

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
(Prof. Dr. med. J. Wiltfang)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# Untersuchungen zu Amyloid- $\beta$ -Peptiden im humanen Blutplasma als Biomarker- kandidaten der Alzheimerkrankheit

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

vorgelegt von

Lara Rohdenburg

aus

Hildesheim

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. W. Brück

**Betreuungsausschuss:**

Betreuer: Prof. Dr. J. Wiltfang

Ko-Betreuerin: Prof. Dr. I. Zerr

**Prüfungskommission:**

Referent: Prof. Dr. J. Wiltfang

Ko-Referentin: Prof. Dr. I. Zerr

Drittreferent: Prof. Dr. T. Meyer

**Tag der mündlichen Prüfung:** 25.01.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zu Amyloid- $\beta$ -Peptiden im humanen Blutplasma als Biomarkerkandidaten der Alzheimerkrankheit“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert: Klafki HW, Rieper P, Matzen A, Zampar S, Wirths O, Vogelgsang J, Osterloh D, Rohdenburg L, Oberstein TJ, Jahn O et al. (2020): Development and Technical Validation of an Immunoassay for the Detection of APP<sub>669-711</sub> (A $\beta$ -<sub>3-40</sub>) in Biological Samples. *Int J Mol Sci* 21, 6564



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie der Alzheimerkrankheit . . . . .	1
1.2 Diagnostik der Alzheimerkrankheit . . . . .	1
1.3 Genetische Komponenten der Alzheimerkrankheit . . . . .	3
1.4 Neuropathologie der Alzheimerkrankheit . . . . .	3
1.5 Biomarker der Alzheimerkrankheit . . . . .	4
1.6 Zielsetzung der Arbeit . . . . .	6
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>7</b>
2.1 Materialien . . . . .	7
2.1.1 Verbrauchsmaterialien . . . . .	7
2.1.2 Chemikalien . . . . .	7
2.1.3 Antikörper . . . . .	10
2.1.4 Beads . . . . .	10
2.1.5 Biologische Proben . . . . .	11
2.1.6 Assay-Kits . . . . .	11
2.1.7 Software . . . . .	11
2.1.8 Geräte . . . . .	11
2.2 Methoden . . . . .	13
2.2.1 Herstellung und Cross-Linking der Dynabeads . . . . .	13
2.2.2 Immunpräzipitation . . . . .	14
2.2.3 Bicine/Tris-SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) . . . . .	16
2.2.4 Semi-Dry-Western-Blot . . . . .	18
2.2.5 MSD-V-Plex-Assay . . . . .	20
2.2.6 Statistische Analysen . . . . .	21
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>22</b>
3.1 Qualitätskontrolle der hergestellten 1E8-M280-Dynabeads für die Immunpräzipitation durch Western-Blot-Analysen . . . . .	22

---

3.2	Einfluss des präanalytischen Einfrierens und Wiederauftauens . . . . .	24
3.3	Bestätigung des Biomarkers in einer speziell ausgewählten Kohorte mit einem modifizierten Protokoll . . . . .	27
3.4	Partielle Assay-Validierung . . . . .	31
3.4.1	LLOD und LLOQ . . . . .	31
3.4.2	ULOQ . . . . .	32
3.4.3	Positionseffekte . . . . .	32
3.4.4	IP aus unterschiedlichen Plasmavolumina . . . . .	34
3.4.5	IP-Effizienz . . . . .	36
3.4.6	Assay-Selektivität . . . . .	37
3.4.7	<i>Spike</i> -Wiederfindung . . . . .	38
3.4.7.1	Bestimmung der <i>Spike</i> -Wiederfindung von A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 . . . . .	38
3.4.7.2	Retrospektive Betrachtung der <i>Spike</i> -Wiederfindung von A $\beta$ 42 . . . . .	42
3.4.8	Intraassay-Varianz: Parallele Immunpräzipitationen . . . . .	44
3.4.9	Interassay-Varianz des Zweischritt-Immunoassay . . . . .	45
3.4.10	Normalisierung der Interassayvarianz mittels der Kontrollproben . . . . .	45
3.5	Überprüfung des Biomarkers in einer unabhängigen klinischen Kohorte . . . . .	49
3.5.1	Kohortencharakterisierung . . . . .	49
3.5.2	Auffälligkeiten von Assayplatte vier: Unabhängige klinische Kohorte . . . . .	51
3.5.3	Vergleich der biomarkerpositiven mit der biomarkernegativen Gruppe . . . . .	55
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>66</b>
4.1	Stellenwert der Amyloid- $\beta$ -Peptide . . . . .	66
4.1.1	Einflussfaktoren auf die Konzentrationen der Peptide und die Analyse . . . . .	68
4.1.1.1	In vivo . . . . .	69
4.1.1.2	In vitro . . . . .	69
4.1.2	Zusammenhang zwischen den Amyloid- $\beta$ -Peptiden in humanem Liquor und Plasma . . . . .	73
4.1.2.1	Korrelation der Peptide zwischen Plasma und Liquor . . . . .	75
4.1.2.2	Korrelation der Ratios zwischen Plasma und Liquor . . . . .	75
4.1.2.3	Korrelation von Liquor- und Plasmakonzentrationen zu bildgebenden Verfahren . . . . .	76
4.2	Analyse der partiellen Assay-Validierung . . . . .	76
4.2.1	Präanalytisches Einfrieren . . . . .	77
4.2.2	Speziell ausgewählte Kohorte . . . . .	78
4.2.3	IP aus unterschiedlichen Volumina . . . . .	79
4.2.4	IP-Effizienz . . . . .	80
4.2.5	Assay-Selektivität . . . . .	80

---

4.2.6	<i>Spike</i> -Wiederfindung . . . . .	81
4.2.7	Intraassay-Varianz: Parallele Immunpräzipitationen . . . . .	83
4.2.8	Interassay-Varianz und Normalisierung . . . . .	83
4.3	Anwendung des Assays auf eine unabhängige klinische Kohorte . . . . .	84
4.4	Methodenkritik, Limitationen der Studie und Ausblick . . . . .	86
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>90</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Qualitätskontrolle der hergestellten kovalent verknüpften 1E8-M280-Dynabeads (mit DMP) mittels Semi-Dry-Western-Blot-Analysen. . .	23
Abbildung 2:	Eichkurve des MSD-Assays zu Untersuchungen des präanalytischen Einfrieren: A $\beta$ 38 . . . . .	25
Abbildung 3:	Präanalytisches Einfrieren der IP-Eluate: A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 . . .	26
Abbildung 4:	Präanalytisches Einfrieren der IP-Eluate: A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio und A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio. . . . .	27
Abbildung 5:	Unterschied der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio und der A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio zwischen biomarkerpositiver und biomarkernegativer Gruppe der speziell ausgewählten Kohorte . . . . .	28
Abbildung 6:	Unterschied der gemessenen Peptidkonzentrationen zwischen biomarkerpositiver und biomarkernegativer Gruppe der speziell ausgewählten Kohorte . . . . .	29
Abbildung 7:	ROC-Kurve der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio und der A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio der speziell ausgewählten Kohorte . . . . .	30
Abbildung 8:	Vergleich der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio zwischen den zwei Messungen der speziell ausgewählten Kohorte . . . . .	30
Abbildung 9:	Untersuchung der Positionseffekte von A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 der Untersuchung mit dem MSD-Quick-Plex-Reader . . . . .	33
Abbildung 10:	IP aus unterschiedlichen Plasmavolumina: A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 . .	35
Abbildung 11:	A $\beta$ 42/A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio vor und nach Normalisierung . .	47
Abbildung 12:	Gemessene Peptidkonzentrationen vor und nach Normalisierung . . .	48
Abbildung 13:	Multiple lineare Regression mit der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Liquor als abhängige Variable und Geschlecht sowie Alter als unabhängige Variablen für die unabhängige Kohorte . . . . .	51
Abbildung 14:	Unterschied der nicht-normalisierten und normalisierten A $\beta$ 42/A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio zwischen Assay vier und fünf . . . . .	52
Abbildung 15:	Unterschied zwischen nicht-normalisiertem und normalisiertem A $\beta$ 38 und A $\beta$ 40 zwischen Assay vier und fünf . . . . .	53
Abbildung 16:	Unterschied zwischen nicht-normalisiertem und normalisiertem A $\beta$ 42 zwischen Assay vier und fünf . . . . .	54

---

Abbildung 17:	QQ-Plots von A $\beta$ 38 und A $\beta$ 40 der biomarkerpositiven Gruppe in der unabhängigen klinischen Kohorte ohne und mit Normalisierung im Plasma . . . . .	57
Abbildung 18:	QQ-Plots von A $\beta$ 42 und der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio der biomarkerpositiven Gruppe in der unabhängigen klinischen Kohorte ohne und mit Normalisierung im Plasma . . . . .	58
Abbildung 19:	QQ-Plots der A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio (biomarkerpositive Gruppe) und von A $\beta$ 38 (biomarkernegative Gruppe) in der unabhängigen klinischen Kohorte ohne und mit Normalisierung im Plasma . . . . .	59
Abbildung 20:	QQ-Plots von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 der biomarkernegativen Gruppe in der unabhängigen klinischen Kohorte ohne und mit Normalisierung im Plasma . . . . .	60
Abbildung 21:	QQ-Plots von A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio und der A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio der biomarkernegativen Gruppe in der unabhängigen klinischen Kohorte ohne und mit Normalisierung im Plasma . . . . .	61
Abbildung 22:	Signifikanzniveau von A $\beta$ 38 und A $\beta$ 40 in der unabhängigen klinischen Kohorte ohne und mit Normalisierung . . . . .	62
Abbildung 23:	Signifikanzniveau von A $\beta$ 42 und A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio der unabhängigen klinischen Kohorte ohne und mit Normalisierung . . . . .	63
Abbildung 24:	A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio in der unabhängigen klinischen Kohorte ohne und mit Normalisierung sowie die lineare Regression: Korrelation zwischen normalisierter A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Plasma und globalen Amyloid-PET-Daten bzw. der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Liquor . . . . .	64
Abbildung 25:	Lineare Regression: Korrelation zwischen normalisiertem A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 und der normalisierten A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Plasma und den im Liquor mittels MSD-Triplex gemessenen Peptidkonzentrationen sowie den globalen Amyloid-PET-Daten. . . . .	65

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Verbrauchsmaterialien . . . . .	7
Tabelle 2.2:	Chemikalien . . . . .	7
Tabelle 2.3:	Antikörper . . . . .	10
Tabelle 2.4:	Beads . . . . .	10
Tabelle 2.5:	Biologische Proben . . . . .	11
Tabelle 2.6:	Assay-Kits . . . . .	11
Tabelle 2.7:	Software . . . . .	11
Tabelle 2.8:	Geräte . . . . .	11
Tabelle 2.9:	Reagenzienansätze für das Cross-Linking der 1E8-M280-Dynabeads .	14
Tabelle 2.10:	Reagenzienansätze für die Immunpräzipitation (IP) . . . . .	15
Tabelle 2.11:	Ansatz für zwei Polyacrylamidgele . . . . .	17
Tabelle 2.12:	Ansätze für die Gelelektrophorese . . . . .	17
Tabelle 2.13:	Semi-Dry Western-Blot . . . . .	19
Tabelle 3.1:	Speziell ausgewählte Kohorte: A $\beta$ 42/A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio .	31
Tabelle 3.2:	LLOD in pg/ml gemittelt aus den fünf Assay-Durchläufen . . . . .	31
Tabelle 3.3:	Relative Wiederfindungsraten der Positionsproben . . . . .	32
Tabelle 3.4:	Varianzen zwischen 24 technischen Replikaten der Positionsproben .	34
Tabelle 3.5:	Prozentuale Konzentration der Peptide in den mit Diluent 35 verdünnten Plasmavolumina . . . . .	34
Tabelle 3.6:	Mittlere berechnete Konzentration der zwei unterschiedlichen Plasmavolumina sowie die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio und die A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio . .	36
Tabelle 3.7:	IP-Effizienz (Konzentrationen in pg/ml) . . . . .	37
Tabelle 3.8:	Assay Selektivität: Gemessene A $\beta$ -Konzentrationen in den 1E8 IP-Eluaten ohne und mit vorheriger A $\beta$ -Depletion durch Immunpräzipitation mit 6E10-M270-Magnetbeads (Konzentrationen in pg/ml) . . .	38
Tabelle 3.9:	Zusammensetzung des <i>Spike</i> -Mixes . . . . .	40
Tabelle 3.10:	Theoretische Konzentrationen der Amyloid- $\beta$ -Peptide in den <i>Spikes</i> (Konzentrationen in pg/ml) . . . . .	40
Tabelle 3.11:	Zusammensetzung der Proben mit <i>Spikes</i> [ $\mu$ l] . . . . .	40
Tabelle 3.12:	Gemessene Konzentrationen beim <i>Spiking</i> (Konzentrationen in pg/ml)	41
Tabelle 3.13:	<i>Spike</i> -Wiederfindung (Konzentrationen in pg/ml) . . . . .	41
Tabelle 3.14:	<i>Spike</i> -Wiederfindungsrate in % . . . . .	41
Tabelle 3.15:	Korrekturfaktoren berechnet aus den Kontrollproben von Platte 3 - 5	42

---

Tabelle 3.16:	Korrigierte <i>Spike</i> -Wiederfindung in % von A $\beta$ 42 mittels Korrekturfaktoren von Platte 1 - 5 (QC-Proben) . . . . .	43
Tabelle 3.17:	Korrigierte <i>Spike</i> -Wiederfindung in % von A $\beta$ 42 mittels Korrekturfaktoren von Platte 3 - 5 . . . . .	43
Tabelle 3.18:	Parallele Immunpräzipitationen (Konzentrationen in pg/ml) . . . . .	44
Tabelle 3.19:	Kontrollproben vor und nach Normalisierung . . . . .	46
Tabelle 3.20:	Korrekturfaktoren für die Normalisierung . . . . .	47
Tabelle 3.21:	Durchschnittliche %CV PL 1 - 3 der QC-Proben vor und nach Normalisierung . . . . .	49
Tabelle 3.22:	Charakterisierung der unabhängigen klinischen Kohorte . . . . .	50
Tabelle 3.23:	Korrelationsmatrix: Korrelationen der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio in Plasma und Liquor nach verschiedenen Messungen sowie globalen Amyloid-PET-Daten . . . . .	56

# Abkürzungsverzeichnis

%C	Anteil des Bisacrylamids am Acrylamidmonomer
%CV	prozentualer Variationskoeffizient
%T	Gesamtkonzentration der Acrylamidmonomere
A $\beta$ 38	A $\beta$ -Peptid, das an Position 38 (Gly) der Aminosäuresequenz endet, analog für A $\beta$ 40, A $\beta$ 42
AICD	Intrazelluläre APP-Domäne
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Precursor-Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AUC	<i>Area under the curve</i>
Bicine	N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-glycin
BM+	Biomarkerpositiv
BM-	Biomarkernegativ
BSA	Bovines Serumalbumin
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfonat
CSF	<i>Cerebrospinal fluid</i> , Liquor
CTF	Carboxy-terminales Fragment
DMP	Dimethylpimelidate
ECL	Elektrochemoluminiszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G



---

MCI	<i>Mild cognitive impairment</i> , Leichte kognitive Beeinträchtigung
MRT	Magnetresonanztomographie
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP	Probenaufnahmepuffer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
phospho-Tau	Phosphoryliertes Tau
PIB	Pittsburgh Compound B
POD	Peroxidase
PSEN1	Presenillin 1, analog zu Presenillin 2
p-Tau	phosphoryliertes Tau-Protein
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ROC	<i>Reciever Operating Characteristic</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i> , Standardisiertes Arbeitsprotokoll
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
t-Tau	Totales Tau, Gesamt-Tau

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie der Alzheimerkrankheit

In Deutschland leben nach Erhebungen der Deutschen Alzheimergesellschaft zurzeit ungefähr 1,7 Millionen Menschen mit Demenz. Bis 2050 könnten es bei einem jährlichen Zuwachs von 40.000 drei Millionen sein (Deutsche Alzheimer Gesellschaft 2018).

Weltweit wird von ungefähr 50 Millionen Betroffenen ausgegangen; bis 2040 wird mit bis zu 81 Millionen Betroffener gerechnet (Ferri et al. 2005). Andere Autoren gehen von ähnlichen Zahlen aus. So sind 2050 möglicherweise bis zu 106 Millionen Menschen weltweit betroffen, wovon 16,51 Millionen in Europa leben könnten (Brookmeyer et al. 2007).

