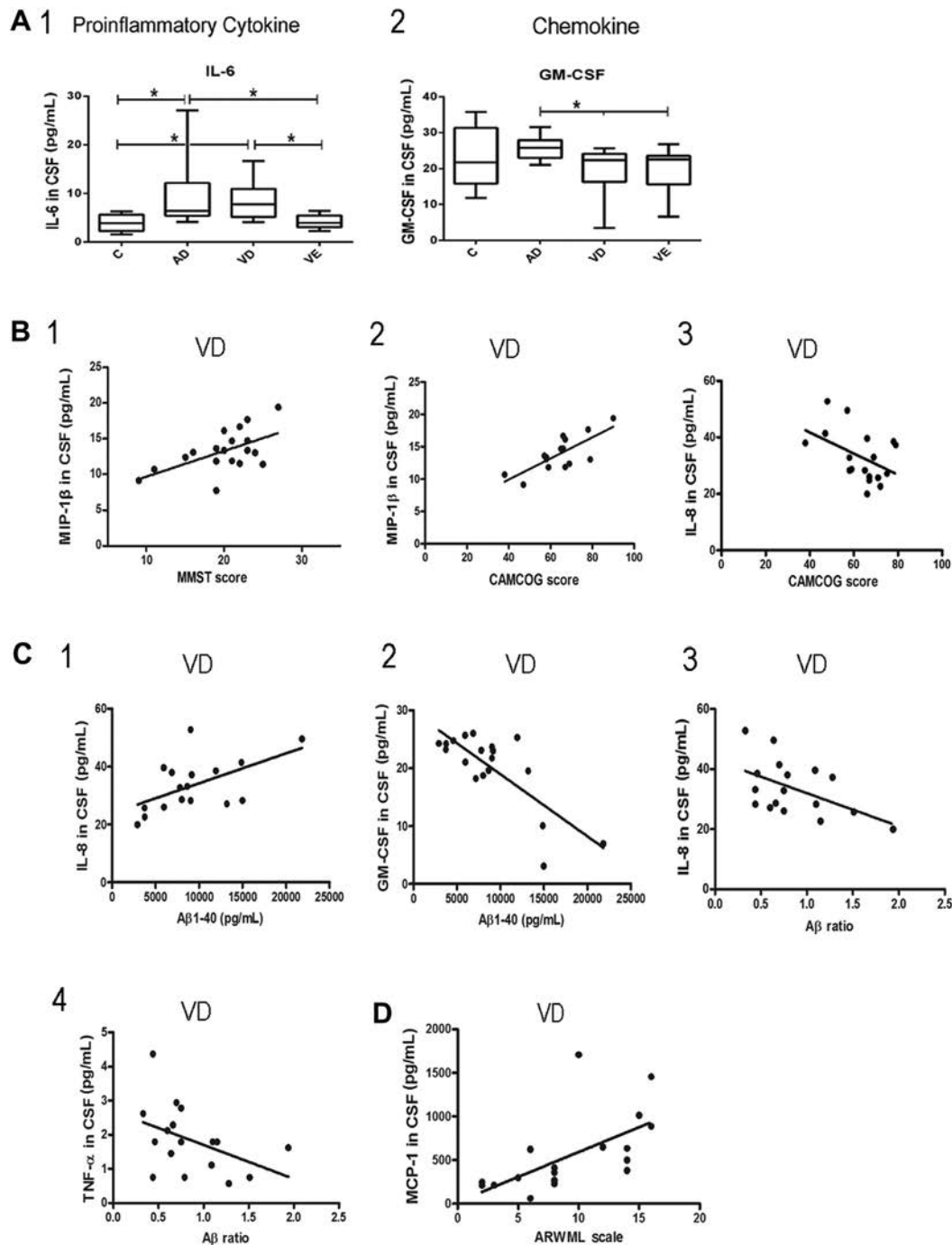
In addition, our study revealed a significant correlation between A $\beta$ 1–40 levels and IL-8 and GM-CSF (graphs 1 and 2 in Fig. 2C) as well as between the A $\beta$ 1–42/1–40 ratio and IL-8 and TNF- $\alpha$  (graphs 3 and 4 in Fig. 2C) indicating an association between inflammation and CSF regulated destruction marker proteins. Finally, we detected a positive correlation between MCP-1 and the age-related white matter lesions (ARWML) score (Fig. 2D). A significant influence of age and body mass index on the cytokine expression could be not observed in serum of the SVE, VD, and VE group (Supplement Fig. 1).

### 3.3. Regulation of PrP<sup>C</sup> levels in VD and VE patients

To investigate a possible role of PrP<sup>C</sup> in VD and VE patients, we measured the concentration of total PrP<sup>C</sup> in CSF and serum samples of both groups in comparison to AD and nondemented control



**Fig. 1.** Different immune responses in serum of VD and VE patients. (A–H) Profiling of cytokines in serum from VD ( $n = 15$ ), VE ( $n = 15$ ), AD ( $n = 37$ ), and control ( $n = 20$ ) patients were performed using the Bio-Plex human cytokine 17-plex Pro assay. (I) In VD patients levels of MIP-1 $\beta$  ( $r = 0.66$ ;  $p < 0.05$ ;  $n = 12$ ) showed a positive correlation with the MMST score (1). In VE patients, IL-13 correlated with the MMST score ( $r = -0.95$ ;  $p < 0.0001$ ;  $n = 7$ ) (2). A  $p$ -value  $< 0.001$  was considered as extremely significant (\*\*\*),  $< 0.01$  as very significant,  $< 0.05$  as significant (\*) and  $\geq 0.05$  as not significant (ns). Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; C, control; G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor; IFN- $\gamma$ , interferon gamma; IL, interleukin; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; MIP-1 $\beta$ , macrophage inflammatory protein 1 beta; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; VD, vascular dementia; VE, vascular encephalopathy.

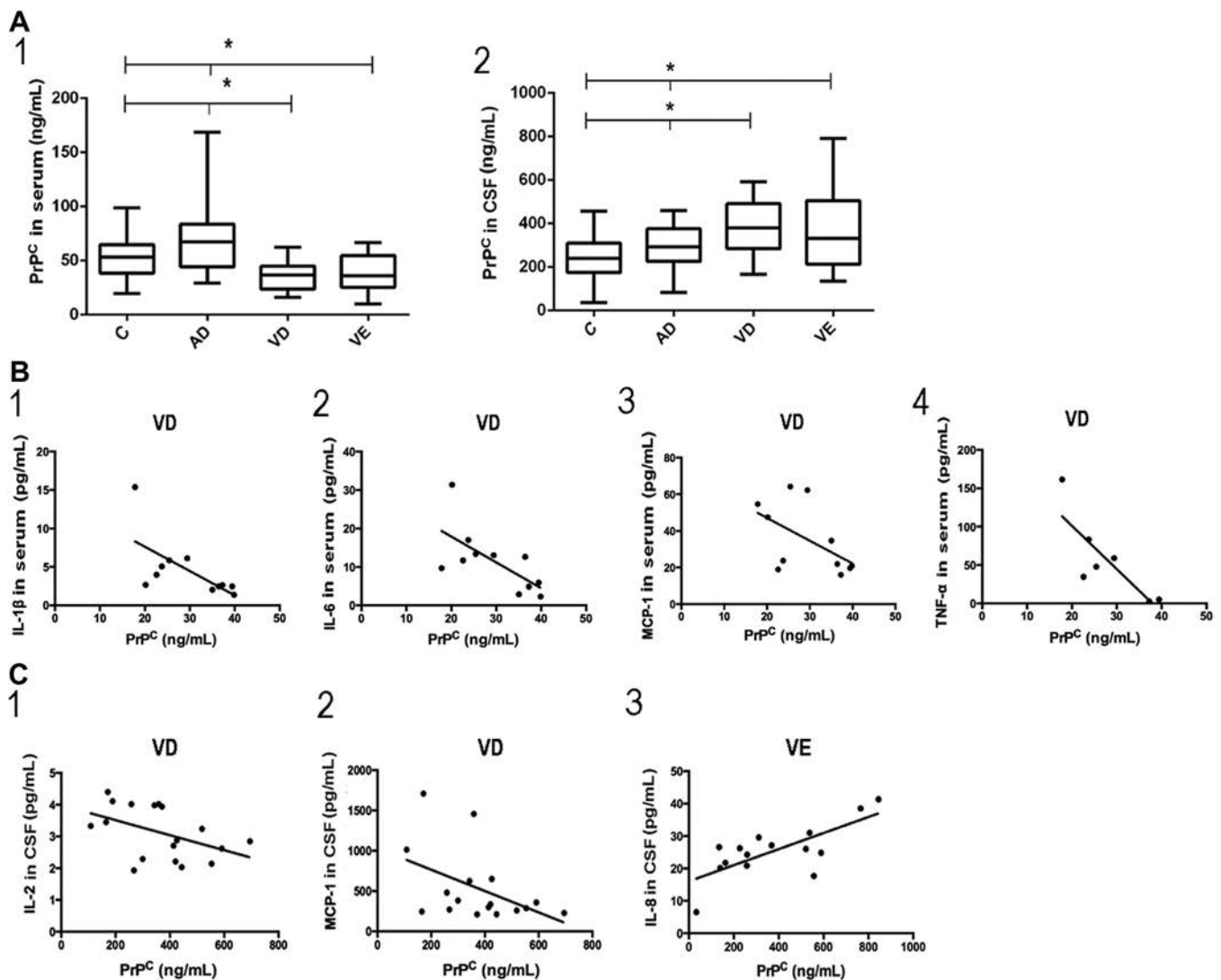


**Fig. 2.** Different immune responses in CSF of VD patients. (A) Profiling of cytokines in CSF from VD ( $n = 15$ ), VE ( $n = 15$ ), AD ( $n = 18$ ), and controls ( $n = 14$ ) were performed by using the Bio-Plex human cytokine 17-plex Pro assay. (A) A significant regulation of IL-6 could be observed in VD- and AD patients (1), while GM-CSF was upregulated in the AD cohort compared with VD and VE patients (2). (B) In VD patients, levels of MIP-1β ( $r = 0.48$ ;  $p < 0.05$ ;  $n = 19$ ) showed a positive correlation with the MMST score (1). The MIP-1β level ( $r = 0.53$ ;  $p < 0.05$ ;  $n = 15$ ) and IL-8 level ( $r = -0.46$ ;  $p < 0.05$ ;  $n = 18$ ) significantly correlated with CAMCOG test score of VD patients (2 and 3). (C) In VD patients, neurodegenerative marker protein Aβ1–40 significantly correlated with IL-8 ( $r = 0.49$ ;  $p = 0.05$ ;  $n = 19$ ) (1) and with GM-CSF ( $r = -0.62$ ;  $p < 0.01$ ;  $n = 19$ ) (2). Aβ1–42/1–40 quotient significantly correlated with IL-8 ( $r = -0.49$ ;  $p < 0.05$ ;  $n = 17$ ) (3) and TNF-α ( $r = -0.48$ ;  $p < 0.05$ ;  $n = 17$ ) (4). (D) The ARWML score correlated with MCP-1 ( $r = 0.64$ ;  $p < 0.01$ ;  $n = 19$ ). Abbreviations: Aβ, amyloid beta; AD, Alzheimer's disease; ARWML, age-related white matter lesions; C, control; CAMCOG, Cambridge Cognitive Examination battery; CSF, cerebrospinal fluid; IL, interleukin; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; MIP-1β, macrophage inflammatory protein 1 beta; TNF-α, tumor necrosis factor alpha; VD, vascular dementia; VE, vascular encephalopathy.

donors. In our patient cohort, an age- and gender-specific effect on the PrP<sup>C</sup> level could not be observed. Our data revealed an opposite regulation of PrP<sup>C</sup>. In serum, PrP<sup>C</sup> levels were significantly decreased in VD and VE patients compared to the other groups (Fig. 3A1), while CSF from VD and VE patients contained a higher PrP<sup>C</sup> level than CSF from AD patients or controls (Fig. 3A2).

#### 3.4. Correlation between levels of PrP<sup>C</sup> and immune markers in CSF and serum

To investigate a possible involvement of PrP<sup>C</sup> in the immune responses of VD and VE patients, we correlated the level of PrP<sup>C</sup> with cytokine levels in serum and CSF.



**Fig. 3.** Regulation of PrP<sup>C</sup> levels in serum and CSF from VD and VE patients. (A) Concentration of PrP<sup>C</sup> in serum and CSF was determined by a quantitative PrP assay based on the Luminex xMAP technology. (A1) In serum, VD (n = 20) and VE (n = 20) patients exhibited a significantly decreased PrP<sup>C</sup> concentration as compared with nondemented controls (n = 18) and AD patients (n = 18). (A, 2) In CSF, VD (n = 30) and VE patients (n = 23) exhibited a significantly increased PrP<sup>C</sup> concentration as compared with nondemented controls (n = 18) and AD patients (n = 18). No significant differences could be observed between controls and AD. (B1–4) Concentration of cytokine levels in serum were correlated with the PrP<sup>C</sup> expression in VD patients. A negative correlation with IL-1 $\beta$  ( $r = -0.75$ ;  $p < 0.01$ ; n = 11), IL-6 ( $r = -0.64$ ;  $p < 0.05$ , n = 11), MCP-1 ( $r = -0.73$ ;  $p = 0.05$ ; n = 10), and TNF- $\alpha$  ( $r = -0.89$ ;  $p < 0.05$ ; n = 10) indicates an inhibition of the peripheral immune response by PrP<sup>C</sup>. (C1–3) In CSF, cytokines levels IL-2 ( $r = -0.46$ ;  $p < 0.05$ ; n = 18) and MCP-1 ( $r = -0.47$ ;  $p < 0.05$ ; n = 17) correlated negatively to the PrP<sup>C</sup> concentration in VD patients. VE patients showed a positive correlation between PrP<sup>C</sup> and IL-8 ( $r = 0.55$ ,  $p < 0.05$ ; n = 15). Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; C, control; CSF, cerebrospinal fluid; IL, interleukin; MCP-1, monocyte chemotactic protein 1; PrP<sup>C</sup>, cellular prion protein; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha; VD, vascular dementia; VE, vascular encephalopathy.