Auch wenn diese Zahlen schwanken, zeigen sie doch das beträchtliche Ausmaß der Erkrankung. Da immer mehr Menschen in einer weltweit wachsenden Gesellschaft betroffen sind, die Erkrankung mit hohen Kosten (Wimo et al. 2017; Belger et al. 2019) und Stigmatisierung verbunden ist, ist es essentiell, die Alzheimerdemenz immer besser zu verstehen.

Die Demenz ist ein Syndrom, also eine Gruppe von Symptomen (The Alzheimer's Association 2018). Die Symptome sind vielfältig und betreffen diverse Domänen kognitiver Leistungen (McKhann et al. 2011). Die häufigste Ursache einer Demenz mit annähernd 60 % ist die Demenz vom Alzheimer-Typ (Lobo et al. 2000; Winblad et al. 2016).

Die Alzheimerkrankheit wird heute als ein Kontinuum betrachtet, das von asymptomatischen Stadien, über MCI (*Mild Cognitive Impairment*), bis zum symptomatischen Demenzstadium (Alzheimerdemenz) reicht (Lewczuk et al. 2018). Bezüglich des Zeitpunktes der Erkrankung wird in *early-* und *late-onset* unterteilt; ein Alter von unter 65 Jahren gilt als *Early-onset-Demenz* (The Alzheimer's Association 2018). Betroffen sind jedoch überwiegend ältere Menschen und Frauen: 44 % der an Alzheimerdemenz Erkrankten sind zwischen 75 – 85 Jahren alt. Der Anteil der unter Fünfundsechzigjährigen ist mit 4 % die kleinste Gruppe (The Alzheimer's Association 2018).

## 1.2 Diagnostik der Alzheimerkrankheit

Um die Alzheimerdemenz besser von anderen Demenzformen abzugrenzen, wurden 1984 die sogenannten NINCDS-ADRDA-Kriterien veröffentlicht (McKhann et al. 1984). Sie umfassten drei Kategorien: Die mögliche Alzheimerdemenz (*possible*), wahrscheinliche (*probable*) und die sichere (*definite*) Alzheimerdemenz. Die sichere Alzheimerdiagnose konnte allerdings erst post-mortem durch eine Autopsie gestellt werden. Die Diagnose wahrscheinliche Alzheimerde-

menz wurde nach Feststellung einer symptomatischen Demenz und dem Ausschluss anderer, gegebenenfalls reversibler, Ursachen gestellt und die Kategorie der möglichen Alzheimerdemenz blieb für diejenigen Fälle, bei denen nicht ausreichend Informationen verfügbar waren (McKhann et al. 1984; Lewczuk et al. 2018).

Diese diagnostischen Leitlinien von 1984 wurden 2011 überarbeitet und schließen jetzt zusätzlich Biomarker und Bildgebungsdaten ein (McKhann et al. 2011). Zudem wurde die Alzheimerdemenz erstmalig als ein Kontinuum betrachtet, das früher beginnt als die Phase der symptomatischen Demenz. Die Nomenklatur wurde beibehalten (NIA-AA-Kriterien).

Dennoch ist die Diagnose mit einer gewissen Ungenauigkeit verbunden, da sie insbesondere in frühen Stadien durch die unterschiedlichen Symptome erschwert sein kann und es nach wie vor keine absoluten Kriterien in der Routinediagnostik gibt (Galvin und Sadowsky 2012). Des Weiteren beträgt die Spezifität der überarbeiteten NINCDS-ADRDA-Kriterien gegenüber anderen Demenzformen bisher erst zwischen 23 – 88 % (Dubois et al. 2007).

Nichts estotrotz kann die Alzheimerdemenz heute, im Gegensatz zu früher, von der Alzheimerkrankheit unterschieden werden: Die Alzheimerkrankheit beschreibt das Kontinuum, das außer der Alzheimerdemenz noch die Phasen der prodromalen beziehungsweise präklinischen Alzheimerdemenz und MCI umfasst. Das Konzept des MCI ist seit einigen Jahrzehnten etabliert (Petersen et al. 1999; Reisberg et al. 2008; Lewczuk et al. 2018). Gelegentlich wird das Stadium der prodromalen Alzheimerdemenz dem MCI zugeordnet (Galvin und Sadowsky 2012). Die Differenzierung zwischen den Stadien wird heute durch den multimodalen Ansatz gefördert (Galvin und Sadowsky 2012). Die Zuordnung zum Stadium des MCI ist allerdings zum Teil wenig sensitiv und spezifisch; allerdings ist diese erste Einordnung entscheidend für den weiteren Verlauf (Dubois et al. 2007).

Ethische Bedenken gegenüber einer frühen oder gar einer prädiktiven Diagnostik sind zahlreich: Diese sind vor allem im Spannungsfeld zwischen dem „Recht auf Wissen“ und dem „Wunsch des Nichtwissens“ zu finden (Vanderschaeghe et al. 2018). Da es bisher nur begrenzte Therapiemöglichkeiten gibt, darf die Belastung, die aus einer frühen Diagnose für Betroffene und Angehörige resultiert, nicht außer Acht gelassen werden (Vanderschaeghe et al. 2018).

Bedacht werden muss auch eine eventuelle „Überdiagnose“ (Langa und Burke 2019). Folgen, die daraus resultieren sind zum Beispiel erhöhte Medikamentengabe ohne Gewinn für die Patienten oder steigende Kosten für das Gesundheitssystem (Langa und Burke 2019). Da bisher nur die Symptome, nicht die Ursachen behandelt werden können, kann die Lebensqualität mit den vier bisher zugelassenen Medikamenten verbessert werden und die Progression verlangsamt, aber nicht aufgehalten werden (Weller und Budson 2018). Ein früherer Therapiebeginn kann jedoch einen besseren Verlauf induzieren (Wiltfang et al. 2001). Mögliche Theorien für ursächliche Therapien umfassen heute die Produktion und Akkumulation der Amyloid- $\beta$ -Peptide zu bremsen oder den Abbau zu erhöhen (Weller und Budson 2018).

Die Alzheimerdemenz führt zur Atrophie bestimmter Hirnregionen. Am häufigsten sind der Temporallappen und der Hippocampus betroffen (Jack et al. 2002). Die Atrophie und die damit einhergehenden Stoffwechselveränderungen nutzen die bildgebenden Diagnostikverfahren. Im Wesentlichen gibt es derzeit vier Bildgebungsverfahren: MRT, fMRT, Magnetreso-

nanzspektroskopie und FDG- oder Amyloid-PET (Hampel et al. 2010). Insbesondere das Amyloid-PET ist gut geeignet, um die Alzheimerkrankheit bereits in frühen Stadien mit hoher Sensitivität und Spezifität zu diagnostizieren (Dubois et al. 2007).

### 1.3 Genetische Komponenten der Alzheimerkrankheit

Die Alzheimerkrankheit kann familiär vererbt werden oder sporadisch, also gelegentlich, auftreten. Noch ist keine Genmutation bekannt, die als ursächlich für die sporadische Alzheimerdemenz betrachtet werden kann. Es gibt jedoch zahlreiche Nachweise, dass das Vorliegen gewisser genetischer Merkmale das Risiko für eine Alzheimerdemenz erhöht.

Als größter Risikofaktor sowohl für die early-onset als auch die late-onset-Alzheimerdemenz gilt APOE  $\epsilon 4$ . Es liegt auf Chromosom 19 und kodiert die Expression des Apolipoproteins ApoE (Corder et al. 1993). Durch drei verschiedene Allele ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ ) sind unterschiedliche Ausprägungen möglich, wobei das Vorliegen von zwei Allelen APOE  $\epsilon 4$  das Risiko für eine Alzheimerdemenz zwölfmal erhöht (Michaelson 2014).

Zusätzlich haben homozygote Merkmalsträger eine Wahrscheinlichkeit von 50 % in ihrem Leben eine Alzheimerdemenz zu entwickeln (Scheltens et al. 2016). Des Weiteren sind die autosomal dominanten Mutationen in den Genen PSEN1 und PSEN2, dem Gen für APP auf Chromosom 21 und folglich das Down-Syndrom sowie Gene auf Chromosom 14 mit einem höheren Risiko verbunden (Corder et al. 1993; Lewczuk und Wiltfang 2008; Head et al. 2012; The Alzheimer's Association 2018). Liegen diese Variationen vor, ist auch der Erkrankungszeitpunkt meist früher (Michaelson 2014; The Alzheimer's Association 2018).

### 1.4 Neuropathologie der Alzheimerkrankheit

Als Ursache für die Entstehung der Amyloid- $\beta$ -Plaques ist die Amyloid-Kaskaden-Hypothese etabliert (Selkoe 1991; Hardy und Higgins 1992; Selkoe 2001; Hardy und Selkoe 2002): Die Amyloid- $\beta$ -Peptide entstehen in unterschiedlichen Längen durch enzymatische Spaltung aus dem Vorläuferprotein APP. Die Sequenz der Aminosäuren ist dabei identisch (Kang et al. 1987; Hansson et al. 2010). Die Peptide können sowohl am N-terminalen Ende (Aminogruppe) als auch am C-terminalen Ende (Carboxy-Gruppe) kürzer oder länger sein (Maler et al. 2007). Dabei befindet sich die erste Aminosäure, Aspartat, am N-terminalen Ende. A $\beta$ 1-40 bedeutet demnach, dass es C-terminal um zwei Aminosäuren kürzer ist, als die in den neuritischen Amyloid-Plaques häufiger vorkommende Variante A $\beta$ 1-42. Es konnte gezeigt werden, dass im Plasma mehr veränderte Varianten vorliegen als im Liquor (Maler et al. 2007).

Die Sekretion von Amyloid- $\beta$ -Peptiden ist allerdings ein physiologischer sekretorischer Vorgang von Zellen (Busciglio et al. 1993). Die physiologische Funktion der Amyloid- $\beta$ -Peptide ist noch nicht geklärt. Vermutlich erfüllen sie eine Funktion in der normalen Kommunikation zwischen Nervenzellen (Abramov et al. 2009). Pathophysiologisch führen die Amyloid- $\beta$ -Peptide

zu inflammatorischen Prozessen und Neurodegeneration (Rogers et al. 1996). Es ist unklar, wodurch es zur Ablagerung und Plauebildung der Amyloid- $\beta$ -Peptide kommt und verschiedene Hypothesen werden dazu diskutiert (Spies et al. 2012). Vor allem die aggregierten Peptide sind neurotoxischer als die löslichen Formen (Yankner et al. 1990; Wiltfang et al. 2001). Dabei ist unklar, wodurch es zum Zelluntergang kommt (Bates et al. 2009). Diskutiert werden lösliche Oligomere, da gezeigt wurde, dass dessen Menge mit dem Grad der neuronalen Veränderung und Demenz korreliert (Wang et al. 1999; Bates et al. 2009).

Es wurde nachgewiesen, dass Amyloid- $\beta$ -Peptide, die außerhalb der Neurone akkumulieren, schon bis zu 20 oder sogar 30 Jahre vor der Demenz vorhanden sind (Jansen et al. 2015). Sie sind demnach die Biomarker, die sich im Verlauf der Alzheimerkrankheit als erster Biomarker pathologisch verändern (Jack et al. 2018).

Ob sich mit bestätigten Amyloid-Markern im Liquor eine Voraussage über die Konversion vom asymptomatischem Stadium, zu MCI und zur Alzheimerdemenz treffen lässt, wird derzeit noch erforscht. Manche Publikationen beobachteten, dass mittels A $\beta$ 42 und der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40- bzw. A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio im Liquor eine Voraussage möglich war (Hansson et al. 2006; Buchhave et al. 2012; Lewczuk et al. 2010; 2015), zumindest eine andere wiederum konnte dies nicht bestätigen (Kern et al. 2018).

## 1.5 Biomarker der Alzheimerkrankheit

Anerkannte Biomarker für die Alzheimerdemenz sind im Liquor die Amyloid- $\beta$ -Peptide und ihre Ratios sowie erhöhtes Gesamt-Tau und phospho-Tau (Andreasen et al. 2003; Lewczuk et al. 2018). Eine Erniedrigung des A $\beta$ 42 und der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Liquor bei weitgehend unverändertem A $\beta$ 40 ist derzeit wissenschaftlicher Konsens als Marker für eine Alzheimerdemenz (Lewczuk et al. 2018). Allerdings gibt es noch keine einheitlichen Referenzwerte für die unterschiedlichen Messmethoden und bei einem Teil der Patienten mit klinischen Symptomen konnte keine Veränderung der Biomarker im Liquor festgestellt werden (von Arnim et al. 2019).

Aber auch bei vorliegenden pathologischen Veränderungen von Amyloid- $\beta$ -Peptiden mit oder ohne Veränderungen von Tau kommt es nicht immer zu einer Demenz, da bei kognitiv Gesunden zwischen 50 und 90 Jahren in 10 – 44 % eine Amyloidpathologie vorliegt wie Jansen et al. (2015) zeigen konnten. Es muss bedacht werden, dass einer Demenz viele unterschiedliche Ursachen zu Grunde liegen, sich viele dabei überschneiden (Gauthier et al. 2018) und die Einteilung noch nicht immer ausreichend sensitiv und spezifisch ist (Dubois et al. 2007). Amyloid- $\beta$ -Peptide könnten allerdings zur Differentialdiagnostik der Demenzen verwendet werden, auch oder insbesondere, weil ihre Veränderungen auch bei anderen Demenzformen nachweisbar sind (Ashton et al. 2020). Die Verwendung von Biomarkern bezüglich Alzheimerdemenz findet zurzeit insbesondere in den Bereichen Früherkennung, Therapiemanagement und Diagnostik statt (Lewczuk et al. 2018).

Ein Biomarker ist ein Indikator für eine Krankheit oder für das Risiko eine Krankheit zu

entwickeln. Nach der Biomarkers Definition Working Group (Group 2001) ist er folgendermaßen definiert: „*A characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention*“.

Daraus lassen sich die wesentlichen Funktionen, die der Biomarker erfüllen muss, ableiten. Lewczuk et al. (2018) fassen zusammen, dass der optimale Biomarker zur Detektion der Alzheimerschen Erkrankung die grundlegende Neuropathologie erkennen und in bestätigten Fällen der Erkrankung validiert worden sein sollte, sowie eine gute Früherkennung leisten und die Alzheimerdemenz sicher von anderen Demenzformen unterscheiden können soll.

Anforderungen an ein laborchemisches Testverfahren, das einen Biomarker untersucht, bestehen vor allem bezüglich Verlässlichkeit und Wiederholbarkeit. Es sollte nicht-invasiv, leicht durchführbar und günstig sein. Die jeweilige Sensitivität und Spezifität sollten bei  $> 85\%$  liegen. Die Prävalenz, der positiv prädiktive Wert und der negativ prädiktive Wert sollten bestimmt sein (Group 1998; Frank und Hargreaves 2003).

Bisher gibt es dafür kein schnelles, günstiges und zugleich minimal invasives Verfahren: Die Liquorpunktion zur Gewinnung von Amyloid- $\beta$ -Peptiden ist ein invasives Verfahren; die außerhalb der Routine stattfindende Bildgebung aufwendig und kostenintensiv.

Ziel ist es daher einen einfachen, schnellen, kostengünstigen und sicheren Test für die Biomarker der Alzheimerdemenz zu entwickeln. Etablierte Messverfahren für die Amyloid- $\beta$ -Peptide im Plasma sind ELISA sowie Assays von Luminex und Meso Scale Discovery (Hampel et al. 2010). Ein blutbasiertes Testverfahren könnte zukünftig den diagnostischen Schritt darstellen, der die Verbindung zwischen klinischer Einschätzung und Bildgebung bildet.

In humanem Plasma sind die Amyloid- $\beta$ -Peptide als Biomarker für die Alzheimerdemenz von großem Interesse. Die Blut-Hirnschranke können sie in beide Richtungen überqueren (Deane et al. 2009; Spies et al. 2012; Roberts et al. 2014; Ovod et al. 2017). Es wird geschätzt, dass 30 - 50 % der Amyloid- $\beta$ -Peptide im Blut aus dem Gehirn stammen (Roberts et al. 2014). Im Blut finden sich zahlreiche Faktoren, die die Messungen beeinflussen. Dazu zählen zum Beispiel biologische Schwankungen, Vorerkrankungen oder Matrix-Effekte durch Proteine (Janelidze et al. 2016a; Schauer et al. 2018). Die Messung wird erschwert durch die deutlich geringeren Konzentrationen als im Liquor (Vanderstichele et al. 2000; Lewczuk et al. 2004a; Bates et al. 2009).

Für A $\beta$ 42 sowie die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Plasma konnte bereits gezeigt werden, dass sie früh Veränderungen reflektieren und signifikant reduziert sind bei Patienten mit MCI oder Alzheimerdemenz (Lewczuk et al. 2009; 2010; Schindler et al. 2019). Plasma A $\beta$ 42 und die Plasma A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio scheinen insbesondere vielversprechende Biomarkerkandidaten zu sein, da vor allem neuere Publikationen gute diagnostische Aussagekraft bei Kombination mit Bildgebungsverfahren wie dem Amyloid-PET zeigen (Ovod et al. 2017; Nakamura et al. 2018a; Bruun et al. 2018; Schindler et al. 2019; Doecke et al. 2020).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit wurde ein neu entwickelter Zweischritt-Assay (Shahpasand-Kroner et al. 2018) zur Messung des A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Quotienten in humanem Blutplasma im Rahmen einer „*Fit-for purpose*“-Validierung anhand von vordefinierten und ausgewählten Qualitätskriterien überprüft. Im zweiten Schritt sollte getestet werden, ob sich die von Shahpasand-Kroner et al. (2018) mit diesem Assay beobachtete statistisch signifikante Erniedrigung des A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Quotienten in Patienten mit einer Alzheimerkrankheit in einer kleinen, unabhängigen klinischen Kohorte bestätigen lässt.

Im Weiteren wurden gezielte Validierungsexperimente zur Überprüfung der technischen Qualität des Zweischritt-Assays durchgeführt. Es wurden kovalent vernetzte Magnetbeads für die Immunpräzipitation hergestellt und ihre Funktion mittels Semi-Dry-Western-Blot-Analysen überprüft. Um die Amyloid- $\beta$ -Peptide zu messen, wurden sie zuerst mittels Immunpräzipitation aus humanem EDTA-Blutplasma angereichert und anschließend mit einem immunologischen Multiplex-Chemolumineszenzreadout quantifiziert.

Es wurden die relativen Konzentrationen der Amyloid- $\beta$ -Peptide A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 gemessen sowie die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40- und die A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio im Plasma bestimmt.

Initial wurde überprüft, inwiefern Einfrier- und Auftauvorgänge einen Einfluss auf die Peptide haben und ob es möglich ist, die mittels Immunpräzipitation aus dem Blutplasma angereicherten A $\beta$ -Peptide vor der Messung in eingefrorenem Zustand zwischenzulagern und so den experimentellen Ablauf zu erleichtern. Frühere Publikationen hatten einen Einfluss von Einfrier- und Auftauvorgängen auf die messbaren Konzentrationen (Vanderstichele et al. 2000; Lewczuk et al. 2004a) gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Intra- und Interassayvarianz, LLOD und LLOQ, Positionseffekte während der Messung mit dem Multiplex-Chemolumineszenzreadout, *Parallelism*, Assay-Selektivität, *Spiking*, die Effizienz der Immunpräzipitation (IP) sowie der Einfluss unterschiedlicher Volumina kontrolliert.

Überprüft wurde weiterhin, ob der von Shahpasand-Kroner et al. (2018) festgestellte Biomarker in einer speziell ausgewählten Teilkohorte aus der gleichen Stichprobe, die dort untersucht wurde, mit einem modifizierten Protokoll reproduziert werden kann, bei dem die mit IP angereicherten A $\beta$ -Peptide vor der eigentlichen Messung bei -80 °C zwischengelagert werden. Anschließend wurde das modifizierte Verfahren auf eine unabhängige klinische Stichprobe angewendet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.1: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller/Lieferant
Abdeckfolie Easyséal transparent, 79 x 135 mm	greiner bio-one, Kremsmünster (Ö)
Einweg-Pasteur-Pipetten	Carl Roth, Karlsruhe
Combitips advanced 10 ml	Eppendorf, Hamburg
ep T.I.P.S. Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Extra thick blotpaper	BioRad, München
MULTI-SPOT 96-well, 4 Spot Plate, Aß Peptide Panel 1	Meso Scale Discovery, Rockville, Maryland (US)
LoBind Protein Tubes 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
PVDF-Membran	Millipore über TH.GEYER
Safe-Lock Mikroreaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sicherheitsreaktionsgefäße Braun, 5 ml PP	LABSOLUTE über TH.GEYER
Tubes 15 ml, 50 ml PP	greiner bio-one, Kremsmünster (Ö)

#### 2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2.2: Chemikalien

Material	Hersteller/Lieferant
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe



Tabelle 2.2: Chemikalien

Material	Hersteller/Liferant
10 % w/v SDS	Biomol, Hamburg
A $\beta$ 40-Blocker	Meso Scale Discovery, Rockville, Maryland (US)
A $\beta$ -Peptide Standard A $\beta$ 1-38	Meso Scale Discovery, Rockville, Maryland (US)
A $\beta$ -Peptide Standard A $\beta$ 1-40	Meso Scale Discovery, Rockville, Maryland (US)
A $\beta$ -Peptide Standard A $\beta$ 1-42	Meso Scale Discovery, Rockville, Maryland (US)
APS	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Albumin Fraktion V, biotinfrei (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Bicine, ultra pure	Biomol, Hamburg
Bis-Tris	Biomol, Hamburg
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
CHAPS	Genaxxon Bioscience, Ulm
Complete-mini mit EDTA	Roche
Diluent 35	Meso Scale Discovery, Rockville, Maryland (US)
Diluent 100	Meso Scale Discovery, Rockville, Maryland (US)
Detection Antibody	Meso Scale Discovery, Rockville, Maryland (US)
DMP (Dimethyl pimelidate)	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts (US)
Fertigacrylamidlösung (Rotiphorese Gel 40 (19:1))	Carl Roth, Karlsruhe
Fertigacrylamidlösung (Rotiphorese Gel (29:1))	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle 2.2: Chemikalien

Material	Hersteller/Liferant
ECL Advance Blocking Reagent	Sigma Aldrich, Taufkirchen
HCl	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe
Igepal CA630 (Nonidet P40, NP40)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol/2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe
Luminol Enhancer Solution (Solution A)	GE Healthcare, München
Peroxide Solution (Solution B)	GE Healthcare, München
Methanol	VWR, Darmstadt
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
Na-DOC (Natriumdesoxycholat)	Carl Roth, Karlsruhe
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe
PBS Dulbecco w/o Ca und Mg	Biochrom, Darmstadt
PVDF-Membran	BioRad, München
Read Buffer T	Meso Scale Discovery, Rockville, Maryland (US)
SDS	Applichem, Darmstadt
Streptavidin POD	Amersham, Freiburg
Sucrose	Sigma Aldrich, Taufkirchen
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Triethanolamin	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Urea	AppliChem, Darmstadt
WM100, YesBlot TM Western	SMO BIO, Hsinchu City 308,

Tabelle 2.2: Chemikalien

Material	Hersteller/Liferant
Marker 1 250 $\mu$ l	Taiwan, R.O.C

### 2.1.3 Antikörper

Tabelle 2.3: Antikörper

Material	Hersteller/Liferant
1E8 (Anti-human A $\beta$ )	Nanotools, Teningen
6E10 (Anti-human A $\beta$ )	Covance, Denver, Pennsylvania (US)
HT7 (Anti-human Tau, HAT7)	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts (US)
MAB2 Biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L)	BA-2000 Vector Laboratories INC, Burlingame, Kalifornien (US)

### 2.1.4 Beads

Tabelle 2.4: Beads

Material	Hersteller/Liferant
Dynabeads M270 Epoxy-Beads	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien (US)
Dynabeads M280 Sheep antiMouse IgG	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien (US)

### 2.1.5 Biologische Proben

Tabelle 2.5: Biologische Proben

Material	Hersteller/Liferant
EDTA-Plasmaproben, human	Biobank der Psychiatrie der UMG
CSF Pooled Normal Human CSF Innovative Research Inc.	Peary Court, Novi, MI48377

### 2.1.6 Assay-Kits

Tabelle 2.6: Assay-Kits

Material	Hersteller/Liferant
V-PLEX Kit A $\beta$ Peptide Panel 1 (6E10)	Meso Scale Discovery, Rockville, Maryland (US)

### 2.1.7 Software

Tabelle 2.7: Software

Material	Hersteller/Liferant
Graph Pad Prism Version 6	Graph Pad Software Inc., La Jolla, USA
Microsoft Office Excel	Microsoft Corporation, Syracuse, New York (US)
MSD Discovery Workbench 4.0	Meso Scale Discovery, Rockville, Maryland (US)
R Version 3.5.1	R Core Team, Wien (Ö)

### 2.1.8 Geräte

Tabelle 2.8: Geräte

Material	Hersteller/Liferant
-80°C-Freezer	Panasonic, Hamburg
Entris Fein- und Analysenwaage	Sartorius, Göttingen

Tabelle 2.8: Geräte

Material	Hersteller/Lieferant
Easypet Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research Plus, 8 Kanal Pipette	Eppendorf, Hamburg
Fusion SL (Blot Imager)	Vilber, Eberhardzell
Magnetic stirrer	STARLAB, Hamburg
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg
Mini-Protean Tetra System plus Zubehör (Elektrophorese)	BIO-RAD Laboratories, München
Mini Spin Tischzentrifuge	Labnet, Edison, NJ (US)
MSD Quickplex Reader	Meso Scale Discovery, Rockville, Maryland (US)
Multipette M4	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	SI-Analytics, Mainz
Power Supply (Elektrophorese)	BioRad, München
Rocking shaker	STARLAB, Hamburg
TE77X Semi-Dry Transfer Unit (Western Blot)	SERVA, Heidelberg
Thermomix Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischwaage	KERN, Balingen-Frommern
Transferpette S, diverse	Brand, Wertheim
Tube Roller	STARLAB, Hamburg
Vortex-Schüttler	STARLAB, Hamburg
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Herstellung und Cross-Linking der Dynabeads

Dynabeads sind magnetische polymere Partikel, die kovalent mit einem anti-Maus-IgG vom Schaf gekoppelt sind. Zuerst erfolgten zwei Waschschrte. Dazu wurde je 1 ml Dynabeads in sechs 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Vor jedem Überführen wurde die Stammsuspension mit den Dynabeads einmal auf dem Vortexer gemischt (Stammsuspension:  $6-7 \times 10^8$  Beads/ml in PBS pH 7,4, 0,1 % BSA, 0,02 % Acid).

Die sechs Reaktionsgefäße wurden für zwei Minuten mit offenem Deckel in den Magnetständer gestellt, der Überstand wurde abgenommen und dann wurden je 1 ml PBS/BSA dazu gegeben. Nach Mischen auf dem Vortexer wurden sie für drei Minuten bei RT bei 800 rpm auf den Schüttler gestellt. Im Anschluss wurden sie kurz anzentrifugiert und für weitere zwei Minuten in den Magnetständer gestellt. Der zweite Waschschrte erfolgte analog zum beschriebenen Prozedere.

Nach dem letzten Abnehmen des Überstands wurde erneut 1 ml PBS/BSA dazugegeben, sowie 40 µg Antikörper, die je 26,8 µl Standardsuspension pro Reaktionsgefäß entsprachen (Ausgangskonzentration der Standardsuspension  $1E8$  1,49 mg/ml). Über Nacht wurden sie bei 4 °C und 1400 rpm auf dem Schüttler inkubiert.

Ziel des Cross-Linkings ist es die Anti-Sheep-IgG auf den Dynabeads mit den  $1E8$ -Antikörpern zu verbinden. Cross-Linker war das DMP. Für das kovalente Cross-Linking der Dynabeads wurden sie nach der Inkubation über Nacht viermal für 30 Minuten bei 4 °C mit PBS/BSA gewaschen. Nach diesem Schritt wurden 250 µl ungekoppelte Dynabeads entnommen, um sie als Kontrolle für die SDS-Page zu verwenden. Sie wurden mit 0,02 % Natrium-Azid versetzt, um eine Bewachsung zu verhindern. Ein weiterer Waschschrte mit je 1 ml PBS/BSA für fünf Minuten bei RT erfolgte, gefolgt von zwei Waschschrten mit je 1 ml 0,2 M Triethanolamin. Nach Abnahme des letzten Triethanolamin-Überstandes wurde in fünf der sechs Reaktionsgefäße 1 ml 0,5 % DMP/Triethanolaminlösung gegeben. Im letzten Reaktionsgefäß, aus dem die 250 µl entnommen wurden, wurden nur 750 µl hinzugefügt.

Es folgte eine weitere Inkubation für eine Stunde bei RT und 800 rpm. Nach kurzem Anzentrifugieren und zwei Minuten auf dem Magnetständer wurde der Überstand vollständig abgenommen und 1 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,5 hinzugefügt und erneut für fünf Minuten auf den Schüttler gestellt.

Danach wurden die Beads analog zu bisherigen Waschschrten drei Mal für je fünf Minuten bei RT mit je 1 ml PBS/BSA gewaschen. Zur Fertigstellung wurde nach Abnahme des letzten Überstands ein letztes Mal PBS/BSA dazugegeben sowie 0,02 % Natrium-Azid. In fünf von sechs Reaktionsgefäße wurden je 1ml PBS/0,1 % BSA und 10 µl 0,02 % Natrium-Acid gegeben. In das letzte Eppendorf-Cup mit 750 µl Beads jedoch nur 750 µl PBS/BSA mit 7,5 µl 0,02 % Natrium-Azid. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

Tabelle 2.9: Reagenzienansätze für das Cross-Linking der 1E8-M280-Dynabeads

PBS/0,1 % BSA-Lösung	0,1 g BSA 100 ml PBS
50 ml Triethanolamin-Lösung	1,5 g Triethanolamin 50 ml Bidest
0,5 % DMP/Triethanolamin-Lösung	0,61 g Tris 7 ml 0,2 M Triethanolamin
PBS/0,1 % BSA/0,02 % Na-Azid	100 $\mu$ l 2 % w/v Na-Azid 10 ml PBS/0,1 % BSA

### 2.2.2 Immunpräzipitation

Mit der Immunpräzipitation (IP) werden durch einen Antikörper die Antigene, die untersucht werden sollen (in diesem Fall A $\beta$ -Peptide), aus dem Probenplasma isoliert. Dazu wurden 500  $\mu$ l Plasmaproben für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut. Der bei -20 °C gelagerte 5fach-IP-Puffer wurde zum Auftauen für 30 Minuten in den Kühlschrank bei 4 °C gestellt. Anschließend wurden die Plasmaproben vollständig in Reaktionsgefäße überführt und für zehn Minuten bei 10000g und RT zentrifugiert.

In Low-binding-Reaktionsgefäße wurden je 100  $\mu$ l 5fach-IP-Puffer vorgelegt. Nach dem Zentrifugieren wurden je 400  $\mu$ l der Probe ohne Pellet am Boden abgenommen, zu dem 5fach-IP-Puffer gegeben und kurz mit dem Vortex-Schüttler gemischt.

In jedes Eppendorf-Cup wurden 25  $\mu$ l 1E8-M280-Dynabeads gegeben. Dazu wurde das Eppendorf-Cup mit den Dynabeads vor jeder Abnahme auf dem Vortex-Schüttler gemischt und die Probe nach Zugabe ebenfalls gemischt, da sich die Dynabeads sehr schnell am Boden absetzen.

Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler mit 1400 rpm inkubiert. Dies dient der Bindung der A $\beta$ -Peptide an die 1E8-M280-Dynabeads. Am folgenden Tag wurden die Proben aus der Kühlung geholt, kurz zentrifugiert und für zwei Minuten in den Magnetständer gestellt.

Der danach abgenommene Überstand wurde wahlweise aufgehoben oder verworfen und der erste von drei Waschschritten mit je 1 ml PBS/0,1 % BSA begonnen. Je 1 ml PBS/0,1 % BSA wurden zu den Beads gegeben und mittels des Vortex-Schüttlers gemischt. Für fünf Minuten bei RT und 800 rpm wurden die Proben in den Thermomixer gestellt. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und wieder in den Magnetständer gestellt.

Im Anschluss erfolgte ein Waschschritt mit je 1 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 für drei Minuten. Diesmal jedoch wurden 100  $\mu$ l vom Überstand belassen. Die Probe wurde erneut mit dem

Vortex-Schüttler gemischt, zentrifugiert und für eine Minute in den Magnetständer gestellt. Der Rest des 10 mM Tris/HCl pH 7,5 Puffers wurde abgenommen.