In VD serum, we found a negative correlation between PrP<sup>C</sup> concentration and the cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, and TNF- $\alpha$  (graphs 1–4 in Fig. 3B), while in CSF of these patients IL-2 and MCP-1 negatively correlated with PrP<sup>C</sup> (graphs 1 and 2 in Fig. 3C).

In CSF of VE patients our data indicated a positive correlation of PrP<sup>C</sup> with IL-8 (graph 3 in Fig. 3C).

### 3.5. Correlation between PrP<sup>C</sup> and total tau, p-tau, amyloid beta expression in CSF

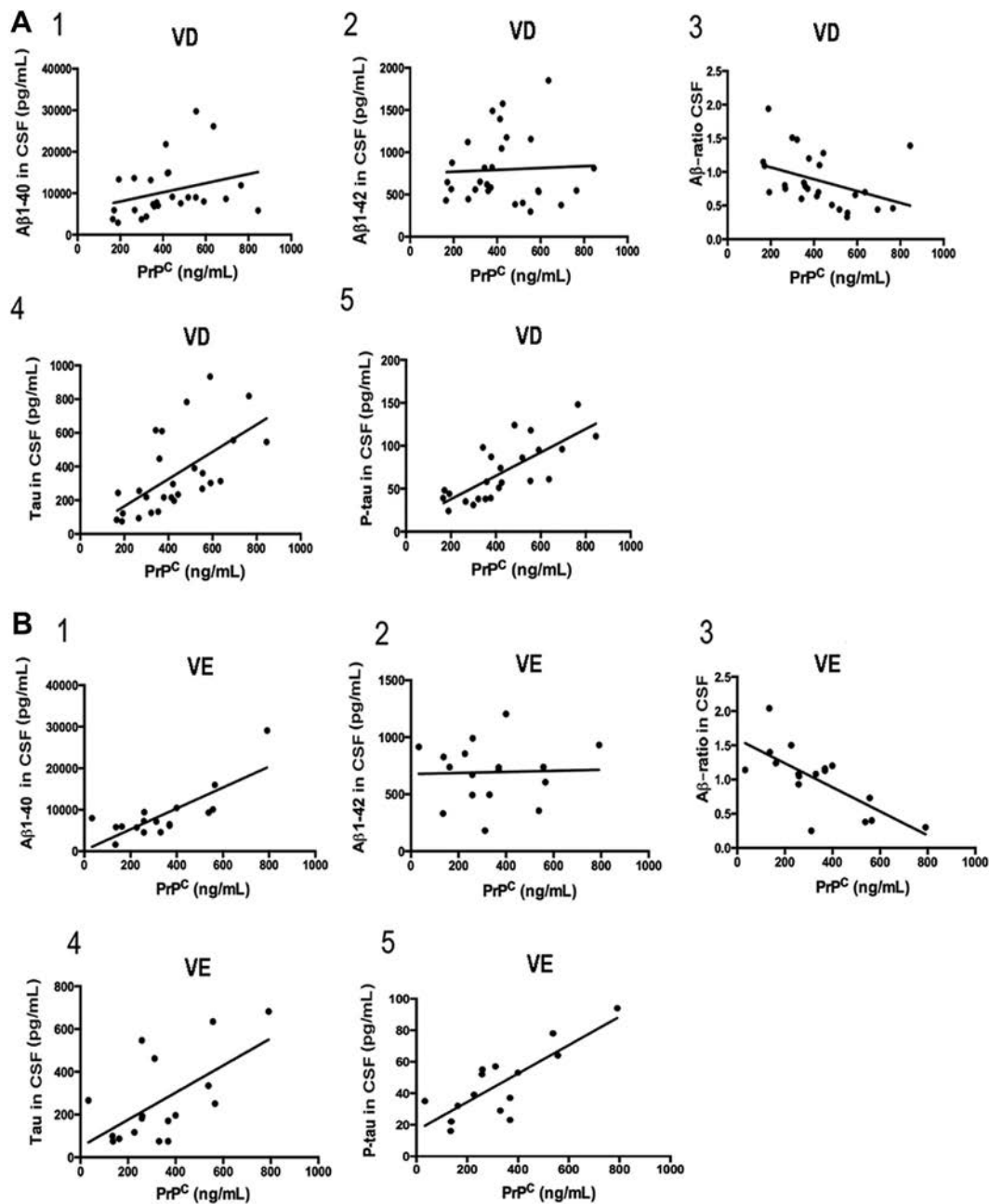
Levels of neurodegenerative markers (tau, p-tau, A $\beta$ 1–40, and 1–42) were determined by ELISA in CSF. Statistical analysis revealed a marked elevation of tau and p-tau levels in CSF of AD patients (Supplement Fig. 2A–B). The concentration of A $\beta$ 1–42 was significantly decreased in AD patients compared to VD and VE patients, while A $\beta$ 1–40 remained unchanged (Supplement Fig. 2C–D). No

significant difference in tau, p-tau, A $\beta$ 1–40, and 1–42 levels could be detected between VD and VE patients (Supplement Fig. 2A–D) indicating no AD copathology in the VD group.

We found a positive correlation between CSF-PrP<sup>C</sup> levels and A $\beta$ 1–40, tau, and p-tau in VD patients, while the A $\beta$  ratio was negatively correlated with PrP<sup>C</sup> (graphs 1, 3–5 in Fig. 4A). No correlation was obtained between PrP<sup>C</sup> and A $\beta$ 1–42 level (graph 2 in Fig. 4A). In VE patients, we made a similar observation. CSF-PrP<sup>C</sup> levels positively correlated with A $\beta$ 1–40, tau, and p-tau levels, while the A $\beta$  ratio was negatively correlated with PrP<sup>C</sup> (graphs 1, 3–5 in Fig. 4B). No correlation was obtained also in VE patients between PrP<sup>C</sup> and A $\beta$ 1–42 level (graph 2 in Fig. 4B).

## 4. Discussion

Cytokines are fundamental regulators of inflammatory processes and may be necessary for protection of tissue from damage



**Fig. 4.** Correlation of PrP<sup>C</sup> levels in CSF of VD and VE patients with neurodegenerative markers. (A) In VD patients, a positive correlation was observed between the PrP<sup>C</sup> level and the Aβ<sub>1-40</sub> ( $r = 0.42$ ;  $p < 0.05$ ;  $n = 26$ ), tau ( $r = 0.68$ ;  $p < 0.0001$ ;  $n = 27$ ) and p-tau level ( $r = 0.77$ ;  $p < 0.0001$ ;  $n = 24$ ) (1, 4, and 5), while PrP<sup>C</sup> concentration correlated negatively to the Aβ<sub>1-40/1-42</sub> ratio ( $r = -0.51$ ;  $p < 0.007$ ;  $n = 26$ ) (3). No correlation was detected between PrP<sup>C</sup> and Aβ<sub>1-42</sub> levels (2). (B) In VE patients a positive correlation was observed between the PrP<sup>C</sup> level and the Aβ<sub>1-40</sub> ( $r = 0.68$ ;  $p < 0.01$ ;  $n = 17$ ), tau ( $r = 0.48$ ;  $p < 0.05$ ;  $n = 17$ ), and p-tau level ( $r = 0.68$ ;  $p < 0.001$ ;  $n = 15$ ) (1, 4, and 5), while PrP<sup>C</sup> concentration correlated negatively to the Aβ<sub>1-40/1-42</sub> ratio ( $r = -0.67$ ;  $p < 0.01$ ;  $n = 17$ ) (3). No correlation was detected between PrP<sup>C</sup> with Aβ<sub>1-42</sub> levels (2). Abbreviations: Aβ, amyloid beta; CSF, cerebrospinal fluid; PrP<sup>C</sup>, cellular prion protein; VD, vascular dementia; VE, vascular encephalopathy.

and for tissue restoration. Our hypothesis is that an activation of the immune system may have a relevant influence on or results as a consequence from the neurodegenerative process in VD or VE patients. Because limited data are available on the role of inflammation in VD and VE patients, we performed comparative immunological profiling of a statistically powerful number of well-characterized serum and CSF samples from VD and VE patients. Patients with tumor, acute ischemia, chronic territorial infarction, or central nervous system inflammation were excluded, as these could have affected the cytokine production and release (Tazaki et al., 2011).

#### 4.1. Altered immunological responses in serum of patients with VD and VE

Inflammatory mechanisms involved in the pathogenetic cascade in VD or VE patients are currently not well understood. Therefore, the importance of inflammation in the pathogenesis is still debated. Several studies report that inflammatory mechanisms may be involved in the development of cognitive decline and the pathophysiology of brain (Stoeck et al., 2014). In the present study, we investigated the expression of a panel of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as well as 3 chemokines in serum and CSF



samples of patients with VD and VE. The subdivision of SVE patients into 2 subgroups, the VD group and VE group, provides evidence about the potential impact of dementia on the cytokine profile.

In serum of VD and VE patients, we observed a significantly increased level of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), as well as of 2 anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-5) and 1 chemokine (G-CSF) as compared with AD patients and control donors without neurodegenerative dementia. Interestingly, levels of the chemokines MCP-1 and MIP-1 $\beta$  were significantly decreased in VD- and VE patients when compared with AD patients.

A comparison between the VD and VE group revealed that the expression of cytokines in serum depended rather on the severity of vascular lesions than on the dementia severity as measured by neuropsychological assessment.

We hypothesize on the cytokine regulation as follows:

Among the proinflammatory cytokines, which may trigger or accelerate ongoing neurodegeneration (Cunningham et al., 2009), IL-1 $\beta$  plays a major role in chronic neuroinflammation. It is secreted by reactive microglia (Teixeira et al., 2008). The expression of IL-1 $\beta$  was shown to be elevated in patients with mild cognitive impairment and AD (Alvarez et al., 1996), which is in-line with our findings. Moreover, IL-1 may be involved in brain injury after cerebral ischemia because mice deficient in IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$  or IL-1R1 had less brain damage after focal cerebral ischemia (Schielke et al., 1998).

The expression of IFN- $\gamma$ , produced by phagocytic cells (monocytes, macrophages, and neutrophils), dendritic cells and activated natural killer cells, was enhanced in VD and VE patients, indicating an increased immune response.

TNF- $\alpha$  is produced by activated microglial cells, mainly in response to A $\beta$ 1–40/1–42 as well as to oxidative stress (Lee et al., 2009). Dysregulation of TNF- $\alpha$  production has been implicated in a variety of human diseases, including AD (Lee et al., 2009). Although still controversial, studies showed that serum levels of TNF- $\alpha$  are lower in patients with mild AD compared with patients with severe AD and VD, suggesting disease stage dependent differences (Paganelli et al., 2002). Interestingly, levels of TNF- $\alpha$  have been correlated with cardiovascular diseases, markers of systemic atherosclerosis (characterized by ankle-brachial index and intima-media thickness), diabetes, and dyslipidemia (Krabbe et al., 2004), which are known to be frequent in vascular diseases and may explain an elevation in our VD and VE cohort.

The anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-5 belong to the group of Th2 cytokines and may act as immunosuppressors. We found these immunosuppressors elevated in the VD and VE group suggesting that both cytokines may contribute to a reduction of the disease. In case of IL-4, the upregulation might be linked to inflammation by antagonizing the proinflammatory activity of IL-1 $\beta$  (Lee et al., 2009).

Chemokines, which are chemotactic cytokines, are essential for the activation and migration of leucocytes, the proliferation and differentiation of progenitor cells as well as the regulation of the infiltration and activation of immune cells (Stuart and Baune, 2014). A significantly decreased level of chemokines (MCP-1, MIP-1 $\beta$ ) in serum of VD and VE patients suggests an implication of these chemokine in vascular lesions which may be relevant to the pathogenesis and pathophysiology (Stuart and Baune, 2014). Previous studies showed that MCP-1 and MIP-1 $\beta$  are expressed in atherosclerotic plaques (Wilcox et al., 1994) and implicated in atherosclerotic lesion formation (Reape and Groot, 1999).

G-CSF is a glycoprotein known to promote neuroprotection under ischemic conditions, as well as neurogenesis (Lu and Xiao, 2007). In serum of VD and VE patients, its level was upregulated with the

potential to enhance neuroplasticity leading to functional recovery even at long intervals after stroke (Sevimli et al., 2009).

Elucidation of the role of cytokines in dementia diseases requires further intensive investigation. Until now the cytokine levels reported in dementia diseases by different publications varied widely, which can be explained by the short–half lives of cytokines after release and their binding to other molecules which prevent their detection (De Luigi et al., 2002).

To sum up, we observed in the group of VD and VE patients differential immunological responses compared with the AD and the control group. However, both VD and VE subgroups were not distinguishable by the immune markers which indicates that the immune profiles depends more on vascular lesions than on the grade of dementia.

#### 4.2. Immunological responses in CSF of patients with VD and VE

In CSF, we could not find the same expression pattern as in serum. The only abnormalities revealed an increased level of IL-6 in VD and AD patients as compared with VE and control patients, indicating rather an association between IL-6 and the grade of dementia in VD patients than on vascular lesions which are also present in VE patients. This observation is supported by others (Blum-Degen et al., 1995). It has been proposed that IL-6 may play an important role in the development of cognitive decline (Stoek et al., 2014; Wada-Isoe et al., 2004).