Daran schloss sich direkt die Elution an. Mittels der Elution werden die A $\beta$ -Peptide wieder von den 1E8-Antikörpern gelöst. Dazu erfolgte die Zugabe von je 30  $\mu$ l Bicine/CHAPS-Puffer und anschließend die Denaturierung der Proteine (Immunglobuline) und der gebundenen Peptide für fünf Minuten bei 95 °C.

Der nun von den 1E8-M280-Dynabeads abzunehmende Überstand enthielt die A $\beta$ -Peptide. Um sie später auf die Gelelektrophorese aufladen zu können, wurden 10  $\mu$ l Eluat mit 10  $\mu$ l 2fach-PAP (Probenaufnahmepuffer) erneut für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend bei -20 °C eingelagert. Um die Proben im MSD-V-Plex-Assay messen zu können, wurden je 25  $\mu$ l Eluat mit 95  $\mu$ l Diluent 35 gemischt. Aus den erhaltenen 120  $\mu$ l lassen sich vier technische Replikate im Assay messen.

Tabelle 2.10: Reagenzienansätze für die Immunpräzipitation (IP)

PBS/0,1 % BSA-Lösung	0,1 g BSA 100 ml PBS
5fach-IP-Puffer	2,4 ml Bidest 3 ml 1M HEPES/NaOH pH 7,4 1,8 ml NaCl 3 ml 10 % v/v Igepal CA630 (Nonidet P40, NP40) 1,5 ml 10 % w/v Natriumdesoxycholat 300 $\mu$ l w/v SDS 6 Tabletten Complete-mini (Proteasen-Inhibitor) + EDTA
2fach-Probenaufnahmepuffer	3 g Bistris 1,04 g Bicine 6 g Sucrose 4 ml 10 % w/v SDS 3 ml 0,1 % w/v Bromphenolblau 5 ml Bidest ad 20 ml
50 mM Tris/HCl pH 7,5	0,61 g Tris 60 ml Bidest 1 N HCl auf pH 7,5 ad 100 ml
2fach-Bicine/CHAPS-Puffer	2 ml 1M Bicine/NaOH pH 7,6 0,6 g CHAPS ad 50 ml



Tabelle 2.10: Reagenzienansätze für die Immunpräzipitation (IP)

1M Bicine/NaOH pH 7,6	16,17 g Bicine 50 ml Bidest 1N NaOH auf pH 7,6 ad 100 ml
1 M HEPES/NaOH pH 7,4	23,83 g HEPES 70 ml Bidest 6 N NaOH auf pH 7,4 ad 100 ml
6 N NaOH	24 g NaOH 100 ml Bidest

### 2.2.3 Bicine/Tris-SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Page dient dazu, die einzelnen A $\beta$ -Fraktionen aufzutrennen. Indem ein elektrisches Feld zwischen positiv geladener Anode und negativ geladener Kathode erzeugt wird, werden Proteine nach Größe, Ladung und Struktur aufgetrennt (Kremer und Bannwarth 2011).

Die Lauffront, sichtbar gemacht durch Bromphenolblau, wandert von der Kathode zur Anode. In der Regel wandern größere Proteine wesentlich weniger weit als kleinere Proteine, da sie durch ihre Größe nur langsam und weniger gut durch die Poren des Polyacrylamidgels gelangen (Rüchel et al. 1978).

In einer Gelelektrophorese ohne Harnstoff laufen die A $\beta$ -Peptide als eine Bande; sie trennen sich erst in Anwesenheit von 8 M Harnstoff (Klafki et al. 1996). Es konnte gezeigt werden, dass dies vermutlich durch die Anwesenheit von 8 M Harnstoff bedingt ist, wodurch sich in Abhängigkeit der Hydrophobie am C-Terminus unterschiedlich viel SDS anlagert (Kawooya et al. 2003).

SDS ist ein negativ geladenes anionisches Detergens. Mit seinem hydrophoben Anteil kann SDS in Abhängigkeit der Anzahl hydrophober Aminosäuren an den hydrophoben C-Terminus eines A $\beta$ -Peptids binden (Kawooya et al. 2003). Dadurch zeigen die A $\beta$ -Peptide in der Gelelektrophorese ein paradoxes Laufverhalten und teilen sich nach ihrer Ladung und nicht nach der Größe auf.

Die SDS-Page besteht aus drei zusammengesetzten Gelen: Trenngel, Sammelgel und Kammgel. Die Lösung des Trenngels wurde zwischen die beiden Glasplatten gefüllt und mit 20 % v/v Isopropanol überschichtet, um eine glatte Kante zu erhalten. Nach fünfzehn Minuten war die Polymerisation abgeschlossen.

20 % v/v Isopropanol wurde verworfen und 250  $\mu$ l Sammelgel sowie 20 % v/v Isopropanol über das Trenngel geschichtet. Nach zwanzig Minuten wurde das Isopropanol erneut verworfen, das

Kammgel über das Sammelgel gegossen und die Kämme eingesteckt. Die Polymerisationszeit betrug 45 Minuten.

Im Anschluss konnten die Kämme aus dem Gel gezogen werden und die Geltaschen mit Schachtpuffer gereinigt und gefüllt werden. Die Gelplatten wurden in die Elektrophoresekammer geklemmt; zwischen die beiden Platten wurde der Kathodenpuffer eingefüllt und außen, um die Platten herum, der Anodenpuffer.

Anschließend wurden die Proben aufgeladen. Dabei wurde wegen Randeffekten jeweils die äußerste Spur nicht beladen und zusätzlich eine Verdünnungsreihe synthetischer A $\beta$ -Peptide aufgetragen. Die SDS-Page wurde mit je 25mA/Gel durchgeführt. Beendet wurde die Elektrophorese, nachdem die mit Bromphenolblau gefärbte Lauffront am unteren Ende des Gels angekommen war.

Tabelle 2.11: Ansatz für zwei Polyarcylamidgele

	Trenngel		Sammelgel	Kammgel
Chemikalien				
Harnstoff [g]	4,8	Sammelgelpuffer [ml]	2	2
Trenngelpuffer [ml]	2,5	40 % T 3,4 % C [ml]	0,6	0,6
40 % T 5,2 % C [ml]	3	1 % SDS [ml]	1	1
10 % SDS [ $\mu$ l]	250	Bidest [ $\mu$ l]	0,4	0,4
Bidest [ $\mu$ l]	501	Bromphenolblau [ $\mu$ l]	0	20
10 % APS [ $\mu$ l]	80	10 % APS [ $\mu$ l]	21	24
TEMED [ $\mu$ l]	10	TEMED [ $\mu$ l]	7	8

Tabelle 2.12: Ansätze für die Gelelektrophorese

Trenngelpuffer 1,6 M Tris/0,4 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	19,38 g Tris-Base 80 ml 0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ad 100 ml
Sammelgepuffer 0,8 M Bistris/0,2 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8,37 g Bistris 20 ml 0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ad 50 ml
Kammgelpuffer 0,72 M Bistris/0,32 M Bicine	0,04 g Bistris 10,36 g Bicine ad 200 ml

Tabelle 2.12: Ansätze für die Gelelektrophorese

1 M NaOH	39,99 g NaOH ad 100 ml
Schachtpuffer 0,36 M Bistris/0,16 M Bicine/0,1 % SDS	25 ml Kammgelpuffer 5 ml 1 % SDS ad 50 ml
Anodenpuffer 200 mM Tris/50 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	24,33 g Tris 100 ml 0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ad 1000 ml
Kathodenpuffer 200 mM Bicine/100 mM NaOH/0,25 % SDS	32,63 g Bicine 100 ml 1 M NaOH 25 ml 10 % SDS ad 1000 ml

#### 2.2.4 Semi-Dry-Western-Blot

Der Western-Blot ist ein Verfahren, mit dem die Proteine auf eine Trägermembran übertragen werden.

Durch ein elektrisches Feld über dem Gel wandern die mit SDS negativ geladenen Proteine zur Anode und gehen auf die PVDF-Membran über (Mahmood und Yang 2012). Damit die Proteine wandern können, wird ein Stapel aus verschiedenen Schichten vorbereitet, der zwischen Anode und Kathode des Blotters gelegt wird.

Dazu müssen die einzelnen Komponenten des Stapels vorbereitet werden. Pro Blot, also pro Gel, werden vier extra dicke Filterpapiere und eine PVDF-Membran benötigt. Ungefähr 15 Minuten vor Ende der SDS-PAGE wird ein Filterpapier in Blotpuffer A gegeben, eines in Blotpuffer B und zwei Filterpapiere in Blotpuffer C. Nach der Aktivierung der PVDF-Membran in Methanol wurde sie kurz in Bidest gespült und für zehn Minuten in Blotpuffer B eingelegt. Um den Blotstapel aufzubauen, wurden die Filterpapiere für ca. 30 Sekunden getrocknet, in dem sie mehrmals über saugfähiges Papier gegeben wurden. Dass die Filterpapiere nicht zu feucht sind, ist entscheidend für die spätere Blotentwicklung, damit klare Banden entstehen. Der Blotstapel wurde von der Anode im Blotter bis hin zur PVDF-Membran aufgebaut. Etwaige Luftblasen wurden mit dem Blotroller entfernt, indem einige Mal über den Stapel gerollt wurde. Um das Gel auf den Stapel aufzubringen, wurden die Glasplatten auseinander gehoben sowie das Sammel- und Kammgel abgetrennt, sodass nur noch das Trenngel übrig blieb. Um das Gel vom Glas zu lösen, wurde es kurz mit Blotpuffer C benetzt und löste sich problemlos. Das Trenngel wurde mit der richtigen Seite auf die PVDF-Membran gelegt und

nicht mehr bewegt, sobald es aufgebracht wurde.

Nachdem das Gel aufgebracht wurde, wurden zwei Filterpapiere aus Blotpuffer C darüber geschichtet. Erneut wurden eventuelle Luftblasen mit dem Blotroller entfernt. Der Blotter wurde nun geschlossen und der Deckel mit ungefähr 1,5 kg beschwert. Der Transfer der Proteine und Peptide aus dem Gel auf die Membran erfolgte mit einem konstanten Strom von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$ . Die maximale Spannung wurde dabei auf 30 V begrenzt.

Im Anschluss wurde die PVDF-Membran entnommen, kurz in Wasser gespült und für drei Minuten in auf  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitztes PBS mit der Proteinseite nach unten eingelegt.

Anschließend wurde die PVDF-Membran in Blockierungslösung überführt, sodass die Proteinseite wieder nach oben zeigte und für 30 Minuten auf dem Schwenker blockiert. Blockierung bedeutet, dass die noch freien Proteinbindungsstellen der Membran gesättigt werden. Durch die Blockierung können unerwünschte Proteine nicht mehr an die Membran binden.

Über Nacht wurden die PVDF-Membranen bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  auf einer Teflonplatte mit dem ersten Antikörper inkubiert.

Dazu wurden  $3,3 \text{ } \mu\text{l}$  1E8-Antikörper in 10 ml 2 % ECL Blocking Reagent in PBS-T gegeben (Ausgangskonzentration 1E8:  $1,49 \text{ mg/ml}$ ; Konzentration hier:  $0,5 \text{ } \mu\text{l/ml}$ ) und luftblasenfrei über die PVDF-Membranen verteilt. Die Abdeckung erfolgte mit einer Glasplatte. Nach der Inkubation wurde nach dreimaligem Waschen in PBS-T (jeweils zehn Minuten) auf dem Schwenker der Sekundär-Antikörper hinzugegeben. Dafür wurden die PVDF-Membranen erneut auf eine Teflonplatte gegeben.  $33 \text{ } \mu\text{l}$  MAB2 (Ausgangskonzentration:  $1 \text{ mg/ml}$ ; Konzentration hier nach 1:3000 Vorverdünnung:  $0,0003 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wurden in 10 ml PBS-T gegeben, luftblasenfrei über die Membranen verteilt und für eine Stunde bei RT inkubiert.

Der Sekundäntikörper weist dabei den Primäntikörper nach. Erneut wurden die Membranen für dreimal zehn Minuten in PBS-T wie oben beschrieben gewaschen.

Im Anschluss wurden  $3,3 \text{ } \mu\text{l}$  Streptavidin POD in 10 ml PBS-T wie oben geschildert über die Membranen gegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Es erfolgten drei weitere Waschschritte, bevor der Blot entwickelt wurde. Zur Entwicklung wurden nach dem Waschen die Membranen wieder auf die Teflonplatte gebracht.  $600 \text{ } \mu\text{l}$  Solution B und  $600 \text{ } \mu\text{l}$  Solution A wurden vermischt und für fünf Minuten luftblasenfrei über die erste Membran gegeben.

Nun konnte die POD (Peroxidase) das vorher farblose Chromogen Luminol durch Oxidation in Anwesenheit von Wasserstoffsuperoxid zum Endprodukt umwandeln. Unter der Reaktion wird Licht frei, das mit der Kamera gemessen werden kann.

Zum Überführen wurde der Rest der Lösung von der Membran entfernt und die Membran mit Folie abgedeckt, damit sie während der Entwicklung nicht austrocknete. Luftblasen wurden vor der Entwicklung mit dem Blotroller entfernt.

Tabelle 2.13: Semi-Dry Western-Blot

Blotpuffer A	100 ml Blotpuffer A Stammlösung 300 ml Methanol ad 1000 ml
--------------	--

Tabelle 2.13: Semi-Dry Western-Blot

Blotpuffer B	100 ml Blotpuffer B Stammlösung 300 ml Methanol ad 1000 ml
Blotpuffer C	200 ml Blotpuffer C Stammlösung 1600 ml Bidest 20 ml 0,5 M Borsäure 5 ml 10 % SDS ad 2000 ml
Blotpuffer A Stammlösung 2,1 M Tris	127,3 g Tris ad 500 ml
Blotpuffer B und C Stammlösung	30,28 g Tris ad 1000 ml
0,5 M Borsäure	30,9 g Borsäure ad 1000 ml
PBS	9,55 g PBS Instant Pulver ad 1000 ml
Tween 20 7,5 % (4 °C)	7,5 ml Tween 20 ad 100 ml
PBS-T (0,075 % Tween 20 in PBS)	100 ml 10fach-PBS 10 ml Tween 20 7,5 % ad 1000 ml
10 % SDS	10 g SDS Pulver ad 100 ml

### 2.2.5 MSD-V-Plex-Assay

Der MSD-Assay funktioniert nach dem Prinzip eines Sandwich-Immunoassays. An der Oberfläche der Elektrode in den Vertiefungen (Wells) einer 96 Loch-Platte befinden sich die Fangantikörper, die das zu analysierende Protein binden.

An dieses Protein kann im nächsten Schritt der MSD-SULFO-TAG-Detektions-Antikörper binden. Dieser Antikörper ist ein monoklonaler Maus-6E10-Antikörper, der N-terminal an die

A $\beta$ -Peptide bindet. Im Falle des hier verwendeten Assays ist er mit MSD-SULFO-TAG konjugiert, der in der Elektrochemolumineszenzmessung gemessen wird.

Das emittierte Licht ist proportional zur vorhandenen Menge der A $\beta$ -Peptide. Auf der Platte befinden sich in einem sogenannten Well vier kleinere Felder, von denen drei jeweils mit A $\beta$ 38-, A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42-Fangantikörpern belegt sind. Das vierte Feld ist mit BSA blockiert. Zur Messung der Proben wurden die immunpräzipitierten Eluate am Versuchstag aus der Lagerung bei -80 °C geholt und unter standardisierten Bedingungen aufgetaut: Sie wurden für fünf Minuten bei 300 rpm und RT aufgetaut und anschließend auf Eis gestellt. Währenddessen wurden für den Assay die MSD-Standards in acht Verdünnungsstufen nach Herstellerangaben angelegt. Bei den MSD-Standards handelt es sich um synthetische A $\beta$ 1-38-, A $\beta$ 1-40- und A $\beta$ 1-42-Kalibratorpeptide.

Nach der Vorbereitung wurde der Assay nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurde die Platte für eine Stunde mit Diluent 35 blockiert, um die übrigen Proteinbindungsstellen auf der Platte abzusättigen.

Nach dem Blockieren wurde die Assay Platte gewaschen und 25  $\mu$ l der Detektionsantikörperlösung gefolgt von 25  $\mu$ l Proben aufgetragen. Die Platte wurde für zwei Stunden bei RT inkubiert, im Anschluss erneut gewaschen und die Wells anschließend mit dem Read-Buffer befüllt.

Unmittelbar danach wurde die Assay-Platte mittels MSD Reader gemessen. Alle für den Assay verwendeten Materialien stammten aus einem Assay-Kit.