The amount of GM-CSF was observed to be higher in AD patients than in VD and VE patients, as reported in a previous study (Marques et al., 2013). Elevated GM-CSF level might be an indicator of gliosis, which can be found in the brains of AD patients (Marques et al., 2013).

#### 4.3. Association of immune markers with cognitive impairment in VD patients

To investigate a potential association between inflammatory markers and cognition, we correlated the levels of cytokines with the neuropsychological test scores (MMST or CAMCOG test) as well as neurodegenerative biomarkers. Potential age- and gender-dependent effects were minimized by the balanced composition of our patient groups (see Section 2).

In serum and in CSF of VD patients, we observed an association of dementia severity and the expression of MIP-1 $\beta$ , likely reflecting the severity of the disease pathology.

Furthermore, markers of neurodegeneration are the dementia markers A $\beta$ 1–40, A $\beta$ 1–42, total tau, and p-tau. Our correlation analysis indicated an association of these dementia markers with different types of immune markers. In CSF of VD patients, we found significant correlations of A $\beta$ 1–40 and the A $\beta$  ratio with the chemokines IL-8, GM-CSF (upregulated in AD CSF) and the cytokine TNF- $\alpha$ . The chemokine MCP-1 correlated with ARWML scale, an indicator of vascular lesion in the MRI, in VD patients.

We interpreted these findings as potential association between neuroinflammation and cognitive decline. In dementia patients, previous studies have already provided evidence for an involvement of the neuroinflammation process and cognitive decline (Rubio-Perez and Morillas-Ruiz, 2012). In mice, after induction of systemic inflammation (elevated IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  levels), cognitive decline and motor symptoms could be observed, which are associated with an accelerated progression of neurodegeneration (Cunningham et al., 2009).

However, the exact role and the molecular mechanism how a neuroinflammation influences the cognitive status remains elusive.

#### 4.4. Correlation of PrP<sup>C</sup> expression with immune and neurodegenerative markers in VD and VE patients

Atherosclerotic processes in symptomatic diseases are a result of inflammation concomitant with macrophage and T-cell infiltration in the plaque. PrP<sup>C</sup> is abundantly expressed in different cell types of the immune system, such as mononuclear cells and B lymphocytes (Barclay et al., 1999; Brown et al., 2000) or on the surface of endothelial cells (Starke et al., 2002, 2003). Chronic inflammation can increase the expression of PrP<sup>C</sup> (Konturek et al., 2005), which may be a possible consequence of proinflammatory cytokine expression such as TNF- $\alpha$ , which is known to upregulate PrP<sup>C</sup> (Sauer et al., 2003).

Previous studies have already reported that PrP<sup>C</sup> may play an important role in the programming of T-cell cytokine responses (Ingram et al., 2009) and that PrP<sup>C</sup> becomes upregulated after focal cerebral ischemia, thus exhibiting neuroprotection against oxidative stress (McLennan et al., 2004).

Measuring the concentration of PrP<sup>C</sup> in the CSF and serum of VD and VE patients, we found an increase of PrP<sup>C</sup> level in CSF, whereas serum PrP<sup>C</sup> concentration was decreased when compared with control groups, suggesting a possible role of PrP<sup>C</sup> in vascular diseases.

To examine if there is a connection between PrP<sup>C</sup>, the immune response, and neurodegeneration, we correlated the level of PrP<sup>C</sup> with immune marker and neurodegenerative marker proteins.

In VD patients, the level of 6 immune markers (IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  in serum; IL-2, and MCP-1 in CSF) correlated negatively with the level of PrP<sup>C</sup>. In contrast, we observed in VE patients that only IL-8 was positively correlated with PrP<sup>C</sup> expression, indicating that PrP<sup>C</sup> is to a greater extent associated with the immune response in VD patients. However, the reasons are not well understood. Previous studies suggest that PrP<sup>C</sup> has an important immune-modulatory function (Linden et al., 2008), in particular related to T cells and Th cells (Th1, Th2, and Th17 cytokines) (Ingram et al., 2009). Moreover, a depletion of PrP<sup>C</sup> is accompanied by an activation of T cells, an increased T-cell receptor signaling and survival (Hu et al., 2010), and a marked worsening of clinical autoimmune encephalopathies, whereas overexpression of PrP<sup>C</sup> resulted in a diminished autoimmunity in mice (Hu et al., 2010). In humans, data about a direct modulation of the immune response by PrP<sup>C</sup> are still lacking and also the physiological mechanism is not clear.

Subsequently, we examined potential correlations between the expression of PrP<sup>C</sup> and neurodegenerative markers because PrP<sup>C</sup> had been described as a neuroprotective protein in particular under oxidative stress conditions (Weise et al., 2004, 2006). Interestingly, our analysis revealed a positive correlation between the amount of PrP<sup>C</sup> and A $\beta$ 1–40, tau and p-tau, and a negative correlation between PrP<sup>C</sup> and the ratio of A $\beta$ 1–42/1–40 in both SVE subgroups, VD and VE.

We concluded that, the expression of PrP<sup>C</sup> may be connected with neurodegenerative marker proteins and probably also with neurodegeneration. In the literature, PrP<sup>C</sup> had been described to exert a neuroprotective function under ischemic stress conditions because infarct volumes are increased in PrP knock out mice. Moreover, an involvement of PrP<sup>C</sup> in amyloid precursor protein processing and A $\beta$  metabolism had been reported by several groups (Parkin et al., 2007; Schmitz et al., 2014b).

In conclusion, our data revealed characteristic immune inflammatory profiles in VD and VE patients, suggesting that vascular lesions may be accompanied by an activation of the immune system. Correlations between cytokine levels and the cognitive status of VD patients indicate an important association of inflammation and cognitive decline. Finally, our data suggest that PrP<sup>C</sup> may be associated with the cellular immunological homeostasis and it seems to be involved in neurodegenerative processes after hypoxic-ischemic injury in VD and VE patients.

#### Disclosure statement

The authors have no conflicts of interest to disclose.

#### Acknowledgements

The work was supported by the following grants from the European Commission: protecting the food chain from prions: shaping European priorities through basic and applied research (PRIORITY, N222887) project number: FP7-KBBE-2007-2A, and Neurodegenerative Disease Research (JPND–DEMTEST [biomarker based diagnosis of rapid progressive dementias-optimization of diagnostic protocols, 01ED1201A]) as well as from the Alzheimer-Forschungs-Initiative e.V. (AFI 12851). This study was funded by the Federal Ministry of Education and Research (Stadiumabhängige biochemische, klinische und bildgebende Charakterisierung der Demenz vom Alzheimer Typ und der Vaskulären Demenz, grant no. 01DJ13023).

Moreover, we obtained funding from the Bundesministerium für Bildung und Forschung within the German Network for Degenerative Dementia (KNDD-2, 2012–2015, determinants for disease progression in AD, grant No.01GI1010C). arroyo572.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.05.013>.

#### References

- Alvarez, X.A., Franco, A., Fernández-Novoa, L., Cacabelos, R., 1996. Blood levels of histamine, IL-1 beta, and TNF-alpha in patients with mild to moderate Alzheimer disease. *Mol. Chem. Neurobiol.* 29, 237–252.
- Barclay, G.R., Hope, J., Birkett, C.R., Turner, M.L., 1999. Distribution of cell-associated prion protein in normal adult blood determined by flow cytometry. *Br. J. Haematol.* 107, 804–814.
- Baezner, H., Daffertshofer, M., 2003. Subcortical vascular encephalopathy. *Ther. Umsch.* 60, 541–552.
- Blum-Degen, D., Müller, T., Kuhn, W., Gerlach, M., Purzunk, H., Riederer, P., 1995. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci. Lett.* 202, 17–20.
- Brown, K.L., Ritchie, D.L., McBride, P.A., Bruce, M.E., 2000. Detection of PrP in extraneural tissues. *Microsc. Res. Tech.* 50, 40–45.
- Cacquevel, M., Lebourrier, N., Chéenne, S., Vivien, D., 2004. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Curr. Drug Targets* 5, 529–534.
- Cunningham, C., Campion, S., Lunnon, K., Murray, C.L., Woods, J.F., Deacon, R.M., Rawlins, J.N., Perry, V.H., 2009. Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease. *Biol. Psychiatry* 65, 304–312.
- De Luigi, A., Pizzimenti, S., Quadri, P., Lucca, U., Tettamanti, M., Fragiaco, C., De Simoni, M.G., 2002. Peripheral inflammatory response in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Neurobiol. Dis.* 11, 308–314.
- De Simoni, M.G., Del Bo, R., De Luigi, A., Simard, S., Forloni, G., 1995. Central endotoxin induces different patterns of interleukin (IL)-1 beta and IL-6 messenger ribonucleic acid expression and IL-6 secretion in the brain and periphery. *Endocrinology* 136, 897–902.
- Di Bona, D., Plaia, A., Vasto, S., Cavallone, L., Lescai, F., Franceschi, C., Licastro, F., Colonna-Romano, G., Lio, D., Candore, G., Caruso, C., 2008. Association between the interleukin-1 beta polymorphisms and Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Brain Res. Rev.* 59, 155–163.
- Durig, J., Giese, A., Schulz-Schaeffer, W., Rosenthal, C., Schmucker, U., Bieschke, J., Dührsen, U., Kretschmar, H.A., 2000. Differential constitutive and activation-dependent expression of prion protein in human peripheral blood leucocytes. *Br. J. Haematol.* 108, 488–495.
- Hu, W., Nessler, S., Hemmer, B., Eagar, T.N., Kane, L.P., Leliveld, S.R., Müller-Schiffmann, A., Gocke, A.R., Lovett-Racke, A., Ben, L.H., Hussain, R.Z., Breil, A., Elliott, J.L., Puttapparthi, K., Cravens, P.D., Singh, M.P., Petsch, B., Stitz, L., Racke, M.K., Korth, C., Stüve, O., 2010. Pharmacological prion protein silencing accelerates central nervous system autoimmune disease via T cell receptor signalling. *Brain* 133, 375–388.
- Iadecola, C., 2010. The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta Neuropathol.* 120, 287–296.

- Ingram, R.J., Isaacs, J.D., Kaur, G., Lowther, D.E., Reynolds, C.J., Boyton, R.J., Collinge, J., Jackson, G.S., Altmann, D.M., 2009. A role of cellular prion protein in programming T-cell cytokine responses in disease. *FASEB J.* 23, 1672–1684.
- Konturek, P.C., Bazela, K., Kukharsky, V., Bauer, M., Hahn, E.G., Schuppan, D., 2005. *Helicobacter pylori* up regulates prion protein expression in gastric mucosa: a possible link to prion disease. *World J. Gastroenterol.* 11, 7651–7656.
- Krabbe, K.S., Pedersen, M., Bruunsgaard, H., 2004. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp. Gerontol.* 39, 687–699.
- Lee, K.S., Chung, J.H., Choi, T.K., Suh, S.Y., Oh, B.H., Hong, C.H., 2009. Peripheral cytokines and chemokines in Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 28, 281–287.
- Linden, R., Martins, V.R., Prado, M.A., Cammarota, M., Izquierdo, I., Brentani, R.R., 2008. Physiology of the prion protein. *Physiol. Rev.* 88, 673–728.
- Lu, C.Z., Xiao, B.G., 2007. Neuroprotection of G-CSF in cerebral ischemia. *Front. Biosci.* 12, 2869–2875.
- Marques, F., Sousa, J.C., Sousa, N., Palha, J.A., 2013. Blood-brain-barriers in aging and in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 8, 38.
- Mattei, V., Garofalo, T., Misasi, R., Circella, A., Manganello, V., Lucania, G., Pavan, A., Sorice, M., 2004. Prion protein is a component of the multimolecular signaling complex involved in T cell activation. *FEBS Lett.* 560, 14–18.
- McKhann, G.M., Knopman, D.S., Chertkow, H., Hyman, B.T., Jack Jr., C.R., Kawas, C.H., Klunk, W.E., Koroshetz, W.J., Manly, J.J., Mayeux, R., Mohs, R.C., Morris, J.C., Rossor, M.N., Scheltens, P., Carrillo, M.C., Thies, B., Weintraub, S., Phelps, C.H., 2011. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7, 263–269.
- McLennan, N.F., Brennan, P.M., McNeill, A., Davies, I., Fotheringham, A., Rennison, K.A., Ritchie, D., Brannan, F., Head, M.W., Ironside, J.W., Williams, A., Bell, J.E., 2004. Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. *Am. J. Pathol.* 165, 227–235.
- Moorhouse, P., Rockwood, K., 2008. Vascular cognitive impairment: current concepts and clinical developments. *Lancet Neurol.* 7, 246–255.
- Paganelli, R., Di Iorio, A., Patricelli, L., Ripani, F., Sparvieri, E., Faricelli, R., Iarlori, C., Porreca, E., Di Gioacchino, M., Abate, G., 2002. Prioninflammatory cytokines in sera of elderly patients with dementia: levels in vascular injury are higher than those of mild-moderate Alzheimer's disease patients. *Exp. Gerontol.* 37, 257–263.
- Parkin, E.T., Watt, N.T., Hussain, I., Eckman, E.A., Eckman, C.B., Manson, J.C., Baybutt, H.N., Turner, A.J., Hooper, N.M., 2007. Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11062–11067.
- Peters, P.J., Mironov, A.J., Peretz, D., van Donselaar, E., Leclerc, E., Erpel, S., DeArmond, S.J., Burton, D.R., Williamson, R.A., Vey, M., Prusiner, S.B., 2003. Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J. Cell Biol.* 162, 703–717.
- Reape, T.J., Groot, P.H., 1999. Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 147, 213–225.
- Roth, M., Tym, E., Mountjoy, C.Q., Huppert, F.A., Hendrie, H., Verma, S., Goddard, R., 1986. CAMDEX. A standardised instrument for the diagnosis of mental disorder in the elderly with special reference to the early detection of dementia. *Br. J. Psychiatry* 149, 698–709.
- Rubio-Perez, J.M., Morillas-Ruiz, J.M., 2012. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *Scientific World Journal* 2012, 756357.
- Sauer, H., Wefer, K., Vetrugno, V., Pocchiari, M., Gissel, C., Sachinidis, A., Hescheler, J., Wartenberg, M., 2003. Regulation of intrinsic prion protein by growth factors and TNF-alpha: the role of intracellular reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 586–594.
- Schielke, G.P., Yang, G.Y., Shivers, B.D., Betz, A.L., 1998. Reduced ischemic brain injury in interleukin-1 beta converting enzyme-deficient mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18, 180–185.
- Schmitz, M., Klöppner, S., Klopffleisch, S., Möbius, W., Schwartz, P., Zerr, I., Althaus, H.H., 2010a. Mutual effects of caveolin and nerve growth factor signaling in pig oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.* 88, 572–588.
- Schmitz, M., Lüllmann, K., Zafar, S., Ebert, E., Wohlhage, M., Oikonomou, P., Schlomm, M., Mitrova, E., Beekes, M., Zerr, I., 2014a. Association of prion protein genotype and scrapie prion protein type with cellular prion protein charge isoform profiles in cerebrospinal fluid of humans with sporadic familial prion diseases. *Neurobiol. Aging* 35, 1177–1188.
- Schmitz, M., Schlomm, M., Hasan, B., Beekes, M., Mitrova, E., Korth, C., Breil, A., Carimalo, J., Gawinecka, J., Vargas, D., Zerr, I., 2010b. Codon 129 polymorphism and the E200K mutation do not affect the cellular prion protein isoform composition in the cerebrospinal fluid from patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Eur. J. Neurosci.* 31, 2024–2031.
- Schmitz, M., Signore, S.C., Zerr, I., Althaus, H.H., 2013. Oligodendroglial process formation is differentially affected by modulating the intra- and extracellular cholesterol content. *J. Mol. Neurosci.* 49, 457–469.
- Schmitz, M., Wulf, K., Signore, S.C., Schulz-Schaeffer, W., Kermer, P., Bähr, M., Wouters, F.S., Zafar, S., Zerr, I., 2014b. Impact of the cellular prion protein on amyloid- $\beta$  and 3PO-tau processing. *J. Alzheimers Dis.* 38, 551–565.
- Sevimli, S., Diederich, K., Strecker, J.K., Schilling, M., Klocke, R., Nikol, S., Kirsch, F., Schneider, A., Schäbitz, W.R., 2009. Endogenous brain protection by granulocyte-colony stimulating factor after ischemic stroke. *Exp. Neurol.* 217, 328–335.
- Starke, R., Drummond, O., MacGregor, I., Biggersta, V.J., Gale, R., Camilleri, R., Mackie, I., Machin, S., Harrison, P., 2002. The expression of prion protein by endothelial cells: a source of the plasma form of prion protein? *Br. J. Haematol.* 119, 863–873.
- Starke, R., Harrison, P., Gale, R., Mackie, I., Drummond, O., MacGregor, I., Machin, S., 2003. Endothelial cells express normal cellular prion protein. *Br. J. Haematol.* 123, 372–373.
- Stoeck, K., Schmitz, M., Ebert, E., Schmidt, C., Zerr, I., 2014. Immune responses in rapidly progressive dementia: a comparative study of neuroinflammatory markers in Creutzfeldt-Jakob disease, Alzheimer's disease and multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation* 11, 170.
- Stuart, M.J., Baune, B.T., 2014. Chemokines and chemokine receptors in mood disorders, schizophrenia, and cognitive impairment: a systematic review of biomarker studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 42, 93–115.
- Tarkowski, E., Liljeroth, A.M., Minthon, L., Tarkowski, A., Wallin, A., Blennow, K., 2003. Cerebral pattern of pro- and anti-inflammatory cytokines in dementias. *Brain Res. Bull.* 61, 255–260.
- Tazaki, E., Shimizu, N., Tanaka, R., Yoshizumi, M., Kamma, H., Imoto, S., Mukhamedyarov, M.A., Zefirov, A.L., Janka, Z., Palotás, A., 2011. Serum cytokine profiles in patients with prostate carcinoma. *Exp. Ther. Med.* 2, 887–891.
- Teixeira, A.L., Reis, H.J., Coelho, F.M., Carneiro, D.S., Teixeira, M.M., Vieira, L.B., Mukhamedyarov, M.A., Zefirov, A.L., Janka, Z., Palotás, A., 2008. All or nothing type biphasic cytokine production of human lymphocytes after exposure to Alzheimer's beta-amyloid peptide. *Biol. Psychiatry* 64, 891–895.
- Wada-Isoe, K., Wakutani, Y., Urakami, K., Nakashima, K., 2004. Elevated interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid of vascular dementia patients. *Acta Neurol. Scand.* 110, 124–127.
- Wahlund, L.O., Barkhof, F., Fazekas, F., Bronge, L., Augustin, M., Sjögren, M., Wallin, A., Ader, H., Leys, D., Pantoni, L., Pasquier, F., Erkinjuntti, T., Scheltens, P., 2001. A new rating scale for age-related white matter changes applicable to MRI and CT. *Stroke* 32, 1318–1322.
- Weise, J., Crome, O., Sandau, R., Schulz-Schaeffer, W., Bähr, M., Zerr, I., 2004. Upregulation of cellular prion protein (PrPc) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. *Neurosci. Lett.* 372, 146–150.
- Weise, J., Sandau, R., Schwarting, S., Crome, O., Wrede, A., Schulz-Schaeffer, W., Zerr, I., Bähr, M., 2006. Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* 37, 1296–1300.
- Wilcox, J.N., Nelken, N.A., Coughlin, S.R., Gordon, D., Schall, T.J., 1994. Local expression of inflammatory cytokines in human atherosclerotic plaques. *J. Atheroscler. Thromb.* 1 (Suppl 1), S3–S10.



### 6.2.1. Supplemental Data

**Tabelle 16:** Supplementary Fig. 1.: Analysis of potential influence of age, BMI, ARWML and MMST on the cytokine profile in serum of SVE, VD, and VE patients. Abbreviations: BMI, body mass index; SVE, subcortical vascular encephalopathy; VD, vascular dementia; VE, vascular encephalopathy.

| SVE                            | Age   |      | BMI   |      | ARWML |      | MMST  |      |
|--------------------------------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
|                                | r     | p    | r     | p    | r     | p    | r     | p    |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | -0.23 | 0.32 | 0.28  | 0.28 | -0.09 | 0.70 | 0.31  | 0.18 |
| <b>IL-4</b>                    | -0.08 | 0.76 | 0.54  | 0.04 | -0.15 | 0.54 | 0.23  | 0.35 |
| <b>IL-5</b>                    | 0.05  | 0.84 | 0.43  | 0.10 | -0.22 | 0.34 | 0.27  | 0.26 |
| <b>IL-6</b>                    | 0.20  | 0.40 | 0.30  | 0.26 | -0.18 | 0.46 | 0.17  | 0.49 |
| <b>IL-7</b>                    | -0.25 | 0.29 | 0.26  | 0.33 | -0.22 | 0.36 | 0.31  | 0.19 |
| <b>IL-8</b>                    | 0.18  | 0.45 | 0.35  | 0.18 | -0.33 | 0.15 | 0.29  | 0.21 |
| <b>IL-12(p70)</b>              | 0.02  | 0.94 | 0.00  | 0.97 | 0.02  | 0.94 | -0.01 | 0.95 |
| <b>IL-13</b>                   | -0.16 | 0.53 | -0.21 | 0.47 | -0.08 | 0.76 | 0.06  | 0.84 |
| <b>IL-17</b>                   | 1.00  | 0.08 | -0.50 | 0.99 | 0.95  | 0.17 | -1.00 | 0.08 |
| <b>G-CSF</b>                   | -0.05 | 0.83 | 0.50  | 0.06 | -0.25 | 0.31 | 0.35  | 0.15 |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | -0.14 | 0.56 | 0.13  | 0.63 | -0.02 | 0.92 | 0.23  | 0.32 |
| <b>MCP-1</b>                   | -0.45 | 0.06 | 0.09  | 0.75 | 0.06  | 0.87 | 0.39  | 0.09 |
| <b>MIP-1<math>\beta</math></b> | 0.01  | 0.96 | 0.16  | 0.54 | 0.07  | 0.78 | 0.53  | 0.02 |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | -0.19 | 0.45 | 0.31  | 0.28 | 0.14  | 0.59 | -0.03 | 0.91 |

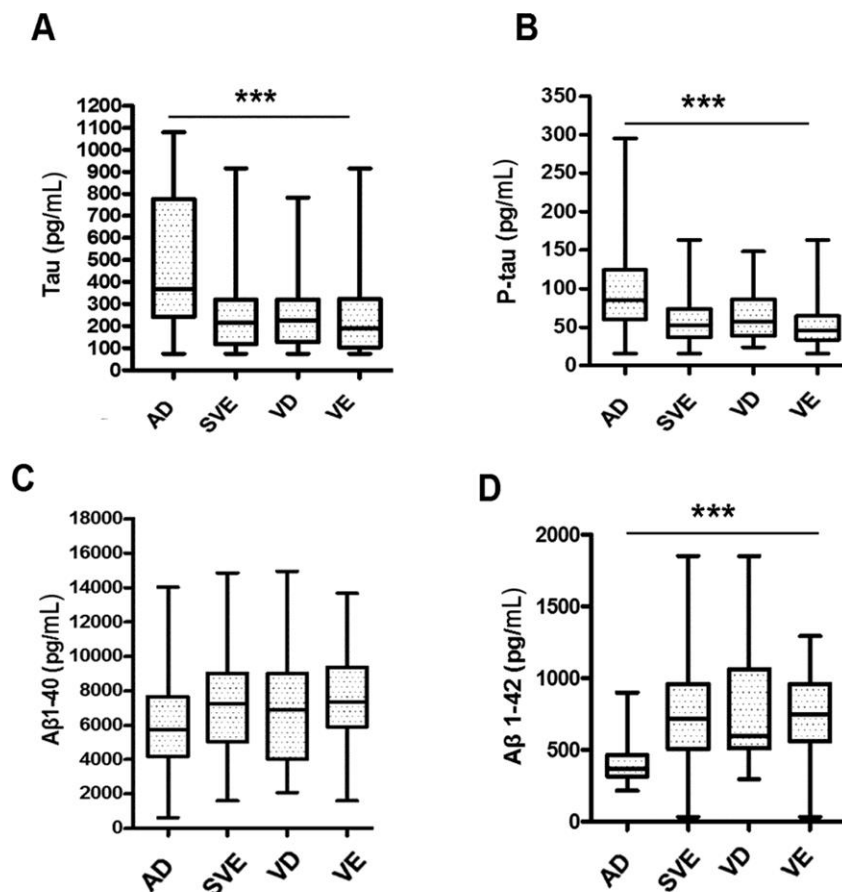
  

| VD                             | Age   |      | BMI   |      | ARWML |      | MMST  |      |
|--------------------------------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
|                                | r     | p    | r     | p    | r     | p    | r     | p    |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | 0.12  | 0.68 | -0.10 | 0.82 | -0.01 | 0.58 | 0.16  | 0.68 |
| <b>IL-4</b>                    | -0.16 | 0.66 | 0.31  | 0.50 | -0.08 | 0.56 | -0.25 | 0.43 |
| <b>IL-5</b>                    | 0.14  | 0.69 | -0.05 | 0.91 | -0.23 | 0.41 | -0.07 | 0.54 |
| <b>IL-6</b>                    | 0.37  | 0.8  | 0.12  | 0.78 | -0.16 | 0.47 | -0.03 | 0.57 |
| <b>IL-7</b>                    | 0.05  | 0.65 | -0.02 | 0.95 | -0.21 | 0.43 | 0.05  | 0.62 |
| <b>IL-8</b>                    | 0.23  | 0.74 | -0.08 | 0.84 | -0.30 | 0.35 | 0.01  | 0.59 |
| <b>IL-12(p70)</b>              | -0.07 | 0.88 | 0.03  | 0.96 | 0.71  | 0.05 | 0.19  | 0.65 |
| <b>IL-13</b>                   | -0.09 | 0.85 | -0.3  | 0.62 | 0.24  | 0.57 | 0.23  | 0.58 |
| <b>IL-17</b>                   | -     | -    | -     | -    | -     | -    | -     | -    |
| <b>G-CSF</b>                   | -0.3  | 0.43 | 0.56  | 0.2  | -0.08 | 0.83 | -0.42 | 0.23 |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | 0.18  | 0.72 | -0.23 | 0.58 | -0.02 | 0.60 | 0.24  | 0.72 |
| <b>MCP-1</b>                   | -0.44 | 0.24 | -0.33 | 0.43 | 0.11  | 0.66 | -0.08 | 0.57 |
| <b>MIP-1<math>\beta</math></b> | 0.22  | 0.73 | -0.01 | 0.98 | -0.17 | 0.46 | 0.38  | 0.79 |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | 0.11  | 0.81 | 0.46  | 0.36 | 0.49  | 0.22 | 0.22  | 0.61 |

| VE            | Age   |      | BMI   |      | ARWML |      | MMST  |      |
|---------------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
|               | r     | p    | r     | p    | r     | p    | r     | p    |
| IL-1 $\beta$  | -0.57 | 0.14 | 0.37  | 0.37 | 0.00  | 0.95 | 0.24  | 0.57 |
| IL-4          | -0.12 | 0.77 | 0.31  | 0.45 | 0.12  | 0.98 | 0.18  | 0.67 |
| IL-5          | 0.08  | 0.84 | 0.34  | 0.4  | 0.07  | 0.87 | 0.25  | 0.54 |
| IL-6          | -0.04 | 0.93 | 0.12  | 0.77 | -0.04 | 0.92 | -0.05 | 0.91 |
| IL-7          | -0.52 | 0.17 | 0.15  | 0.72 | -0.27 | 0.56 | 0.12  | 0.77 |
| IL-8          | 0.01  | 0.97 | 0.15  | 0.73 | -0.38 | 0.38 | -0.09 | 0.84 |
| IL-12(p70)    | -0.11 | 0.08 | -0.20 | 0.64 | -0.36 | 0.41 | -0.45 | 0.26 |
| IL-13         | -0.16 | 0.53 | -0.63 | 0.09 | -0.67 | 0.10 | -0.7  | 0.05 |
| IL-17         | 0.15  | 0.71 | -0.12 | 0.77 | -     | -    | -     | -    |
| G-CSF         | -0.32 | 0.43 | 0.07  | 0.86 | -0.52 | 0.22 | -0.22 | 0.6  |
| IFN- $\gamma$ | -0.52 | 0.17 | -0.12 | 0.77 | 0.05  | 0.92 | 0.33  | 0.42 |
| MCP-1         | -0.53 | 0.16 | 0.23  | 0.60 | 0.68  | 0.10 | 0.6   | 0.11 |
| MIP-1 $\beta$ | -0.46 | 0.25 | 0.39  | 0.34 | -     | -    | -     | -    |
| TNF- $\alpha$ | -0.57 | 0.14 | 0.37  | 0.37 | 0.14  | 0.59 | 0.76  | 0.57 |