### 2.2.6 Statistische Analysen

Die statistische Überprüfung und Visualisierung der Daten wurde mittels der statistischen Programmierung R (Version 3.5.1) unter Verwendung der Pakete „pheatmap“ (Version 1.0.12), „car“ (Version 2.1.4), „ggplot2“ (Version 3.2.1.) sowie „ggpubr“ (Version 0.2.4.999), Excel und Graph Pad Prism (Version 6) durchgeführt.

Angewendet wurden der Mann-Whitney-U-Test, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Welch-Test, t-Test und lineare Regression. Als statistisch signifikant wurde dabei ein p-Wert  $p \leq 0,05$  angesehen.

Des Weiteren wurde mit der Graph Pad Prism Software eine ROC-Kurven-Analyse durchgeführt, der Youden-Index bestimmt sowie ein Bland-Altman-Plot erstellt. Zur Überprüfung, ob eine Normalverteilung der Peptide innerhalb der unabhängigen klinischen Kohorte vorliegt, wurden QQ-Plots erstellt und mittels des Shapiro-Wilk-Tests in der statistischen Programmierung R kontrolliert. Mit der statistischen Programmierung R wurden zur Analyse möglicher Positionseffekte Heatmaps generiert.

## 3 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es einen „*Fit-for-purpose*“-Assay zu validieren und etablieren. Dazu wurde der bereits entwickelte zweischrittige Immunoassay (Shahpasand-Kroner et al. 2018) mit gezielt ausgewählten Validierungsexperimenten überprüft. Anschließend wurde überprüft, ob er in einer klinischen Kohorte hinreichend zwischen einer biomarkerpositiven und einer biomarkernegativen Gruppe unterscheiden kann.

Die biologischen Proben wurden in EDTA-Monovetten (S-Monovette 9 ml K3E; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gesammelt. Für zehn Minuten wurden die Proben mit 2000 g und bei RT zentrifugiert. Das EDTA-Plasma wurde in 500 µl Aliquots (Polypropylene Tubes) abgenommen und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Sammlung, Aufarbeitung und Verwendung der Proben erfolgte pseudonymisiert über die Biobank der Psychiatrie der Universitätsmedizin Göttingen und unter dem Votum der Ethikkommission der Universität Göttingen (9/2/16).

Die schriftliche Aufklärung und Einverständniserklärung wurden vorab eingeholt. Alle Vorgänge, die menschliche Teilnehmer miteinschlossen, fanden in Übereinstimmung mit den ethischen Standards des institutionellen und/oder nationalen Forschungskomitees sowie der Deklaration von Helsinki 1964 und ihren späteren Ergänzungen oder vergleichbaren ethischen Standards statt.

### 3.1 Qualitätskontrolle der hergestellten 1E8-M280-Dynabeads für die Immunpräzipitation durch Western-Blot-Analysen

Um die Funktion und Qualität der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten 1E8-M280-Dynabeads zu überprüfen, wurden Kontroll-Immunpräzipitationen aus EDTA-Blutplasmaproben und einer Negativkontrolle durchgeführt und mittels Harnstoff-SDS-Elektrophorese mit nachfolgendem Immuno-Westernblot untersucht. Zwei Arten von Beads wurden untersucht: kovalent verknüpfte (mit DMP) und nicht-kovalent verknüpfte (ohne DMP).

Zwei Plasmaproben, eine Probe des Plasmapools sowie die Negativkontrolle wurden angesetzt. Die Negativkontrolle (Kontrolle) entspricht einem Leeransatz ohne Plasma, die nur aus 400 µl PBS/1 % BSA und 100 µl 5fach-IP-Puffer besteht.

Zunächst wurde eine IP durchgeführt. Im Anschluss wurden die A $\beta$ -Peptide aus den Plasmaproben mittels der 8 M Harnstoff SDS-Page aufgetrennt. Es handelte sich um ein nicht-reduzierendes Gel.

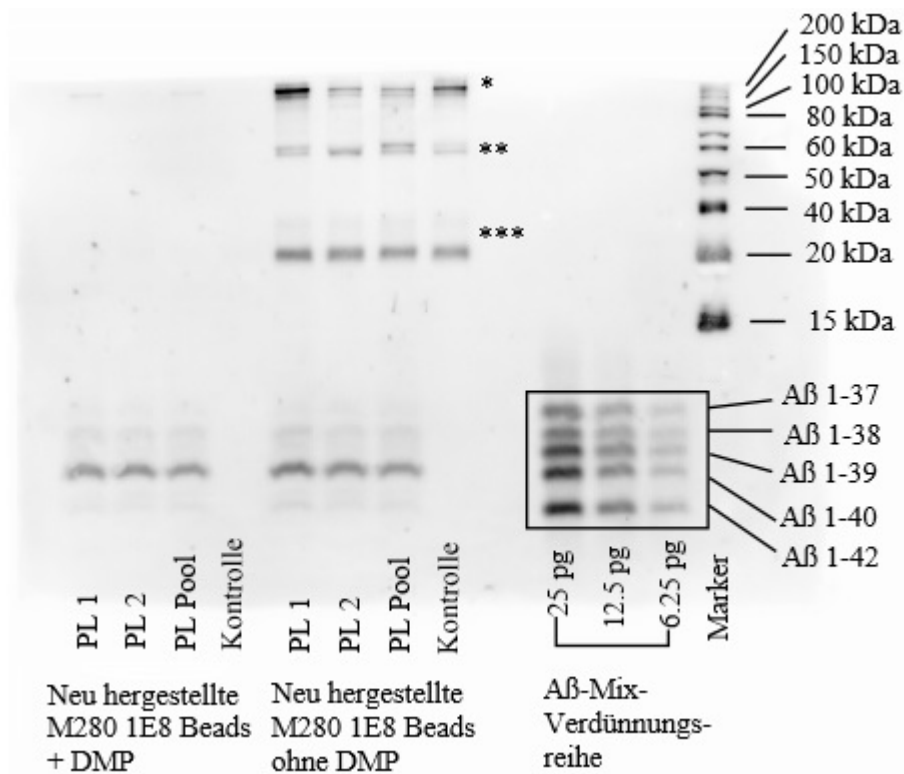


Abbildung 1: **Qualitätskontrolle der hergestellten kovalent verknüpften 1E8-M280-Dynabeads (mit DMP) mittels Semi-Dry-Western-Blot-Analysen.**

Um die Funktion der kovalent verknüpften M280 1E8 Beads (mit DMP) während der Immunpräzipitation (IP) zu überprüfen, wurden sie mit nicht-kovalent verknüpften Beads (ohne DMP) verglichen. Verwendet wurden die Plasmaproben PL 1, PL 2 und eine Poolprobe, die zusätzlich weitere Plasmaproben enthielt, sowie eine Negativkontrolle ohne Plasma.

Die mittels IP angereicherten A $\beta$ -Peptide wurden durch eine Harnstoff SDS-PAGE separiert und anschließend im Semi-Dry Western Blot mittels des monoklonalen anti-Maus Antikörpers 1E8 dargestellt. Zur Kontrolle wurde ein Proteingrößen-Marker aufgetragen (15 - 200 kDa).

Die A $\beta$ -Mix-Verdünnungsreihe aus den synthetischen Peptiden A $\beta$ 1-37, A $\beta$ 1-38, A $\beta$ 1-39, A $\beta$ 1-40 und A $\beta$ 1-42 ist hier durch das Rechteck markiert. Sichtbar ist die Aufteilung der Peptide in die jeweiligen Proteinbanden bei den kovalent verknüpften Beads; die deutlichste Proteinbande ist A $\beta$ 40. Ohne DMP-Crosslinking tauchen weitere Proteinbanden auf, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um das intakte IgG (150 kDa) und unter Umständen sAPP $\alpha$ , H- und L-Kette des Antikörpers handelt. \* vermutlich intaktes IgG 1E8; \*\* IgG 1E8 schwere Kette, 55 kDa; \*\*\* IgG 1E8 leichte Kette, 25 kDa.



Zur Kontrolle wurde in der SDS-Page pro Gel je eine Verdünnungsreihe eines A $\beta$ -Mixes aus den synthetischen Peptiden A $\beta$ 1-37, A $\beta$ 1-38, A $\beta$ 1-39, A $\beta$ 1-40 und A $\beta$ 1-42 aufgetragen sowie ein Proteingrößen-Marker (siehe Abb. 1).

Die neu hergestellten Beads mit und ohne kovalente Quervernetzung haben erfolgreich A $\beta$  aus den Proben PL 1, PL 2 und PL Pool angereichert. Man kann in den IP-Eluaten die fünf A $\beta$ -Varianten 1-37, 1-38, 1-39-1-40, 1-42 sehen. In der Negativkontrolle ist nichts zu sehen. Ohne DMP-Crosslinking tauchen zusätzlich zu den A $\beta$ -Peptiden noch weitere Proteinbanden auf. Bei ihnen handelt es sich höchstwahrscheinlich um das intakte IgG (150 kDa) und unter Umständen sAPP $\alpha$  sowie H- und L-Kette des Antikörpers (ca. 25 und 55 kDa).

Folglich hat die kovalente Verknüpfung funktioniert: Die mit DMP behandelten Beads liefern mit der hier verwendeten Elutionsmethode (Kochen in Bicine-CHAPS) saubere Eluate ohne Verunreinigung durch den Antikörper oder sAPP.

## 3.2 Einfluss des präanalytischen Einfrierens und Wiederauftauens

In einem mehrstufigen Verfahren wurde der Einfluss von mehrmaligem Einfrieren und Wiederauftauen auf die Konzentration von A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 im Plasma überprüft. Weiterhin sollte kontrolliert werden, ob das Einfrieren der IP-Eluate als Zwischenschritt in das standardisierte Arbeitsprotokoll (SOP) aufgenommen werden kann.

Zur Vorbereitung der Proben wurden drei verschiedene Ansätze gewählt. Für jeden Ansatz wurden fünf Plasmaproben und eine gepoolte Plasmaprobe verwendet, in denen mittels IP die A $\beta$ -Peptide konzentriert wurden. Die konzentrierten Peptide wurden 4,8-fach in Diluent 35 verdünnt.

Der erste Ansatz (A) wurde bis zum Einsatz in den MSD-V-Plex-Assay eingefroren. Der zweite Ansatz (B) wurde insgesamt fünfmal unter standardisierten Bedingungen bei -80 °C eingefroren und wieder aufgetaut. Der fünfte Auftauschritt erfolgte erst direkt vor der MSD-Messung. Der dritte Ansatz (C) wurde frisch hergestellt und sofort in den MSD-V-Plex-Assay eingesetzt. Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen.

Zum standardisierten Auftauen wurden die Proben (B) in den Thermomixer gestellt. Damit die Temperatur alle Proben gleichmäßig erreicht, wurde Bidest in die Halterung eingefüllt. Für 30 Minuten bei RT und 300 rpm wurden die Proben aufgetaut und anschließend bei -80 °C erneut eingefroren.

Für die A $\beta$ -Peptide wurden Signale im quantitativen Messbereich des Assays gemessen (exemplarisch: siehe Abb. 2). Die graphische Darstellung zeigte keine größeren Unterschiede der Peptidkonzentrationen durch einmaliges oder mehrmaliges Einfrieren (siehe Abb. 3). Die Abweichungen zwischen den je zwei technischen Replikaten waren gering und zeigten einen mittleren Variationskoeffizienten (%CV) unter < 15 % in vier von fünf Plasmaproben (A $\beta$ 38: 5,2  $\pm$  4,11, A $\beta$ 40: 9,02  $\pm$  34,79 und A $\beta$ 42: 9,63  $\pm$  3,69).

Plasmaprobe fünf zeigte höhere mittlere Variationskoeffizienten, da bei der IP vor dem Einfrieren Beads verloren wurden. Bei dem direkt eingesetzten IP-Eluat (C) von Plasmaprobe 5

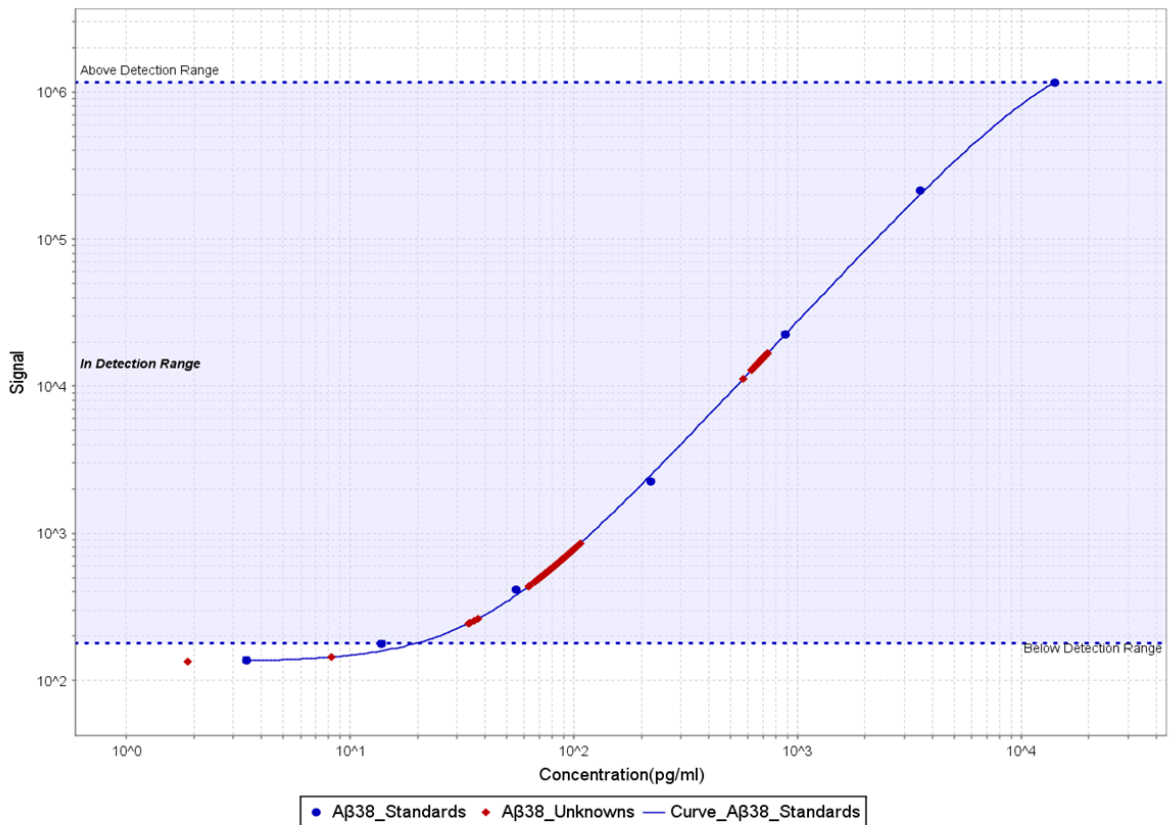


Abbildung 2: **Eichkurve des MSD-Assays zu Untersuchungen des präanalytischen Einfrierens: A $\beta$ 38**

Die Eichkurve (blau) ergibt sich durch die Verdünnungsreihe der synthetischen A $\beta$ 1-38, A $\beta$ 1-40 und A $\beta$ 1-42 MSD-Standards. Der blaue Bereich zwischen den gestrichelten Linien ist der detektierbare Bereich zwischen ULOQ und LLOQ. Darunter schließt sich das LLOD an. Mit Ausnahme von zwei Werten liegen die Messwerte für A $\beta$ 38 (rot) im Messbereich.

wurden keine Beads verloren. Dennoch konnte durch den Verlust kein wesentlicher Einfluss auf die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio und die A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio von Plasmaprobe 5 gesehen werden (siehe Abb. 4). Es findet also durch die Ratio eine Normalisierung des technischen Fehlers an dieser Stelle statt.

Die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio und die A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio ist in den anderen Plasmaproben ebenfalls stabiler gegenüber der kurzzeitigen Lagerung bei -80 °C und dem Einfrieren (siehe Abb. 4). Der mittlere Variationskoeffizient der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio und der A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio betrug < 10 % (A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio:  $4,82 \pm 0$ , A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio:  $5,01 \pm 0,02$ ). Von Interesse sind die relativen Änderungen der Ratios, also die Quotienten  $(\text{ratio}_A - \text{ratio}_C) / \text{ratio}_C$ , wobei  $\text{ratio}_C$  und  $\text{ratio}_A$  die Ratio vor beziehungsweise nach einmaligen Einfrieren bezeichnet.

Da relative Änderungen für übliche statistische Analysen ungeeignet sind (Törnqvist et al.

1985), werden nun die logarithmierten Quotienten  $\ln(\text{ratio}_A/\text{ratio}_C)$  analysiert, die näherungsweise den relativen Änderungen entsprechen (wenn die relativen Änderungen wesentlich kleiner als 100 % sind). Es wird unter Verwendung eines Äquivalenztests getestet, ob diese logarithmierten Quotienten im Mittel zwischen -0,2 und 0,2 liegen.

Für die  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio und die  $A\beta_{42}/A\beta_{38}$ -Ratio betrug der p-Wert 0,03. Nach Bonferroni-Korrektur erreicht er keine statistische Signifikanz ( $p = 0,06$ ). Dies deutet zum einen auf Grund der kleinen Stichprobengröße und der daraus resultierenden geringen statistischen Power und zum anderen da die Bonferroni-Korrektur insbesondere bei positiv korrelierten Teststatistiken konservativ ist (Moran 2003), jedoch keineswegs darauf hin, dass die relative Änderung im Mittel  $> 20$  % beträgt.

Zusammenfassend verändert das Einfrieren die Ratio im Mittel nicht signifikant. Man muss jedoch davon ausgehen, dass das Einfrieren möglicherweise einen geringen Effekt hat.

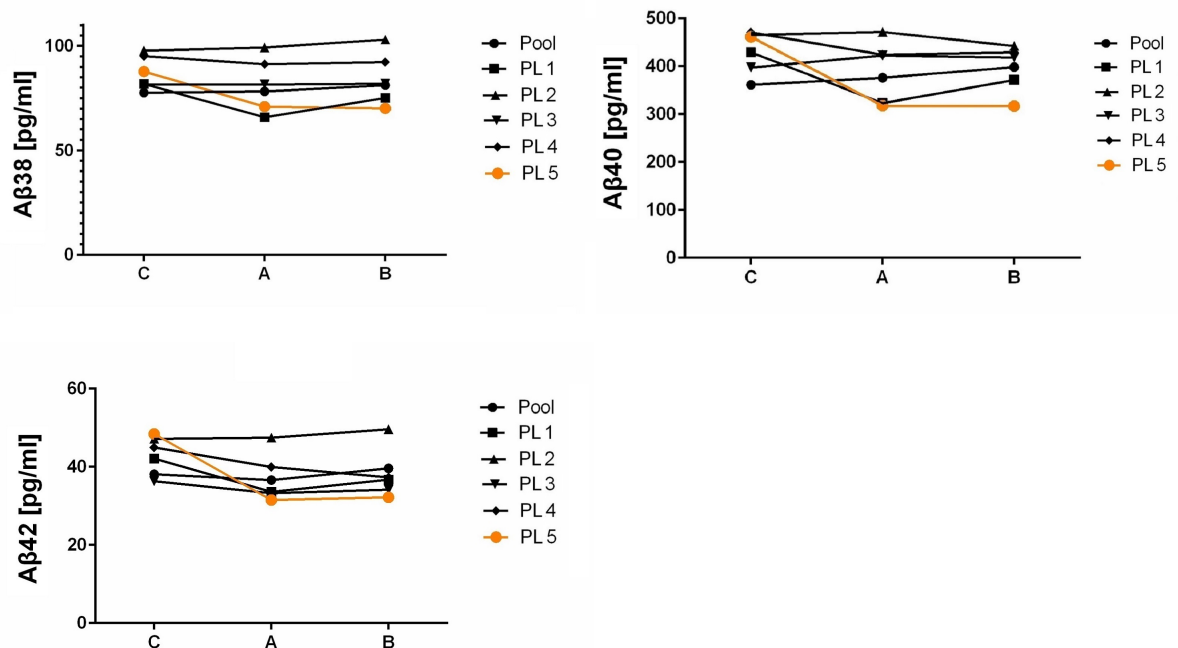


Abbildung 3: **Präanalytisches Einfrieren der IP-Eluate: Aβ38, Aβ40 und Aβ42**

Vergleich der Peptidkonzentrationen unter einmaligem und mehrmaligem Einfrieren der IP-Eluate gegenüber dem direkten Einsatz in die MSD-Messung. Bei PL 5 kam es zum Beadsverlust; dadurch ist die systematische Reduktion der Konzentration in Ansatz A und B gegenüber Ansatz C zu erklären.

C = frische IP, A = einmaliges Einfrieren, B = insgesamt fünfmaliges Einfrieren und Wiederauftauen unter standardisierten Bedingungen.

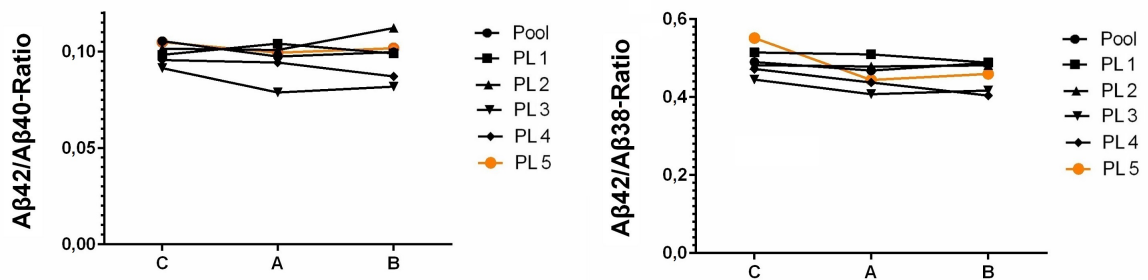


Abbildung 4: **Präanalytisches Einfrieren der IP-Eluate: Aβ42/Aβ40-Ratio und Aβ42/Aβ38-Ratio.**

Vergleich der Aβ42/Aβ40-Ratio und Aβ42/Aβ38-Ratio unter einmaligem und mehrmaligem Einfrieren gegenüber dem direkten Einsatz in die MSD-Messung. Die Aβ42/Aβ40-Ratio war trotz Beadsverlust stabil in PL 5.

C = frische IP, A = einmaliges Einfrieren, B = insgesamt fünfmaliges Einfrieren und Wiederauftauen unter standardisierten Bedingungen.

### 3.3 Bestätigung des Biomarkers in einer speziell ausgewählten Kohorte mit einem modifizierten Protokoll

Eine speziell ausgewählte Kohorte mit  $n = 10$  Plasmaproben mit einer hohen Aβ42/Aβ40-Ratio im Liquor und  $n = 10$  mit einer sehr niedrigen Aβ42/Aβ40-Ratio wurde untersucht. Die ausgewählten Proben wurden bereits in der ersten Publikation zu dem Zweischnitt-Immunoassay gemessen (Shahpasand-Kroner et al. 2018). Im Folgenden werden die Gruppen in biomarkerpositiv (BM+) und biomarkernegativ (BM-) unterschieden.

Die Proben wurden nach dem üblichen Vorgehen immunpräzipitiert, die Eluate mit Diluent 35 verdünnt und anschließend bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zum Assay wurden sie einmal aufgetaut und in Triplikaten aufgetragen.

Alle Proben gaben ein Signal über dem LLOD, jedoch waren fünf Proben bezüglich Aβ38 unter dem LLOQ nach CoA. Ein signifikanter Unterschied der Aβ42/Aβ40-Ratio lag zwischen der biomarkerpositiven und der biomarkernegativen Gruppe vor ( $p < 0,0001$ , ungepaarter einseitiger Welch-Test).

Der MW der Aβ42/Aβ40-Ratio der biomarkernegativen Gruppe betrug 0,0945; der MW der biomarkerpositiven Gruppe betrug 0,0763. Die Differenz betrug 0,0181. Damit lag eine Reduktion der Aβ42/Aβ40-Ratio um 19 % zwischen den beiden Gruppen vor (siehe Tab. 3.1). Die Aβ42/Aβ38-Ratio war ebenfalls signifikant reduziert in der biomarkerpositiven Gruppe ( $p = 0,0002$ , ungepaarter einseitiger Welch-Test). Der MW der biomarkerpositiven Gruppe betrug 0,4129; der MW der biomarkernegativen Gruppe 0,4914. Das entsprach einer Reduktion um 0,0785, beziehungsweise 16 % (siehe Tab. 3.1).

Die ROC Kurve der Aβ42/Aβ40-Ratio zeigte, dass die Aβ42/Aβ40-Ratio und Aβ42/Aβ38-Ratio in der ausgewählten Kohorte sehr gut zwischen biomarkerpositiver und biomarkerne-

gativer Gruppe unterscheiden konnten (siehe Abb. 7). Die AUC für die  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio betrug 0,995 (95 %-Konfidenzintervall [0,97;1,0]). Bei einem Youden-Index von 0,9 lag der *Cut-off* für 100 % Spezifität bei  $> 0,08615$ ; für 100 % Sensitivität bei  $> 0,0819$ . Für die  $A\beta_{42}/A\beta_{38}$ -Ratio galt bei einem Youden-Index von 0,7 als *Cut-off*-Wert für 90 % Sensitivität und 80 % Spezifität  $> 0,4420$ . Die AUC betrug 0,93 (95 %-Konfidenzintervall [0,82;1,0]). Um den Effekt des Einfrierens und der langen Lagerung genauer zu untersuchen, wurden die Daten mit Messergebnissen derselben Proben von März 2017 (Shahpasand-Kroner et al. 2018) verglichen, welche direkt nach der IP analysiert wurden. Dem Bland-Altman-Plot ist zu entnehmen, dass die  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio aller Proben bis auf zwei Ausnahmen nach der Lagerung niedriger war. Die relative Differenz war allerdings bei allen Proben gering (siehe Abb. 8). Wie in Abschnitt 3.2 wurde zusätzlich unter Verwendung eines Äquivalenztests überprüft, ob zwischen den Messwerten von März 2017 (frische IP) und Dezember 2018 (eingefroren und einmal aufgetaut) die relative Änderung der  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio weniger als 20 % beträgt. Das Ergebnis war hochsignifikant ( $p < 0,0001$ , Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

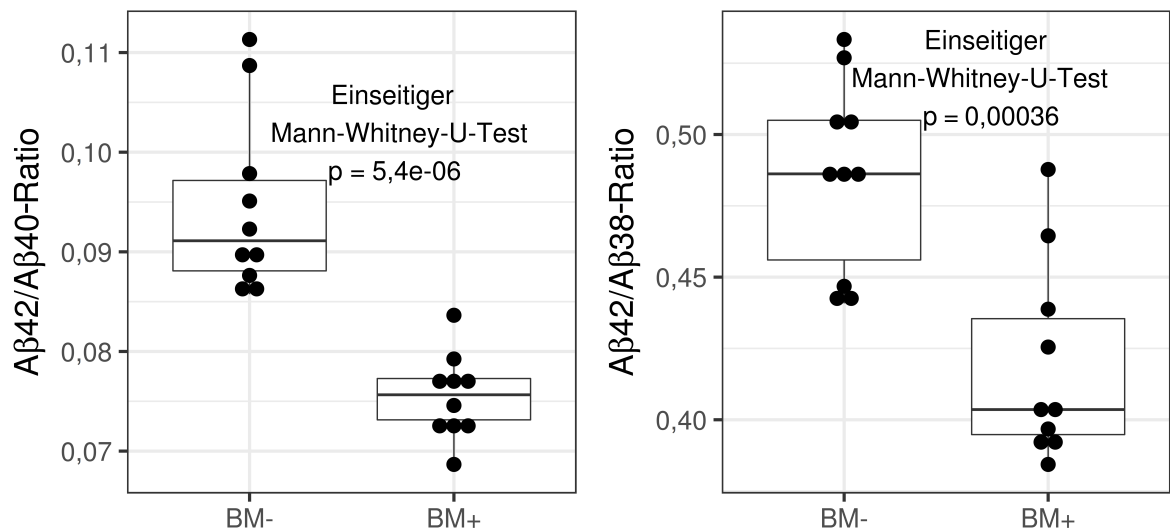


Abbildung 5: Unterschied der  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio und der  $A\beta_{42}/A\beta_{38}$ -Ratio zwischen biomarkerpositiver und biomarkernegativer Gruppe der speziell ausgewählten Kohorte

In dieser Kohorte mit jeweils zehn biomarkerpositiven (BM+) und zehn biomarkernegativen (BM-) Proben wurden die Peptide nach Messungen von Shahpasand-Kroner et al. (2018) ein zweites Mal kontrolliert: Sowohl für den Biomarkerkandidaten der  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio als auch die  $A\beta_{42}/A\beta_{38}$ -Ratio lag ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vor ( $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio:  $p < 0,0001$ ;  $A\beta_{42}/A\beta_{38}$ -Ratio:  $p = 0,00036$ ).

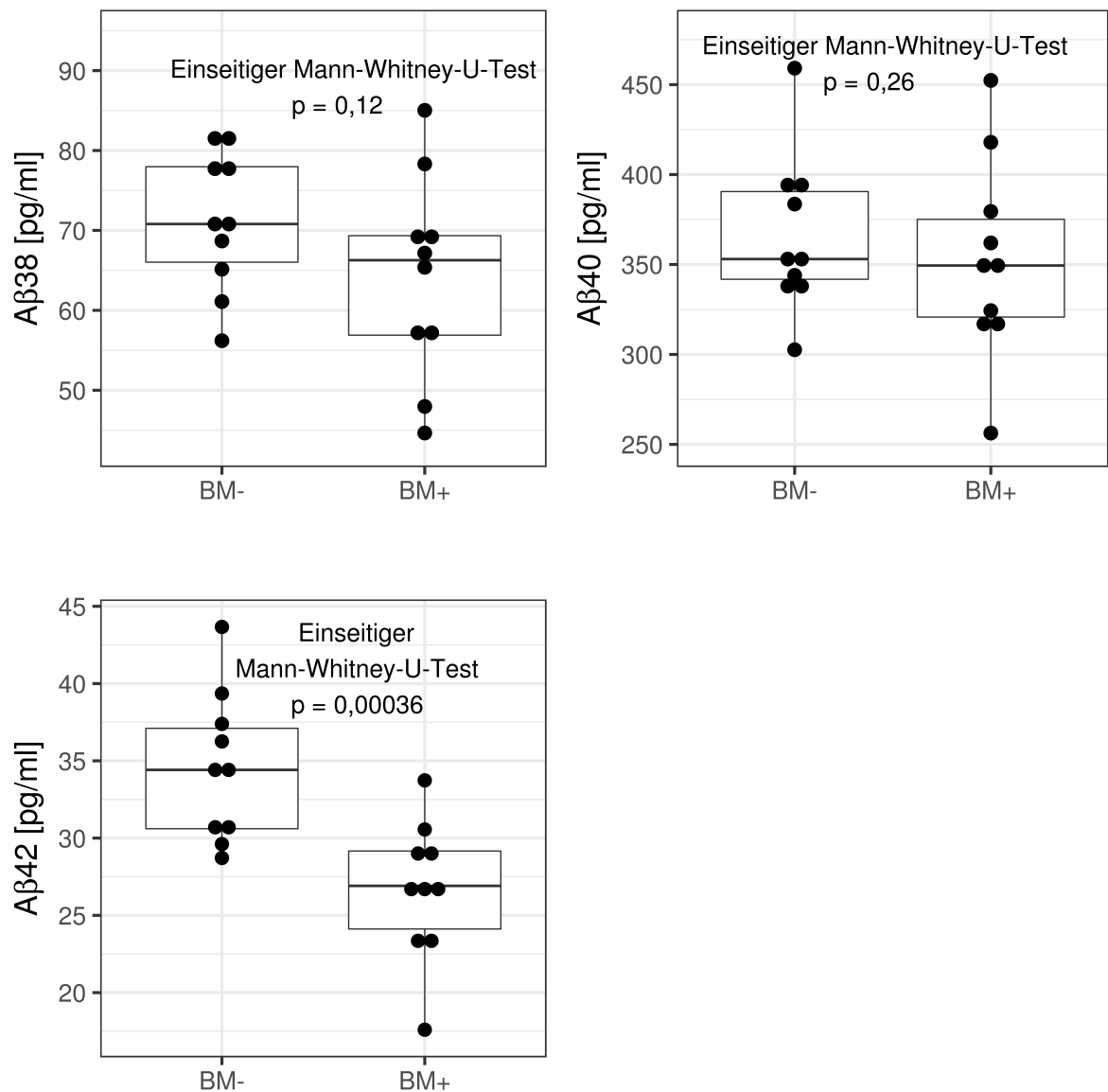


Abbildung 6: Unterschied der gemessenen Peptidkonzentrationen zwischen biomarkerpositiver und biomarkernegativer Gruppe der speziell ausgewählten Kohorte

In dieser Kohorte mit jeweils zehn biomarkerpositiven (BM+) und zehn biomarkernegativen (BM-) Proben wurden die Peptide nach Messungen von Shahpasand-Kroner et al. (2018) ein zweites Mal kontrolliert: Aβ38 und Aβ40 unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen; der Biomarkerkandidat Aβ42 war im Gegensatz dazu hoch signifikant unterschiedlich ( $p = 0,00036$ ).