#### Abbildung 4:

Supplementary Fig. 2.: Determination of neurodegenerative marker proteins. Levels of tau, p-tau, A $\beta$ 1-40 and A $\beta$ 1-42 were measured in AD patients (n = 44), SVE patients (n = 72) as well as in the subgroups VD patients (n = 37) and VE patients (n = 32). Abbreviations: A $\beta$ , amyloid beta; AD, Alzheimer's disease; SVE, subcortical vascular encephalopathy; VD, vascular dementia; VE, vascular encephalopathy.



**6.3.**

**Llorens F, Schmitz M, Knipper T, Schmidt C, Lange P, Fischer A, Hermann P, Zerr I (2017).**

**Cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease show different but partially overlapping profile compared to Vascular dementia.**

Front Aging Neurosci 9, 289



# Cerebrospinal Fluid Biomarkers of Alzheimer's Disease Show Different but Partially Overlapping Profile Compared to Vascular Dementia

Franc Llorens<sup>1,2\*</sup>, Matthias Schmitz<sup>1,3\*†</sup>, Tobias Knipper<sup>1</sup>, Christian Schmidt<sup>1</sup>, Peter Lange<sup>1</sup>, Andre Fischer<sup>3</sup>, Peter Hermann<sup>1,3</sup> and Inga Zerr<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Neurology, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, Germany, <sup>2</sup> Center for Networked Biomedical Research on Neurodegenerative Diseases, Barcelona, Spain, <sup>3</sup> German Center for Neurodegenerative Diseases—DZNE Site Göttingen, Bonn, Germany

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Isidre Ferrer,  
University of Barcelona, Spain

### Reviewed by:

Alessandro Martorana,  
Università degli Studi di Roma  
Tor Vergata, Italy  
Craig Atwood,  
University of Wisconsin-Madison,  
United States  
Tricia Ann Thornton-Wells,  
Vanderbilt University, United States

### \*Correspondence:

Franc Llorens  
franc.llorens@gmail.com;  
Matthias Schmitz  
matthias.schmitz@  
med.uni-goettingen.de

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work.

**Received:** 22 May 2017

**Accepted:** 18 August 2017

**Published:** 12 September 2017

### Citation:

Llorens F, Schmitz M, Knipper T,  
Schmidt C, Lange P, Fischer A,  
Hermann P and Zerr I (2017)  
Cerebrospinal Fluid Biomarkers of  
Alzheimer's Disease Show Different  
but Partially Overlapping Profile  
Compared to Vascular Dementia.  
*Front. Aging Neurosci.* 9:289.  
doi: 10.3389/fnagi.2017.00289

Vascular factors increase the risks of developing Alzheimer's disease (AD) and they contribute to AD pathology. Since amyloid beta (A $\beta$ ) deposits can be observed in both diseases, there is an overlap which impedes a clear discrimination and difficult clinical diagnosis. In the present study, we compared cerebrospinal fluid (CSF) profiles of neurodegenerative and inflammatory biomarkers in a patient cohort of controls ( $n = 50$ ), AD ( $n = 65$ ) and vascular dementia (VaD) ( $n = 31$ ) cases. Main results were validated in a second cohort composed of AD ( $n = 26$ ), rapidly progressive AD (rpAD) ( $n = 15$ ), VaD ( $n = 21$ ), and cognitively unimpaired patients with vascular encephalopathy (VE) ( $n = 25$ ) cases. In the study, cohort significant differences were detected in tau, p-tau, and A $\beta$ 1-42 (A $\beta$ 42) levels between AD and VaD patients, but not for the neuron-specific enolase (NSE), S100B protein, 14-3-3 and YKL-40. Differential tau, p-tau, and A $\beta$ 42 levels between AD and VaD were confirmed in the validation cohort, which additionally showed no differences between AD and rpAD, nor between VaD and VE. The evaluation of the biomarker performance in discrimination between AD and VaD patients revealed that the best diagnostic accuracy could be obtained when tau, p-tau, and A $\beta$ 42 were combined in form of A $\beta$ 42/p-tau (AUC 0.84–0.90, sensitivity 77–81%, specificity 80–93%) and (tau  $\times$  p-tau)/A $\beta$ 42 ratio (AUC 0.83–0.87, sensitivity 73–81%, specificity 78–87%). Altogether, our studies provided neurodegenerative biomarker profiles in two cohorts of AD and VaD patients favoring the combination of CSF biomarker to differentiate between diseases.

**Keywords:** Alzheimer's disease, amyloid beta, biomarkers, cerebrospinal fluid, neurodegeneration, tau, vascular dementia, vascular encephalopathy

## INTRODUCTION

Subcortical vascular encephalopathy (VE) is a major cause of vascular cognitive impairment leading to vascular dementia (VaD) (Moorhouse and Rockwood, 2008; Staekenborg et al., 2008). White matter lesions on brain imaging combined with clinical symptoms (including cognitive impairment, gait disturbance, and various focal neurological signs as well as incontinence) are characteristic (Baezner et al., 2003). Patients with VE are a heterogeneous entity (Roman et al., 1993), consisting of patients with and without dementia, partly with an abnormal A $\beta$ -ratio, with and without inflammation.

In contrast, AD is neuropathologically characterized by the deposition of amyloid fibrils formed by amyloid beta ( $A\beta$ ) as well as by neurofibrillary tangles which are composed of hyperphosphorylated tau protein (Serrano-Pozo et al., 2011). Heterogeneity regarding the clinical presentation and the disease course in AD is increasingly recognized. In the framework of our surveillance studies, we described a new subtype of AD, rapidly progressive AD (rpAD) (Schmidt et al., 2011, 2012). This subtype of AD can mimic the clinical course of Creutzfeldt-Jakob disease patients with a progressive cognitive decline ( $>6$  mini-mental test points/year), short disease duration ( $<2$  years, 6–8 month) as well as early focal neurological signs, such as occurrence of extrapyramidal symptoms and myoclonus. Patients with rpAD exhibit an age range between 60 and 70 years, whereas patients with classical AD are often older at disease onset (age range 70–80 years) and a disease duration of 7 years is acknowledged (Schmidt et al., 2012). A problem in the clinical setting arises because current diagnostic criteria (Roman et al., 1993; McKhann et al., 2011) often fail in discriminating AD and VaD leading to the diagnosis of mixed dementia. Even though both diseases exhibit the same vascular risk factors, such as atherosclerosis, diabetes mellitus, etc., AD and VaD/VE are different disease entities. Cases exhibiting a pathophysiologic overlap of AD and VaD are considered as mixed dementia (Jellinger and Attems, 2007). For a reliable early diagnosis and the differentiation of AD and VaD subtypes, biomarker diagnostics may be helpful to predict the disease course. At the moment, the subgroup definition to distinguish between AD and rpAD or between VE and VaD is based on clinical criteria and neuropsychological testing (Mini Mental State test), indicating a strong need for objective quantitative compared cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers.

Until now some effort had already been undertaken to detect characteristic immune profiles or neurodegenerative marker proteins in CSF, serum or plasma from patients with AD or VaD (Andreasen et al., 1998; Lee et al., 2009; Paraskevas et al., 2009; Kaerst et al., 2013; Stoeck et al., 2014; Llorens et al., 2015; Schmitz et al., 2015). Even though a differential regulation of the immune system and classical AD biomarkers (tau, p-tau,  $A\beta$ 42) could be observed in both diseases (Andreasen et al., 1998; Paraskevas et al., 2009; Schmitz et al., 2015), the reliability of accuracy of these makers discriminating AD from VaD was not comparable to other diagnostic test systems of dementia diseases, such as assays of 14-3-3, tau or misfolded protein aggregates (Cramm et al., 2015, 2016; Schmitz et al., 2016a,b). Therefore, although CSF tests may be useful in the differential diagnosis of AD from VaD, lower specificity of current biomarkers and disease heterogeneity impedes absolute discrimination in the differential diagnostic context (Andreasen et al., 1998; Nagga et al., 2002; Paraskevas et al., 2009).

Recent studies in our group on neurodegenerative marker profiles in AD and VaD were promising (Kaerst et al., 2013; Hermann et al., 2014) and lead us to the idea of the present study to proceed investigating the discrimination of VaD/VE

from AD patients by the use of CSF biomarkers. Here, two independent patient cohorts were analyzed in parallel for the levels of classical AD CSF biomarkers total tau, p-tau,  $A\beta$ 42. The neuronal damage markers 14-3-3 and neuron-specific enolase (NSE) and the inflammatory markers calcium binding protein B (S-100B) and YKL-40 were also quantified in the study cohort. Additionally, in our validation cohort we included a subgroup of AD called rapidly progressive AD (rpAD) and a group of patients with cerebral small vessel disease showing no relevant cognitive deficits called VE. The diagnostic accuracy was calculated for each marker separately as well as in combination.

## MATERIALS AND METHODS

### Samples

Cohort 1 consists of patients who underwent lumbar puncture for diagnostic purposes in the Clinical Dementia Center Göttingen and were included in this study after clinical and image-based diagnose of either AD [based on recent criteria ICD-10 definition for Alzheimer's disease (AD) F.00 G.30] or VaD (based on ICD 10 definition, F01 and NINDS-AIREN criteria (Roman et al., 1993). Patients with possible other neurodegenerative, neuroinflammatory and neoplastic diseases as well as patients with acute or subacute cerebral ischemia were excluded. The control group was composed of patients with either clinically or pathologically defined alternative diagnosis and included cases diagnosed with psychiatric disorders (psychosis, bipolar disorder, depression, and schizophrenia), epilepsy, autoimmune diseases, meningitis, alcohol abuse disorder, headache, vertigo, pain syndromes and alternative neurologic conditions. Control cases did not present biomarker profiles indicating the presence of a neurodegenerative disease and the presence of neurodegeneration was excluded in the follow-up clinical diagnostic process.

In Cohort 2, we included cases from a separate study on rpAD and cases from a study on cerebral small vessel disease (groups VE and VaD). Exclusion criteria were the same as mentioned above.

VaD diagnosis was based on ICD 10 definition (F01) and NINDS-AIREN criteria (Roman et al., 1993). VE diagnosis was based on neuroimaging (presence of white matter lesions on MRI T2, Flair, or CCT) and exclusion of inflammatory CNS disease. Patients showed signs of cerebral small vessel disease on MRI or CCT and scores of  $>2$  points on the ARWMC scale (Wahlund et al., 2001). They did not match ICD-10 criteria for dementia and showed MMSE scores  $>27$  points. Inflammatory CNS disease had been excluded by CSF analysis. Only in this validation cohort, presence of an AD-like biomarker signature associated with amyloid pathology was excluded for the VaD group using a CSF  $A\beta$ 42/40 ratio cut-off, which has been suggested for the discrimination of AD from other forms of dementia (Lewczuk et al., 2004). No other biomarkers are currently available for a more accurate discrimination.

Classical AD patients were diagnosed according to the Dubois criteria (Dubois et al., 2007). rpAD patients were selected according to clinical presentation as reported previously by the German CJD surveillance group (Schmidt et al., 2011,

**Abbreviations:** AD, Alzheimer's disease;  $A\beta$ 42, amyloid beta 1–42 peptide; CSF, cerebrospinal fluid; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; p-tau, phosphorylated tau; VE, vascular encephalopathy; VaD, vascular dementia.

2012). Rapid progression was defined by a velocity of cognitive decline  $>6$  pts/year on the Mini Mental Status Examination scale (Schmidt et al., 2011); Velocity of decline was calculated using linear regression (least square method) in accordance with Villemagne et al. (2013).

Since there is a lack of autopsy acceptances, a neuropathological examination was not possible. Subgroups were separated after initial research project inclusion but before consideration for this study. All tests were performed in the Neurochemistry Laboratory at the Department of Neurology, University Medical School, Göttingen (Germany). CSF was obtained by lumbar puncture and processed immediately. CSF was examined for standard parameters, such as cell count, proteins, and immunoglobulins in order to exclude neuroinflammatory disease. No patient showed elevated cell count or intrathecal IgG synthesis.