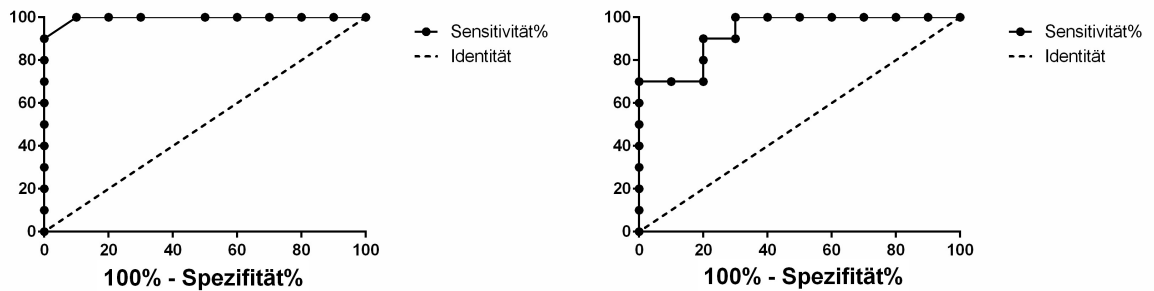


Abbildung 7: **ROC-Kurve der  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio und der  $A\beta_{42}/A\beta_{38}$ -Ratio der speziell ausgewählten Kohorte**

Die Differenzierung zwischen der biomarkerpositiven und der biomarkernegativen Gruppe mittels der  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio und der  $A\beta_{42}/A\beta_{38}$ -Ratio war in der speziell ausgewählten Kohorte besonders gut. Die AUC betrug für die  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio 0,995 (95 %-Konfidenzintervall [0,97;1,0]) und für die  $A\beta_{42}/A\beta_{38}$ -Ratio 0,93 (95 %-Konfidenzintervall [0,82;1,0]).

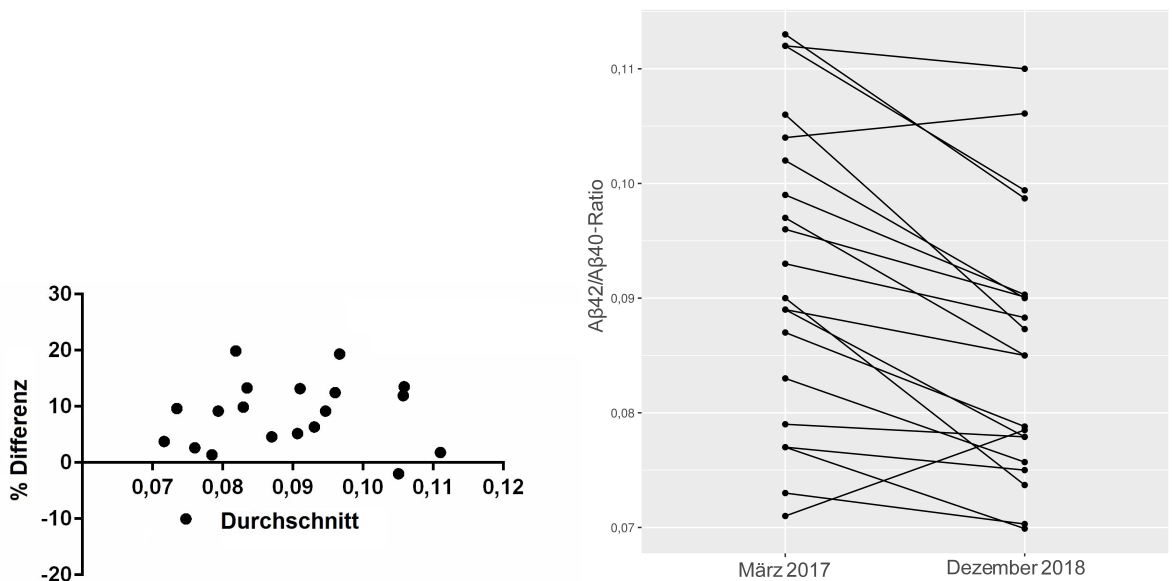


Abbildung 8: **Vergleich der  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio zwischen den zwei Messungen der speziell ausgewählten Kohorte**

Die erste Messung der 20 Proben im November 2017 (Shahpasand-Kroner et al. 2018) wurde mit der zweiten Messung (Dezember 2018) verglichen. Sowohl der Bland-Altman-Plot als auch das Liniendiagramm zeigten, dass alle Proben bis auf zwei Ausnahmen im Dezember 2018 niedrigere Werte aufwiesen als im November 2017.

Tabelle 3.1: Speziell ausgewählte Kohorte: A $\beta$ 42/A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio

	BM+	BM-
MW A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio	0,0763	0,0945
MW A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio	0,4129	0,4914

### 3.4 Partielle Assay-Validierung

Um den in der Arbeitsgruppe entwickelten zweischrittigen Immunoassay und nun modifizierten Immunoassay (zusätzlicher Einfrierschritt zwischen IP und MSD-Messung) weiter zu analysieren, wurde zuerst in Abschnitt 3.3 überprüft, ob der Biomarker mit verändertem Protokoll bestätigt werden konnte. Aufgrund der in Abschnitt 3.3 beschriebenen Ergebnisse wurde der Assay im Anschluss einer „*Fit-for-purpose*“-Assay-Validierung unterzogen.

Damit wird überprüft, ob der Assay für die beabsichtigte Verwendung geeignet ist und wie wie präzise er misst. Als Leitfaden diente eine Publikation von Andreasson et al. (2015).

#### 3.4.1 LLOD und LLOQ

Für alle drei Amyloid- $\beta$ -Peptide und die fünf MSD Assay Platten wurden das „*lower limit of quantification*“ (LLOQ) im *Certificate of analysis* (CoA) des Assay-Kits von Meso Scale Discovery angegeben.

Das LLOQ wird durch MSD definiert als „*The LLOQ is the lowest concentration at which the %CV of the calculated concentration is < 20 % and the percent recovery of the standard is within 80 - 120 % of the known value*“.

Das „*lower limit of detection*“ (LLOD) wird üblicherweise durch die Discovery Workbench Software automatisch mit 2,5 Standardabweichungen berechnet. Das LLOD kann definiert werden als die geringste Konzentration, die ein Signal von mindestens drei Standardabweichungen über dem Blank-Calibrator gibt (Long und Winefordner 1983). Es dient dazu Falsch-Positive zu vermeiden (Whitcomb und Schisterman 2008). In dieser Arbeit wurden drei Standardabweichungen gewählt; dabei wurde „*use minimum error estimates*“ eingestellt (siehe Tab. 3.2). MSD gibt als LLOQ für die Peptide an: A $\beta$ 38 = 60 pg/ml, A $\beta$ 40 = 50 pg/ml sowie A $\beta$ 42 = 3,13 pg/ml.

Tabelle 3.2: LLOD in pg/ml gemittelt aus den fünf Assay-Durchläufen

	A $\beta$ 38	A $\beta$ 40	A $\beta$ 42
LLOD	22,5	13,3	0,9



### 3.4.2 ULOQ

Das „*upper limit of quantification*“ (ULOQ) wurde ebenso im *Certificate of analysis* (CoA) des Assay-Kits von Meso Scale Discovery angegeben und folgendermaßen definiert: „*The ULOQ is the highest concentration at which the %CV of the calculated concentration is < 20 % and the percent recovery of the standard is within 80 - 120 % of the known value*“. MSD gibt als ULOQ für die Peptide an: A $\beta$ 38 = 8480 pg/ml, A $\beta$ 40 = 7000 pg/ml sowie A $\beta$ 42 = 1270 pg/ml.

### 3.4.3 Positionseffekte

Zur Überprüfung systematischer Fehler während des Messens durch den MSD-Quick-Plex-Reader wurde eine eigene Kontrolle in 24 technischen Duplikaten an unterschiedlichen Stellen auf der Platte aufgetragen.

Der Standard (nicht gleichzusetzen mit einem der MSD-Standards) wurde aus hauseigenen synthetischen A $\beta$ -Stocklösungen hergestellt. Die synthetischen A $\beta$ 1-38, A $\beta$ 1-40 und A $\beta$ 1-42 Peptide wurden von der Firma AnaSpec produziert und in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst in DMSO gelagert.

Um Stammlösungen für die MSD-Messungen herzustellen wurden die Peptide mit Diluent 35 weiter verdünnt (Konzentrationen der Stammlösungen in Diluent 35: 600 ng/mL (A $\beta$ 1-38), 600 ng/mL (A $\beta$ 1-40) und 70 ng/mL (A $\beta$ 1-42)). Für die Untersuchung der Positionseffekte wurden diese Stammlösungen zunächst 1:40 und dann noch zweimal jeweils 1:4 weiter mit Diluent 35 verdünnt, um die in Tabelle 3.3 genannten theoretischen Konzentrationen zu erhalten.

Tabelle 3.3: Relative Wiederfindungsraten der Positionsproben

	Theoret. Konz. [pg/ml]	Messwert [pg/ml]	% Wiederfindung
A $\beta$ 38	938	674,85	71,95
A $\beta$ 40	938	705,36	75,20
A $\beta$ 42	109	58,98	54,11

Die Position der jeweiligen Probe wurde mittels der Software Excel randomisiert. Die Variationskoeffizienten lagen in den 24 technischen Replikaten für jedes A $\beta$ -Peptid < 15 % (siehe Tab. 3.4). Es wurden Heatmaps generiert, welche die unterschiedliche Signalverteilung zeigen (siehe Abb. 9). Die Rücksprache mit Meso Scale Discovery bestätigte, dass keine Platteneffekte vorlagen.

Vergleicht man die theoretischen Konzentrationen mit den gefundenen Konzentrationen, ergibt sich eine Wiederfindungsrate zwischen 54 - 75 %. Am geringsten war die Wiederfindung

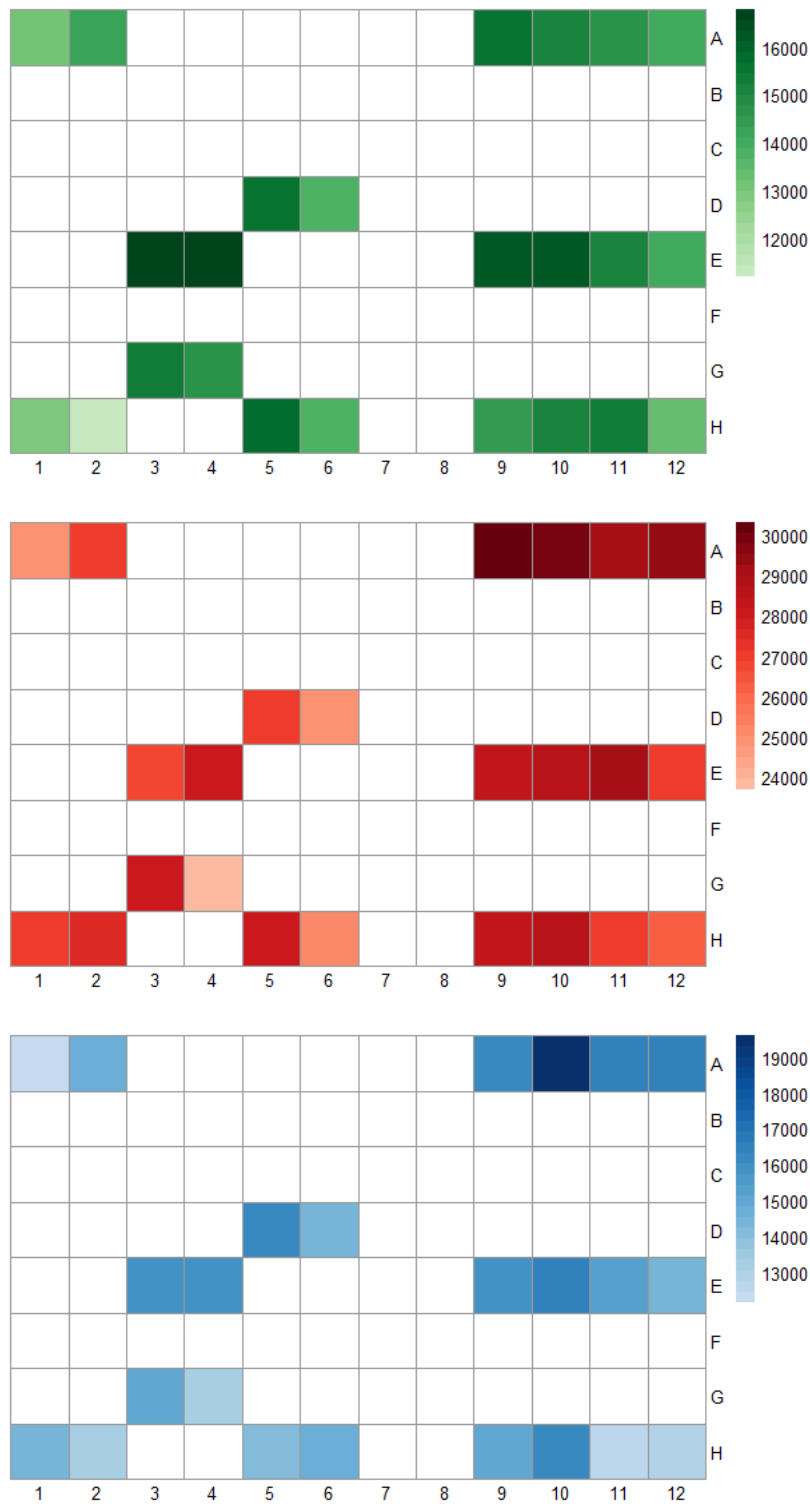


Abbildung 9: **Untersuchung der Positionseffekte von Aβ38, Aβ40 und Aβ42 der Untersuchung mit dem MSD-Quick-Plex-Reader**

24 technische Replikate einer selbst hergestellten Kontrolle wurden randomisiert jeweils in Duplikaten auf die Assay-Platte aufgetragen: Aβ38 (grün), Aβ40 (rot) und Aβ42 (blau).

für A $\beta$ 42. Eine mögliche Ursache für diese Wiederfindungsraten könnte der Konzentrationsunterschied zwischen den selbst hergestellten Kontrollen und den MSD-Standards sein.

Tabelle 3.4: Varianzen zwischen 24 technischen Replikaten der Positionsproben

	A $\beta$ 38	A $\beta$ 40	A $\beta$ 42
Mittlere Signalstärke	14704	27511	15042
SD	1310,66	1652,83	1642,54
%CV	8,91	6,01	10,92
Mittlere Konzentration	674,85	705,36	58,98
SD	37,92	28,01	4,99
%CV	5,62	3,97	8,47

#### 3.4.4 IP aus unterschiedlichen Plasmavolumina

In diesem Experiment wurde untersucht, ob es einen Einfluss hat, ob die IP mit 400  $\mu$ l EDTA-Plasma oder nur 200  $\mu$ l, die mit 200  $\mu$ l Diluent 35 verdünnt wurden, durchgeführt wird. Das könnte unter Umständen Hinweise auf die Anwesenheit von Bestandteilen des Blutplasmas geben, die mit der Antikörperbindung bei der IP interferieren (sog. Matrixeffekte).

Es wurden drei Plasmaproben verwendet. In einem Ansatz der Proben wurden 400  $\mu$ l EDTA-Plasma benutzt, im anderen Ansatz nur 200  $\mu$ l EDTA-Plasma, die mit 200  $\mu$ l Diluent 35 aufgefüllt wurden. Je drei technische Replikate wurden auf die Assay-Platte aufgetragen.