## CSF Tests

Routine CSF analysis did not reveal any abnormalities. CSF tau levels were measured using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit according to the manufacturer's instructions. Total tau was measured using INNOTEST™ hTAU Ag; (Fujirebio), tau phosphorylated at Thr181 (p-tau) was analyzed using an ELISA kit (INNOTEST™ PHOSPHO-TAU(181 P); Fujirebio). The LIAISON® NSE was used for NSE quantification. The LIAISON SANGTEC® 100 was used for S100B detection. Levels of Aβ42 were measured with an ELISA kit (INNOTEST™ AMYLOID (1-42); Fujirebio). YKL-40 was measured using the MicroVue YKL-40 EIA ELISA kit from Quidel following manufacturer's instructions. Protein 14-3-3 was tested by western blot as previously described (Zerr et al., 1998; Schmitz et al., 2014).

## Statistical Analysis

For two group comparisons, the Mann–Whitney test was used. In multiple comparisons, the Kruskal–Wallis test was used. Dunn's multiple comparison was used for *post hoc* analysis. *P*-values lower than 0.05 were considered significant. Statistical analyses and calculations of Area Under the Curve (AUC) and 95% confidence intervals from Receiver Operating Characteristic (ROC) areas were carried out using GraphPad-Prism 7 software. The best cut-off for value of a single biomarker or combination of biomarkers value was estimated based on the Youden index (Youden, 1950). For each biomarker or combination of biomarkers sensitivity and specificity values were calculated.

## Ethics

The present study was conducted according to the revised Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice guidelines and has been approved by the local ethics committee in the University Medical Center, Göttingen (No. 9/6/08, 19/11/09, and 18/8/15). Written informed consent was given by all study participants or their legal next of kin.

## RESULTS

### Determination of CSF Biomarker Profiles in Patients with Alzheimer's Disease and Vascular Dementia

In a study cohort of 50 controls, 65 AD, and 31 VaD accurately classified patients (without mixed pathology), we measured the CSF levels of total tau, p-tau, Aβ42, YKL-40, S100B, NSE, and 14-3-3 (Table 1A). Compared to controls, AD cases presented increased tau ( $p < 0.01$ ), p-tau ( $p < 0.001$ ), YKL-40 ( $p < 0.001$ ), S100B ( $p < 0.05$ ), and decreased Aβ42 ( $p < 0.001$ ) levels (Figures 1A–E). In contrast, VaD only presented alterations on tau ( $p < 0.05$ ) and Aβ42 levels ( $p < 0.01$ ) (Figures 1A,C). Significant differences of total tau ( $p < 0.01$ ), p-tau ( $p < 0.001$ ) Aβ42 ( $p < 0.01$ ) were detected between AD and VaD cases (Figures 1A–C).

NSE levels were not different regulated between groups (Figure 1F). The percentage of 14-3-3 positive cases was higher in AD (12%) and VaD (13%) than in controls (2%) but not significantly different between AD and VaD patients (Figure 1G).

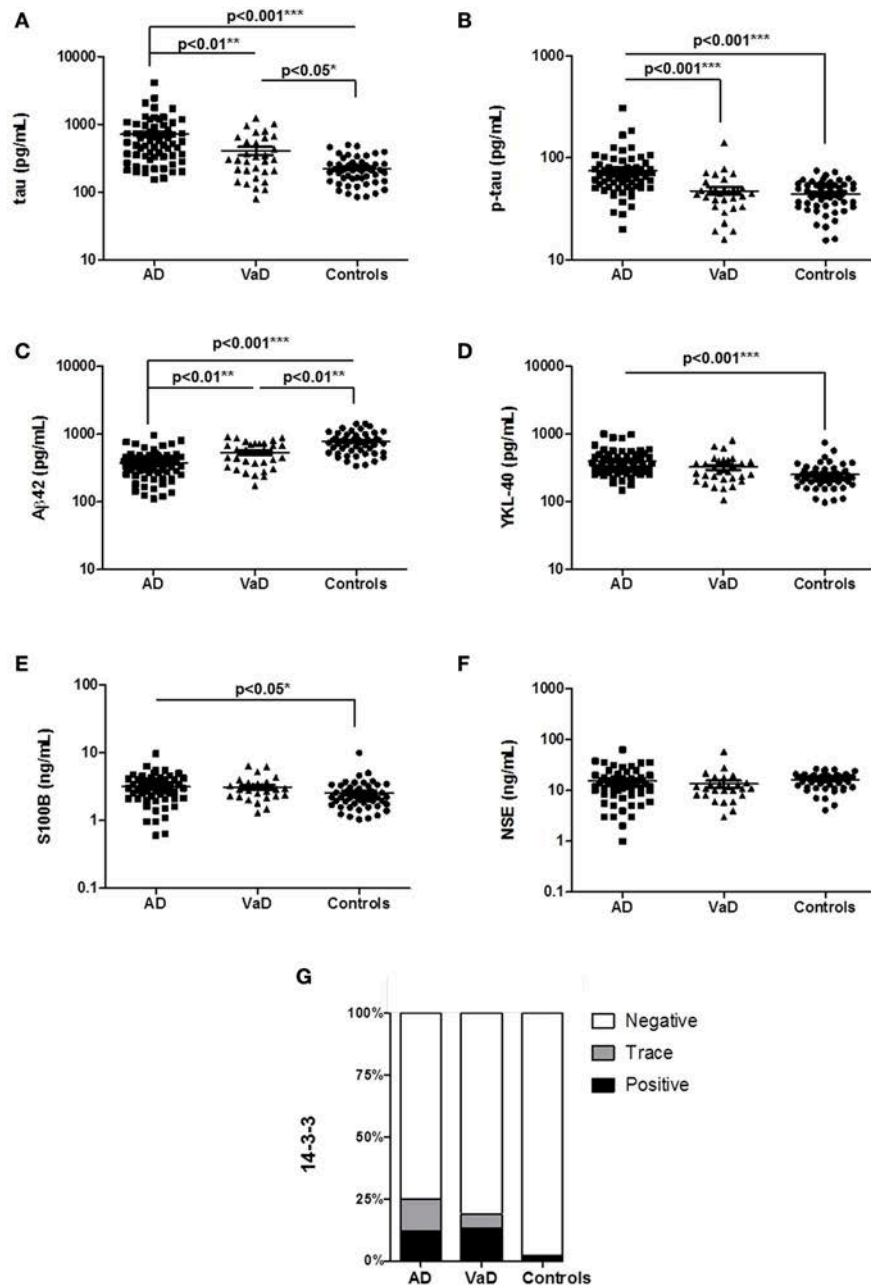
Subsequently, we validated our findings for total tau, p-tau, and Aβ42 in an independent second cohort of patients (Table 1B). The validation cohort included the rpAD subgroup

**TABLE 1 |** Demographic and CSF biomarker data from study and validation cohorts.

|                                       | Control     | AD           | VaD          |           |
|---------------------------------------|-------------|--------------|--------------|-----------|
| <b>(A) STUDY COHORT-COHORT 1</b>      |             |              |              |           |
| <b>Demographics</b>                   |             |              |              |           |
| <i>n</i>                              | 50          | 65           | 31           |           |
| Age (years)                           | 70 ± 6      | 67 ± 11      | 70 ± 10      |           |
| Gender (f/m)                          | 27/23       | 43/22        | 27/6         |           |
| <b>Biomarkers</b>                     |             |              |              |           |
| tau (pg/mL)*                          | 225 ± 103   | 718 ± 639    | 410 ± 300    |           |
| p-tau (pg/mL)*                        | 44 ± 14     | 77 ± 40      | 48 ± 23      |           |
| Aβ42 (pg/mL)*                         | 777 ± 276   | 378 ± 178    | 535 ± 219    |           |
| YKL-40 (pg/mL)*                       | 254 ± 117   | 400 ± 181    | 324 ± 156    |           |
| NSE (ng/mL)*                          | 16 ± 5      | 15 ± 11§     | 13 ± 11§§    |           |
| S100B (ng/mL)*                        | 2.5 ± 1.4   | 3.2 ± 1.9§   | 3.1 ± 1.2§§  |           |
| 14-3-3 (p-t-n) (%p)                   | 1–0–49 (2%) | 8–9–48 (12%) | 4–2–25 (13%) |           |
|                                       |             | AD           | rpAD         | VaD       |
| <b>(B) VALIDATION COHORT-COHORT 2</b> |             |              |              |           |
| <b>Demographics</b>                   |             |              |              |           |
| <i>n</i>                              |             | 26           | 15           | 21        |
| Age (years)*                          |             | 71 ± 11      | 68 ± 10      | 74 ± 7    |
| Gender (f/m)                          |             | 16/10        | 11/4         | 13/8      |
| <b>Biomarkers</b>                     |             |              |              |           |
| tau (pg/mL)*                          |             | 628 ± 456    | 700 ± 447    | 300 ± 176 |
| p-tau (pg/mL)*                        |             | 100 ± 46     | 104 ± 71     | 59 ± 35   |
| Aβ42 (pg/mL)*                         |             | 381 ± 99     | 401 ± 133    | 674 ± 292 |
|                                       |             |              |              | 875 ± 206 |

\*Mean values ± SD, § 57 and §§ 26 cases analyzed, p-t-n: positive, trace, negative, % p: % of positive cases.

Number of cases, age, and gender distribution as well CSF biomarker profile is reported.



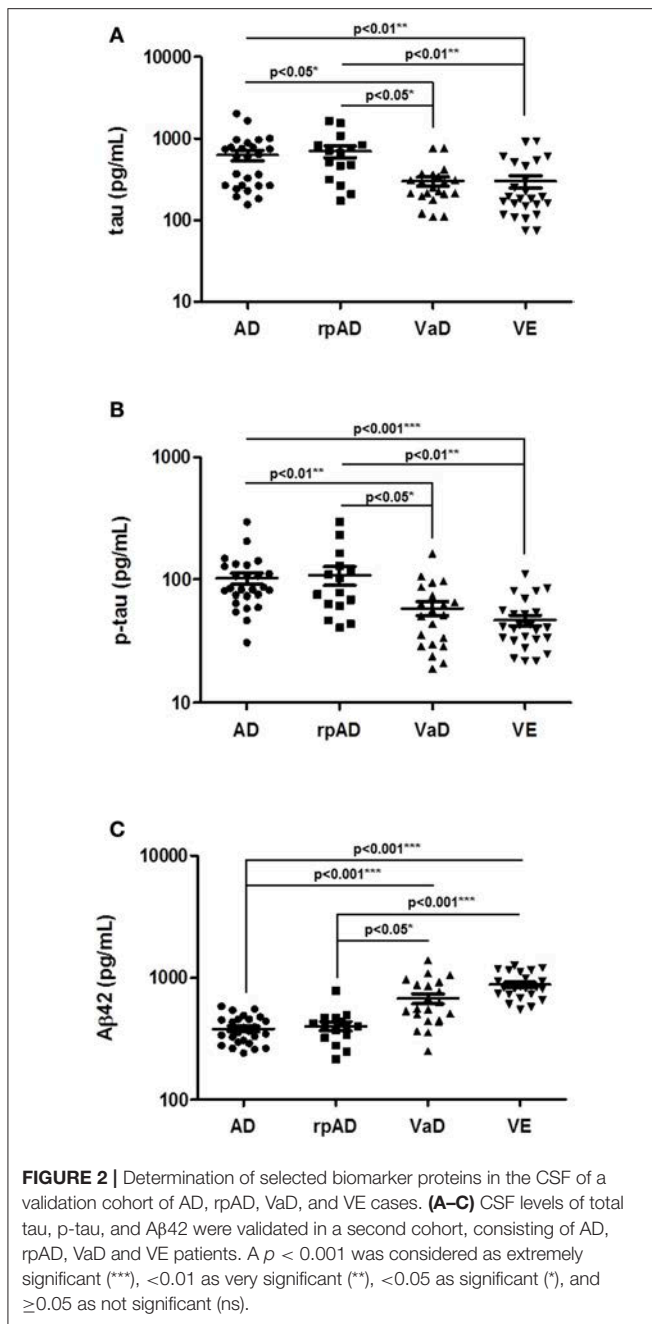
**FIGURE 1** | Determination of AD, inflammatory and neurodegenerative biomarker proteins in the CSF of AD, VaD, and control cases. **(A–F)** CSF levels of neurodegenerative biomarkers, total tau, *p*-tau, A $\beta$ 42, YKL-40, S100B, and NSE were measured by ELISA. **(G)** Semi-quantitative analysis of 14-3-3 levels. Patients analyzed by western blot were divided into three groups according to the 14-3-3 levels, which can be negative, trace (inconclusive) and positive. A  $p < 0.001$  was considered as extremely significant (\*\*\*),  $< 0.01$  as very significant (\*\*),  $< 0.05$  as significant (\*), and  $\geq 0.05$  as not significant.

and VE cases. A comparative analysis of four different patient groups (AD, rpAD, VaD, and VE) confirmed the main observations from the study cohort, since tau ( $p < 0.05$ ), *p*-tau ( $p < 0.01$ ), and A $\beta$ 42 ( $p < 0.001$ ) were differentially regulated between AD and VaD samples (Figures 2A–C). Additionally, it could be shown that the subgroups rpAD and VE did not show any distinctive features when compared to AD or VaD (Figures 2A–C).

### Analysis of Diagnostic Accuracy of Total tau, *p*-tau, and A $\beta$ 42 Separately and in Combination

At first, we calculated the diagnostic values of the biomarker proteins (CSF total tau, *p*-tau, and A $\beta$ 42), which were detected to be differentially regulated between AD and VaD patients. Since no differences were detected in the biomarker profile between





AD and rpAD subgroups, all AD cases were used for further analysis ( $n = 41$ ). AUC, 95% confidence interval (CI) as well as cut-off and associated sensitivity and specificity values were calculated (Table 2). Sensitivity/specificity values showed relative poor accuracy for single biomarker measurements, tau, p-tau, and Aβ42 in the discrimination of both diseases, with AUC values ranging from 0.70 to 0.82 (Table 2). As reported before, a combination of different biomarker proteins may improve the diagnostic value and reliability of biomarker detection (Blennow et al., 2010; Llorens et al., 2016).

Therefore, we explored if the diagnostic accuracy may be improved by combining different biomarkers. Indeed, the

combination of all three biomarkers in form of Aβ42/tau, Aβ42/p-tau, and tau × p-tau/Aβ42 revealed higher AUC values than single biomarker measurements. AUC values ranged from 0.79 to 0.90 (Table 2). Highest diagnostic accuracy in both cohorts was detected for Aβ42/p-tau ratio: AUC: 0.84, 95% CI: 0.75–0.93, sensitivity of 81% and a specificity of 80% in cohort 1 and AUC: 0.90, 95% CI: 0.80–0.98, sensitivity of 77% and a specificity of 93% in the validation cohort (Table 2, Supplementary Figure 1). Interestingly, cut-off values for combined biomarkers were similar between both cohorts (Table 2). For those biomarker ratios showing higher clinical accuracy we used cut-offs determined in the study cohort to test the diagnostic performance on the validation cohort. For Aβ42/p-tau, using an optimal cut off of 8.2 determined from study cohort, a sensitivity of 72% and a specificity of 95% was detected in the validation cohort. For tau × p-tau/Aβ42, using an optimal cut-off of 48 determined from study cohort, a sensitivity of 81% and a specificity of 85% was detected in validation cohort. This data indicates that parameters detected from the intra-cohort validation analysis were in range than those detected from the two cohorts individually (Table 2).

## DISCUSSION

In patients with late-onset AD, approximately 24% of cases show a relevant vascular pathology in autopsy (Jellinger and Attems, 2007). Since vascular factors, such as diabetes or arteriosclerosis, belong to the risk factors of AD and a cerebral vascular pathology may further contribute to neurodegeneration in AD, both pathologies can occur to the same time, considered as mixed dementia. In these patients, an accurate classification remains problematic (de la Torre, 2002; Roman and Royall, 2004). Therefore, we excluded VaD patients showing a pathological amyloid β ratio from analysis. This was done in order to define a group of pure VaD, assigned as validation cohort, with no or minimal interference from mixed cases.

Given the clinical overlap between AD and VaD when using established diagnostic criteria, it is highly relevant to identify either imaging or biochemical biomarkers. Indeed, symptoms and pathophysiology often overlap and patients may experience similar cognitive, functional and behavioral changes (Roman and Royall, 2004). Previous studies often focused on the differentiation between AD and controls without neurodegeneration, but only few reports addressed the more challenging discrimination between AD and VaD patients (Andreasen et al., 1998; Nagga et al., 2002; Paraskevas et al., 2009; Kaerst et al., 2014; Skillback et al., 2015), most of them focusing on the classical CSF AD biomarkers. Therefore, the aim of this study was to extent the profiling of neurodegenerative marker-proteins in the CSF of AD and VaD patients because medical care plan and pharmaceutical treatments might be different for these two disease populations. In addition to classical markers in AD, such as total tau, p-tau, and Aβ42, we focused on alternative markers for neuronal degeneration for the first time, such as 14-3-3 (Sanchez-Juan et al., 2006; Schmitz et al., 2016b) and NSE (Zerr et al., 1995), both related to Creutzfeldt-Jakob disease due



**TABLE 2** | CSF biomarker accuracy in the discrimination of AD from VaD cases in study and validation cohorts.

| Biomarker outcome                     | AUC  | 95% CI    | Cut-off | Sensitivity (%) | Specificity (%) |
|---------------------------------------|------|-----------|---------|-----------------|-----------------|
| <b>STUDY COHORT-COHORT 1</b>          |      |           |         |                 |                 |
| AD: <i>n</i> = 65, VaD: <i>n</i> = 31 |      |           |         |                 |                 |
| tau                                   | 0.70 | 0.58–0.81 | <360    | 62              | 72              |
| p-tau                                 | 0.80 | 0.70–0.90 | <51     | 77              | 81              |
| A $\beta$ 42                          | 0.70 | 0.59–0.81 | >412    | 65              | 66              |
| A $\beta$ 42/tau                      | 0.79 | 0.69–0.88 | >1      | 74              | 72              |
| A $\beta$ 42/p-tau                    | 0.84 | 0.75–0.93 | >8.2    | 81              | 80              |
| tau $\times$ p-tau/A $\beta$ 42       | 0.83 | 0.74–0.91 | <48     | 73              | 78              |
| <b>VALIDATION COHORT-COHORT 2</b>     |      |           |         |                 |                 |
| AD: <i>n</i> = 41, VaD: <i>n</i> = 21 |      |           |         |                 |                 |
| tau                                   | 0.74 | 0.63–0.87 | <420    | 89              | 60              |
| p-tau                                 | 0.78 | 0.65–0.90 | <65     | 72              | 73              |
| A $\beta$ 42                          | 0.82 | 0.72–0.93 | >490    | 72              | 88              |
| A $\beta$ 42/tau                      | 0.83 | 0.72–0.95 | >1.2    | 81              | 73              |
| A $\beta$ 42/p-tau                    | 0.90 | 0.80–0.98 | >8.4    | 77              | 93              |
| tau $\times$ p-tau/A $\beta$ 42       | 0.87 | 0.77–0.97 | <44     | 81              | 87              |

AUC, 95% CI, cut-off value as well as sensitivity and specificity values are indicated for single biomarkers and combination of biomarkers.

to massive neuronal degeneration, as well as S100B and YKL-40, two well-known markers of astrocytosis in neurodegenerative pathologies (Rothermundt et al., 2003; Bonne-Barkay et al., 2010; Craig-Schapiro et al., 2010). In the validation cohort we also included the subgroups rpAD and VE with the aim to extend our analysis to different clinically relevant subgroups related to Alzheimer's and vascular pathology.

## Cerebrospinal Fluid Biomarkers in the Discrimination of Vascular Dementia from Alzheimer's Disease

The biomarker detection in CSF is a useful tool to measure any signs of neurodegeneration which are relevant in several dementia diseases. Our data indicated different CSF levels of total tau, p-tau (both elevated), and A $\beta$ 42 (decreased) in AD patients when compared to VaD cases and controls. Additionally, we found in VaD patients that CSF levels of p-tau were not significantly different from controls. These findings are in agreement with other reports (Andreassen et al., 1999, 2001; Nagga et al., 2002; Jia et al., 2005; Stefani et al., 2005; Paraskevas et al., 2009; Kaerst et al., 2013). The presence of elevated levels of the astrocytic marker YKL-40 in AD, but not in VaD, is also in line with previous reports (Janelidze et al., 2016). Interestingly S100B, another astrocytic marker of neuroinflammation (Donato et al., 2009), was elevated in AD cases compared to controls, which coincides with other studies (Peskind et al., 2001). The same could be observed in other neurological diseases associated to neuroinflammatory profiles (Michetti et al., 1979; Berger et al., 2002; Rejdak et al., 2008; Susmuth et al., 2010). Altogether our data indicate that the astrocytic response and neuroinflammatory signature reported in AD pathology can be detected in the CSF of AD patients by quantification of astrocytic markers. This suggests that YKL-40 and S100B quantification could have an application in the evaluation of a potential therapeutic intervention in AD.

The comparison of AD and VaD patients revealed no significant differences in YKL-40 and S100B nor in 14-3-3 and NSE levels.

Additionally, despite the increase in 14-3-3 positive cases in both diseases (compared to controls), 14-3-3 quantification does not have a clinical use in the diagnosis of AD and VaD due to its low sensitivity, which we confirmed from previous report (Blennow et al., 2010). Contrary to the previously reported increased NSE levels in AD and VaD cases (Blennow et al., 1994), we found similar NSE levels in controls, AD and VaD cases. Some explanations for these differences would be different types of controls used in both studies. Indeed, Blennow et al. used healthy individuals, while our control cohort is composed of cases with neurological alterations, which are more prone to present some kind of neuronal damage than healthy controls (Blennow et al., 1994).

This indicates that neuronal/axonal degeneration is not an appropriate pathologic hallmark for the discrimination of both diseases in CSF, in agreement with the partial overlap on tau levels, another reported marker of axonal damage, between AD and VaD. Besides the poor diagnostic accuracy of tau in the discrimination of AD from VaD, the observation of higher tau levels, but not of 14-3-3 and NSE in AD compared to VaD would suggest that, a specific AD mechanism, rather than axonal damage, contributes to elevated CSF tau in AD.

The validation of total tau, p-tau, and A $\beta$ 42 in a validation cohort of patients confirmed our observations and additionally revealed that AD biomarkers were not adequate to discriminate between AD and rpAD nor between VaD and VE. A lack of differences between both AD forms suggest the absence of differential pathology at the time of diagnosis because CSF tau, p-tau, and A $\beta$ 42 reflect pathophysiological processes of the brain correlating with amyloid plaques and neurofibrillary tangles (Tapiola et al., 1997, 2009). Additionally, our data indicate that tau, p-tau, and A $\beta$ 42 are not valuable markers predicting cognitive decline in clinically diagnosed AD patients.

The calculation of the diagnostic accuracy revealed sensitivity and specificity values varying between 62–89 and 60–88%, respectively for single biomarkers. These data are in agreement with Stefani et al., who suggested that A $\beta$ 42 alone showed a good discrimination between AD and VaD. The authors obtained sensitivity and specificity values of 77 and 80% (Stefani et al., 2005). In this regard, although study cohort could be considered more representative of the overall patient population (patients who underwent lumbar puncture for diagnostic purposes in our Clinical Dementia Center) than validation cohort (cases recruited for independent studies when AD or VaD diagnosis was suspected), overall diagnostic parameters were similar in both cohorts.

Before this study, there were only a few studies using the combination of different neurodegenerative markers to distinguish between AD and VaD (Andreasen et al., 1998; Paraskevas et al., 2009). Our results are in line with two other studies which suggested either the ratio of A $\beta$ 42/p-tau CSF levels or the combination of total tau, p-tau, and A $\beta$ 42 for a differentiation between AD and VaD patients. Both studies achieved discrimination with a sensitivity and specificity of 85% (Paraskevas et al., 2009). However, our results indicate that neither measurement of CSF tau, p-tau, or A $\beta$ 42 alone, nor the combination of these biomarkers can discriminate entirely between AD and VaD cases.

## CONCLUSIONS

In conclusion, our present study suggests that the combination of AD biomarkers especially A $\beta$ 42/p-tau and tau  $\times$  p-tau/A $\beta$ 42 may be helpful for the discrimination of AD from VaD. Additional markers, such as YKL40, S100B, NSE, and 14-3-3 failed in distinguishing between

diseases. For a further improvement of diagnostic accuracy, the identification of additional CSF biomarkers is required.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

FL, MS, and IZ conceived the study. FL, MS, and PL performed biomarker's measurements. FL and MS analyzed data. TK, CS, AF, and PH characterized patients and/or contributed samples/reagents. FL and MS drafted the manuscript. All authors interpreted the data, revised the manuscript for important intellectual content and read, and approved the final manuscript version.

## FUNDING

The study was supported by the Robert-Koch-Institute through funds of Federal Ministry of Health (grant no. 1369-341) and DZNE (German Center for Neurodegenerative Diseases) to IZ and by the Spanish Ministry of Health-Instituto Carlos III (Miguel Servet-CP16/00041) to FL.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Silja Köchy for technical assistance. We acknowledge support by the Open Access Publication Funds of the Göttingen University.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2017.00289/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Andreasen, N., Hesse, C., Davidsson, P., Minthon, L., Wallin, A., Winblad, B., et al. (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, 673–680. doi: 10.1001/archneur.56.6.673
- Andreasen, N., Minthon, L., Davidsson, P., Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Winblad, B., et al. (2001). Evaluation of CSF-tau and CSF-A $\beta$ 42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. *Arch. Neurol.* 58, 373–379. doi: 10.1001/archneur.58.3.373
- Andreasen, N., Vanmechelen, E., Van de Voorde, A., Davidsson, P., Hesse, C., Tarvonen, S., et al. (1998). Cerebrospinal fluid tau protein as a biochemical marker for Alzheimer's disease: a community based follow up study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 64, 298–305. doi: 10.1136/jnnp.64.3.298
- Baezner, H., Daffertshofer, M., and Hennerici, M. (2003). Subkortikale vaskuläre Enzephalopathie. *Akt Neurol.* 30, 266–280. doi: 10.1055/s-2003-40905
- Berger, R. P., Pierce, M. C., Wisniewski, S. R., Adelson, P. D., Clark, R. S., Ruppel, R. A., et al. (2002). Neuron-specific enolase and S100B in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *Pediatrics* 109:E31. doi: 10.1542/peds.109.2.e31
- Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., and Zetterberg, H. (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 131–144. doi: 10.1038/nrneurol.2010.4
- Blennow, K., Wallin, A., and Ekman, R. (1994). Neuron specific enolase in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for neuronal degeneration in dementia disorders? *J. Neural Transm. Park. Dis. Dement. Sect.* 8, 183–191. doi: 10.1007/BF02260939
- Bonneh-Barkay, D., Wang, G., Starkey, A., Hamilton, R. L., and Wiley, C. A. (2010). *In vivo* CHI3L1 (YKL-40) expression in astrocytes in acute and chronic neurological diseases. *J. Neuroinflamm.* 7:34. doi: 10.1186/1742-2094-7-34
- Craig-Schapiro, R., Perrin, R. J., Roe, C. M., Xiong, C., Carter, D., Cairns, N. J., et al. (2010). YKL-40: a novel prognostic fluid biomarker for preclinical Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 68, 903–912. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.08.025
- Cramm, M., Schmitz, M., Karch, A., Mitrova, E., Kuhn, F., Schroeder, B., et al. (2016). Stability and reproducibility underscore utility of RT-QuIC for diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Mol. Neurobiol.* 53, 1896–1904. doi: 10.1007/s12035-015-9133-2
- Cramm, M., Schmitz, M., Karch, A., Zafar, S., Varges, D., Mitrova, E., et al. (2015). Characteristic CSF prion seeding efficiency in humans with prion diseases. *Mol. Neurobiol.* 51, 396–405. doi: 10.1007/s12035-014-8709-6
- de la Torre, J. C. (2002). Alzheimer disease as a vascular disorder: nosological evidence. *Stroke* 33, 1152–1162. doi: 10.1161/01.STR.0000014421.15948.67
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., et al. (2009). S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1008–1022. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.11.009
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Dekosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., et al. (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol.* 6, 734–746. doi: 10.1016/S1474-4422(07)70178-3

- Hermann, P., Romero, C., Schmidt, C., Reis, C., and Zerr, I. (2014). CSF biomarkers and neuropsychological profiles in patients with cerebral small-vessel disease. *PLoS ONE* 9:e105000. doi: 10.1371/journal.pone.0105000
- Janelidze, S., Hertzog, J., Zetterberg, H., Landqvist Waldo, M., Santillo, A., Blennow, K., et al. (2016). Cerebrospinal fluid neurogranin and YKL-40 as biomarkers of Alzheimer's disease. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 3, 12–20. doi: 10.1002/acn3.266
- Jellinger, K. A., and Attems, J. (2007). Neuropathological evaluation of mixed dementia. *J. Neurol. Sci.* 257, 80–87. doi: 10.1016/j.jns.2007.01.045
- Jia, J. P., Meng, R., Sun, Y. X., Sun, W. J., Ji, X. M., and Jia, L. F. (2005). Cerebrospinal fluid tau, Abeta1-42 and inflammatory cytokines in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurosci. Lett.* 383, 12–16. doi: 10.1016/j.neulet.2005.03.051
- Kaerst, L., Kuhlmann, A., Wedekind, D., Stoeck, K., Lange, P., and Zerr, I. (2013). Cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease, vascular dementia and ischemic stroke patients: a critical analysis. *J. Neurol.* 260, 2722–2727. doi: 10.1007/s00415-013-7047-3
- Kaerst, L., Kuhlmann, A., Wedekind, D., Stoeck, K., Lange, P., and Zerr, I. (2014). Using cerebrospinal fluid marker profiles in clinical diagnosis of dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 38, 63–73. doi: 10.3233/JAD-130995
- Lee, K. S., Chung, J. H., Choi, T. K., Suh, S. Y., Oh, B. H., and Hong, C. H. (2009). Peripheral cytokines and chemokines in Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 28, 281–287. doi: 10.1159/000245156
- Lewczuk, P., Esselmann, H., Otto, M., Maler, J. M., Henkel, A. W., Henkel, M. K., et al. (2004). Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF Abeta42, Abeta42/Abeta40 ratio and total tau. *Neurobiol. Aging* 25, 273–281. doi: 10.1016/S0197-4580(03)00086-1
- Llorens, F., Kruse, N., Schmitz, M., Shafiq, M., da Cunha, J. E., Gotzman, N., et al. (2015). Quantification of CSF biomarkers using an electrochemiluminescence-based detection system in the differential diagnosis of AD and sCJD. *J. Neurol.* 262, 2305–2311. doi: 10.1007/s00415-015-7837-x
- Llorens, F., Schmitz, M., Karch, A., Cramm, M., Lange, P., Gherib, K., et al. (2016). Comparative analysis of cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of neurodegenerative dementia. *Alzheimers Dement.* 12, 577–589. doi: 10.1016/j.jalz.2015.10.009
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R. Jr., Kawas, C. H., et al. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the national institute on aging-Alzheimer's association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7, 263–269. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005
- Michetti, F., Massaro, A., and Murazio, M. (1979). The nervous system-specific S-100 antigen in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Neurosci. Lett.* 11, 171–175. doi: 10.1016/0304-3940(79)90122-8
- Moorhouse, P., and Rockwood, K. (2008). Vascular cognitive impairment: current concepts and clinical developments. *Lancet Neurol.* 7, 246–255. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70040-1
- Nagga, K., Gottfries, J., Blennow, K., and Marcusson, J. (2002). Cerebrospinal fluid phospho-tau, total tau and beta-amyloid(1-42) in the differentiation between Alzheimer's disease and vascular dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 14, 183–190. doi: 10.1159/000066023
- Paraskevas, G. P., Kapaki, E., Papageorgiou, S. G., Kalfakis, N., Andreadou, E., Zalonis, I., et al. (2009). CSF biomarker profile and diagnostic value in vascular dementia. *Eur. J. Neurol.* 16, 205–211. doi: 10.1111/j.1468-1331.2008.02387.x
- Peskind, E. R., Griffin, W. S., Akama, K. T., Raskind, M. A., and Van Eldik, L. J. (2001). Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 39, 409–413. doi: 10.1016/S0197-0186(01)00048-1
- Rejdak, K., Petzold, A., Stelmasiak, Z., and Giovannoni, G. (2008). Cerebrospinal fluid brain specific proteins in relation to nitric oxide metabolites during relapse of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 14, 59–66. doi: 10.1177/1352458507082061
- Roman, G. C., and Royall, D. R. (2004). A diagnostic dilemma: is "Alzheimer's dementia" Alzheimer's disease, vascular dementia, or both? *Lancet Neurol.* 3:141. doi: 10.1016/S1474-4422(04)00674-X
- Roman, G. C., Tatemichi, T. K., Erkinjuntti, T., Cummings, J. L., Masdeu, J. C., Garcia, J. H., et al. (1993). Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN international workshop. *Neurology* 43, 250–260. doi: 10.1212/WNL.43.2.250
- Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J. H., and Arolt, V. (2003). S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc. Res. Tech.* 60, 614–632. doi: 10.1002/jemt.10303
- Sanchez-Juan, P., Green, A., Ladogana, A., Cuadrado-Corrales, N., Sanchez-Valle, R., Mitrova, E., et al. (2006). CSF tests in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 67, 637–643. doi: 10.1212/01.wnl.0000230159.67128.00
- Schmidt, C., Haik, S., Satoh, K., Rabano, A., Martinez-Martin, P., Roeder, S., et al. (2012). Rapidly progressive Alzheimer's disease: a multicenter update. *J. Alzheimers Dis.* 30, 751–756. doi: 10.3233/JAD-2012-120007
- Schmidt, C., Wolff, M., Weitz, M., Bartlau, T., Korth, C., and Zerr, I. (2011). Rapidly progressive Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 68, 1124–1130. doi: 10.1001/archneurol.2011.189
- Schmitz, M., Cramm, M., Llorens, F., Muller-Cramm, D., Collins, S., Atarashi, R., et al. (2016a). The real-time quaking-induced conversion assay for detection of human prion disease and study of other protein misfolding diseases. *Nat. Protoc.* 11, 2233–2242. doi: 10.1038/nprot.2016.120
- Schmitz, M., Ebert, E., Stoeck, K., Karch, A., Collins, S., Calero, M., et al. (2016b). Validation of 14-3-3 protein as a marker in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease diagnostic. *Mol. Neurobiol.* 53, 2189–2199. doi: 10.1007/s12035-015-9167-5
- Schmitz, M., Hermann, P., Oikonomou, P., Stoeck, K., Ebert, E., Poliakov, T., et al. (2015). Cytokine profiles and the role of cellular prion protein in patients with vascular dementia and vascular encephalopathy. *Neurobiol. Aging* 36, 2597–2606. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.05.013
- Schmitz, M., Lullmann, K., Zafar, S., Ebert, E., Wohlhage, M., Oikonomou, P., et al. (2014). Association of prion protein genotype and scrapie prion protein type with cellular prion protein charge isoform profiles in cerebrospinal fluid of humans with sporadic or familial prion diseases. *Neurobiol. Aging* 35, 1177–1188. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.010
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., and Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1:a006189. doi: 10.1101/cshperspect.a006189
- Skillback, T., Farahmand, B. Y., Rosen, C., Mattsson, N., Nagga, K., Kilander, L., et al. (2015). Cerebrospinal fluid tau and amyloid-beta1-42 in patients with dementia. *Brain* 138(Pt 9), 2716–2731. doi: 10.1093/brain/awv181
- Staekenborg, S. S., van Straaten, E. C., van der Flier, W. M., Lane, R., Barkhof, F., and Scheltens, P. (2008). Small vessel versus large vessel vascular dementia: risk factors and MRI findings. *J. Neurol.* 255, 1644–1651; discussion 813-4. doi: 10.1007/s00415-008-0944-1
- Stefani, A., Bernardini, S., Panella, M., Pierantozzi, M., Nuccetelli, M., Koch, G., et al. (2005). AD with subcortical white matter lesions and vascular dementia: CSF markers for differential diagnosis. *J. Neurol. Sci.* 237, 83–88. doi: 10.1016/j.jns.2005.05.016
- Stoeck, K., Schmitz, M., Ebert, E., Schmidt, C., and Zerr, I. (2014). Immune responses in rapidly progressive dementia: a comparative study of neuroinflammatory markers in Creutzfeldt-Jakob disease, Alzheimer's disease and multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation.* 11:170. doi: 10.1186/s12974-014-0170-y
- Sussmuth, S. D., Sperfeld, A. D., Hinz, A., Bretschneider, J., Endruhn, S., Ludolph, A. C., et al. (2010). CSF glial markers correlate with survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 74, 982–987. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181d5dc3b
- Tapiola, T., Alafuzoff, I., Herukka, S. K., Parkkinen, L., Hartikainen, P., Soininen, H., et al. (2009). Cerebrospinal fluid  $\beta$ -amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch. Neurol.* 66, 382–389. doi: 10.1001/archneurol.2008.596
- Tapiola, T., Overmyer, M., Lehtovirta, M., Helisalmi, S., Ramberg, J., Alafuzoff, I., et al. (1997). The level of cerebrospinal fluid tau correlates with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 8, 3961–3963. doi: 10.1097/00001756-199712220-00022
- Villemagne, V. L., Burnham, S., Bourgeat, P., Brown, B., Ellis, K. A., Salvado, O., et al. (2013). Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol.* 12, 357–367. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70044-9
- Wahlund, L. O., Barkhof, F., Fazekas, F., Bronge, L., Augustin, M., Sjogren, M., et al. (2001). A new rating scale for age-related white matter changes applicable to MRI and CT. *Stroke* 32, 1318–1322. doi: 10.1161/01.STR.32.6.1318

- Youden, W. J. (1950). Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 3, 32–35. doi: 10.1002/1097-0142(1950)3:1<32::AID-CNCR2820030106>3.0.CO;2-3
- Zerr, I., Bodemer, M., Gefeller, O., Otto, M., Poser, S., Wiltfang, J., et al. (1998). Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 43, 32–40. doi: 10.1002/ana.410430109
- Zerr, I., Bodemer, M., Racker, S., Grosche, S., Poser, S., Kretschmar, H. A., et al. (1995). Cerebrospinal fluid concentration of neuron-specific enolase in diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 345, 1609–1610. doi: 10.1016/S0140-6736(95)90118-3

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

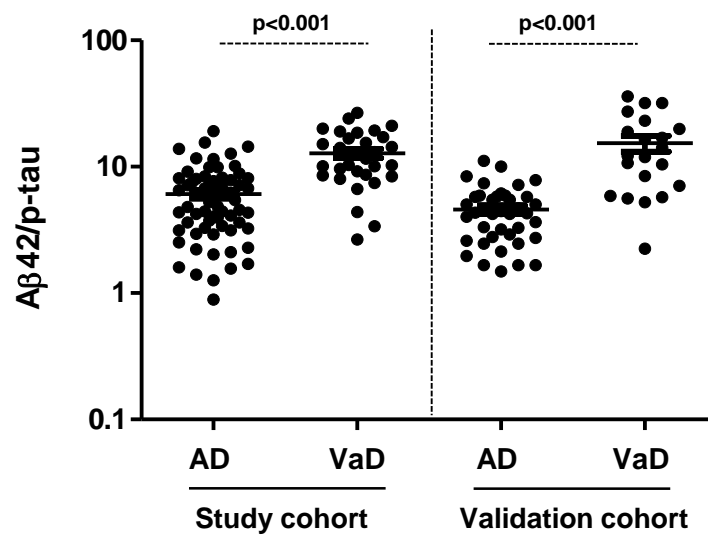
Copyright © 2017 Llorens, Schmitz, Knipper, Schmidt, Lange, Fischer, Hermann and Zerr. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

### 6.3.1. Supplemental Data

#### Abbildung 5:

Supplementrny Figure 1. Determination of AB42/tau ratio in AD and VaD cases from study and validation cohorts. A p-value:  $< 0.001$  was considered as extremely significant (\*\*\*)

### Supplementary Figure 1



## **6.4. Weitere wissenschaftliche Beiträge mit Bezug zur Dissertation**

### **Kongress, Poster:**

Hermann P, Romero C, Taraturo A, Zerr I (2009): Biomarkers and neuropsychology in patients with cerebral small vessel disease. Sixth International Congress on Vascular Dementia. Barcelona, Spain.

### **Kongress, oral presentation:**

Hermann P (2011): CSF biomarkers and cognition in patients with CSVD and dementia Seventh International Congress on Vascular Dementia. Riga, Latvia.