Tabelle 3.5: Prozentuale Konzentration der Peptide in den mit Diluent 35 verdünnten Plasmavolumina

	PL 1	PL 4	PL 5	MW	SD	%CV
A $\beta$ 38	60,59	61,83	52,84	58,42	4,87	8,34
A $\beta$ 40	50,35	55,79	47,10	51,08	4,39	8,60
A $\beta$ 42	63,55	62,73	55,16	60,48	4,62	7,65

Nach üblichem Protokoll erfolgten die Immunpräzipitation, die Verdünnung des Eluats in Diluent 35 und das einmalige Einfrieren bei -80 °C. Die Proben wurden zum Assay einmal

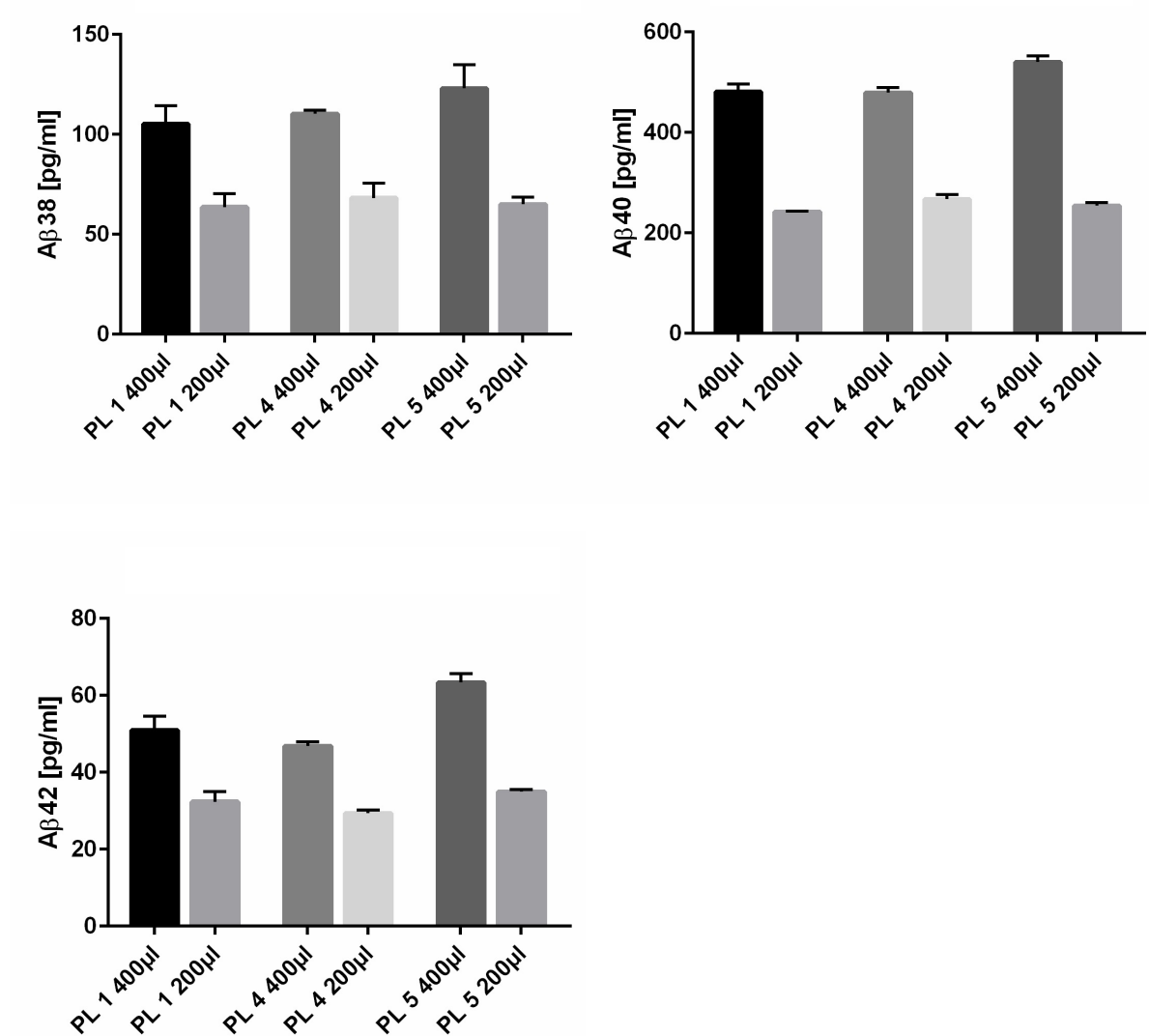


Abbildung 10: **IP** aus unterschiedlichen Plasmavolumina: **Aβ38**, **Aβ40** und **Aβ42**.

Drei EDTA-Plasmaansätze mit 400 µl wurden mit drei Ansätzen aus 200 µl Plasma, die mit 200 µl Diluent 35 aufgefüllt wurden, verglichen. Der relative Unterschied war für Aβ42 am geringsten.

aufgetaut. Erwartet wurde eine Abnahme der Konzentration um annähernd die Hälfte. Es wurde jeweils der Mittelwert der Triplikate bestimmt. Von den MW unter Einsatz von 400  $\mu\text{l}$  EDTA-Plasma wurde der MW unter Einsatz von 200  $\mu\text{l}$  EDTA-Plasma subtrahiert. Im Anschluss wurde bestimmt, wie viel der Konzentration aus den üblichen Eluaten prozentual im verdünnten Ansatz noch zu finden war.

Für A $\beta$ 38 ergab sich eine Reduktion um 39 - 47 %, für A $\beta$ 40 um 44 - 53 % und für A $\beta$ 42 um 37 - 45 %. Damit war die Abnahme der Konzentration von A $\beta$ 42 am geringsten (siehe Abb. 10). Der mittlere Variationskoeffizient betrug für A $\beta$ 38 8,34, für A $\beta$ 40 8,60 und für A $\beta$ 42 7,65 (siehe Tab. 3.5). Sowohl die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio als auch die A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio waren in den verdünnten Plasmaproben höher (siehe Tab. 3.6).

Tabelle 3.6: Mittlere berechnete Konzentration der zwei unterschiedlichen Plasmavolumina sowie die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio und die A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio

	A $\beta$ 38	A $\beta$ 40	A $\beta$ 42	A $\beta$ 42/A $\beta$ 40	A $\beta$ 42/A $\beta$ 38
PL 1 400 $\mu\text{l}$	105,22	481,35	50,90	0,11	0,48
PL 1 200 $\mu\text{l}$	63,76	242,37	32,34	0,13	0,51
PL 4 400 $\mu\text{l}$	110,28	479,14	46,85	0,10	0,42
PL 4 200 $\mu\text{l}$	68,19	267,32	29,39	0,11	0,43
PL 5 400 $\mu\text{l}$	123,08	540,00	63,35	0,12	0,51
PL 5 200 $\mu\text{l}$	65,04	254,32	34,94	0,14	0,54

### 3.4.5 IP-Effizienz

Um die Effizienz der IP zu überprüfen, wurden die Überstände von je einem Plasmaansatz der parallelen IPs in eine zweite Immunpräzipitation mit M280-1E8-Dynabeads eingesetzt, um zu überprüfen wie viel eine zweite IP extrahieren kann. Es wurden je drei technischen Replikate aufgetragen.

Nur eine von drei Plasmaproben gab bezüglich A $\beta$ 38 nach der zweifachen Immunpräzipitation noch ein Signal (siehe Tab. 3.7). Drei von drei Proben des A $\beta$ 40 gaben nach der zweifachen Immunpräzipitation noch ein Signal; allerdings lagen dabei alle unter dem vom Hersteller angegebenen LLOQ (50 pg/ml). Drei von drei Proben gaben bezüglich A $\beta$ 42 nach der zweifachen Immunpräzipitation noch ein Signal. Alle lagen dabei über dem vom Hersteller angegebenen LLOQ (3,13 pg/ml). Für A $\beta$ 40 wurden nach der zweiten IP im Mittel noch 6,8 % gefunden; für A $\beta$ 42 noch 22,5 %.

Tabelle 3.7: IP-Effizienz (Konzentrationen in pg/ml)

	PL 1	PL 1	PL 4	PL 4	PL 5	PL 5	Reduktion um [in %]
	1x IP	2x IP	1x IP	2x IP	1x IP	2x IP	
A $\beta$ 38	106,21	k.A.	107,06	7,87	121,77	k.A.	k.A.
A $\beta$ 40	483,24	34,58	475,96	35,89	582,17	33,61	93,2 %
A $\beta$ 42	52,15	12,06	47,60	11,31	62,63	12,83	77,5 %

### 3.4.6 Assay-Selektivität

Um die Selektivität des zweiseitigen Immunoassays für die drei A $\beta$ -Varianten A $\beta$ 38, A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 zu kontrollieren, wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt. Um auszuschließen, dass im nachgeschalteten MSD-Assay Substanzen, die unspezifisch von den funktionalisierten Magnetbeads eluiert werden, ein Signal erzeugen, wurden IPs mit M280-Beads durchgeführt, die nicht mit dem gegen A $\beta$  gerichteten Antikörper 1E8, sondern mit einem Antikörper gegen das Tau Protein verknüpft waren. Im zweiten Experiment wurde getestet, ob die A $\beta$ -Signale in den IP-Eluaten im MSD-Assay kleiner werden, wenn vor der eigentlichen 1E8-Magnetbead-IP die A $\beta$ -Peptide mit einem anderen anti-A $\beta$ -Antikörper (hier: 6E10), der kovalent an M270-Epoxy-Beads gekoppelt war, aus der Plasmaprobe entfernt oder zumindest deutlich reduziert wurden.

Die Tau-spezifischen HT7-Antikörper, die nicht gegen A $\beta$  gerichtet sind (Vanmechelen et al. 2000) wurden in der IP eingesetzt. 20  $\mu$ g waren zuvor an 500  $\mu$ g M280-Beads gekoppelt worden. Die verwendete Plasmapoolprobe wurde in zwei technischen Duplikaten aufgetragen. Nach Magnetbead-IP mit dem Antikörper gegen das tau-Protein, wurden keine Signale für A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 im MSD-Assay gemessen.

Für das zweite Experiment wurde eine Plasmapoolprobe drei Mal einer IP unterzogen: zweimal mit 6E10-M270-Beads und einmal mit 1E8-M280-Beads. Die 6E10-M270-Beads wurden mit je 50  $\mu$ g 6E10 auf 5 mg M270-Beads gekoppelt. Sie sind ebenfalls spezifisch für A $\beta$ -Peptide (Wang et al. 2017; Baghallab et al. 2018). Verglichen wurde sie mit einer Pool-Probe, die nur einmal mit 1E8-M280-Beads immunpräzipitiert wurde. Damit wurde überprüft, ob eine vorherige Entfernung oder zumindest Verringerung der A $\beta$ -Peptide in der Plasmaprobe durch IP mit 6E10 erwartungsgemäß die Menge an A $\beta$ , die durch IP mit 1E8 erhalten wird, deutlich abnimmt.

Bezüglich A $\beta$ 38 gab die mehrfach immunpräzipitierte Probe kein messbares Signal mehr. Die einfach immunpräzipitierte Probe gab ein Signal über dem LLOD und LLOQ. Beide Proben des A $\beta$ 40 gaben ein Signal über dem LLOD; die depletierte Probe lag unter dem LLOQ nach CoA (50 pg/ml). A $\beta$ 42 gab in beiden Proben ein Signal über dem LLOD und LLOQ. Für

A $\beta$ 40 ergab sich durch die zweifache IP mit 6E10 M270 Beads eine Reduktion auf 5,2 %, für A $\beta$ 42 auf 16,01 %. Durch vorgeschaltete Verringerung der A $\beta$ -Peptide mittels Magnet-bead IP mit an M270-Epoxybeads gekoppelten 6E10 Antikörpern (Depletion) wurde die in den 1E8 IP-Eluaten nachweisbare Menge an A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 somit deutlich reduziert (siehe Tab. 3.8).

Tabelle 3.8: Assay Selektivität: Gemessene A $\beta$ -Konzentrationen in den 1E8 IP-Eluaten ohne und mit vorheriger A $\beta$ -Depletion durch Immunpräzipitation mit 6E10-M270-Magnetbeads (Konzentrationen in pg/ml)

	A $\beta$ 38		A $\beta$ 40		A $\beta$ 42	
	1x IP	3x IP	1x IP	3x IP	1x IP	3x IP
MW	102,71	k.A.	412,77	21,53	35,43	5,69
SD	6,40	k.A.	12,48	0,29	0,85	0,09
%CV	6,23	k.A.	3,02	1,34	2,41	1,56
Reduktion um [in %]		k.A.		94,8		83,9

### 3.4.7 Spike-Wiederfindung

#### 3.4.7.1 Bestimmung der Spike-Wiederfindung von A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42

Um zu überprüfen, ob die zu analysierenden Peptidkonzentrationen von A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 korrekt gemessen werden oder zum Beispiel von Matrixeffekten beeinflusst werden, wurden die *Spike*-Wiederfindungsraten kontrolliert. Dazu wurden vor der IP theoretisch bekannte Peptidkonzentrationen zu den Proben hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben wie üblich aufgearbeitet und die Wiederfindungsraten dieser zugesetzten „*Spikes*“ bestimmt.

Es wurden drei unterschiedliche Verdünnungsstufen der Konzentrationen verwendet, um zu kontrollieren, ob die Wiederfindung von der zugegebenen Menge abhängig ist (Andreasson et al. 2015).

Betrachtet wurden drei verschiedene Plasmaproben mit drei verschiedenen *Spike*-Leveln sowie eine Kontrollprobe, die nur den *Spike* enthielt, und eine Blanko-Probe. Um die Proben zu *spiken*, wurde ein Mix aus synthetischen A $\beta$ 1-38-Peptiden, A $\beta$ 1-40-Peptiden und A $\beta$ 1-42-Peptiden hergestellt. Dazu wurden die bisher nicht verwendeten Calibratorlösungen aus dem V-PLEX human A $\beta$  Panel (6E10) verwendet.

Die Calibratorlösungen enthalten 5640000 pg/ml A $\beta$ 1-38, 21280 pg/ml A $\beta$ 1-40 und 2360 pg/ml A $\beta$ 1-42. Um 200  $\mu$ l *Spike*-Mix herzustellen, wurde wie folgt vorgegangen (siehe Tab. 3.9). Ziel war es die Startkonzentration so zu verdünnen, dass die Konzentrationen der „*Spikes*“ gleichmäßig verteilt im „Arbeitsbereich“ des Assays lagen (Andreasson et al. 2015). Zur Orientierung für die Konzentration der *Spikes* wurden im Plasma gemessene Werte von Lewczuk et al. (2004a) herangezogen.

Die Plasmaproben wurden vor der Immunpräzipitation mit der entsprechenden Menge des *Spike*-Mixes versetzt und nach dem üblichen Protokoll aufgearbeitet (siehe Tab. 3.11). Die Kontrollprobe ohne Plasma diente zur Überprüfung, ob das zweimalige Einfrieren einen Einfluss auf die Calibratorlösungen hatte und wie viel der angenommen Ausgangskonzentration wieder gefunden werden konnte (siehe Tab. 3.10, 3.12).

Die Konzentration der *Spikes*  $c_{spike}$  wird berechnet, indem von dem gemessenen Wert  $c_{plasma}$  (siehe Tab. 3.12) der jeweiligen Probe der Wert der Blankoprobe  $c_{blanco}$  subtrahiert wird. Von der Kontrollprobe wird nichts subtrahiert (siehe Gleichung (3.1)), da kein Plasma enthalten ist (siehe Tab. 3.13).

Um die *Spike*-Wiederfindungsrate  $r_{spike}$  in % zu berechnen, werden die Konzentrationen noch mit dem Faktor 0,144 multipliziert (siehe Gleichung (3.2)). Dieser Faktor ergibt sich durch die theoretische Verdünnung der 30  $\mu$ l Bicine-Eluat durch Faktor 4,8, womit sich 144  $\mu$ l insgesamt ergeben würden. Tatsächlich wurden 25  $\mu$ l Eluat mit 95  $\mu$ l Diluent 35 verwendet, womit sich 120  $\mu$ l Gesamtvolumen ergibt. Es wurden also 5  $\mu$ l, in denen ein Anteil des *Spikes* enthalten ist, nicht verwendet. Dieser Anteil wird durch den Faktor ausgeglichen. Im Anschluss wurde der in pg erhaltene *Spike* noch ins Verhältnis zur theoretischen Konzentration gesetzt und mit 100 multipliziert, um die *Spike*-Wiederfindung in % anzugeben.

$$c_{spike} = c_{plasma} - c_{blanco} \quad (3.1)$$

$$r_{spike} = c_{spike} \cdot 0,144 \quad (3.2)$$

Die relativen *Spike*-Wiederfindungsraten waren für A $\beta$ 38 bis auf eine Ausnahme im Mittel hoch (93,56 %  $\pm$  15,33). Für A $\beta$ 40 waren sie geringer und im Mittel leicht außerhalb des akzeptierten Bereichs von 85 - 115 % (79,67 %  $\pm$  13,64). Die Wiederfindungsraten für A $\beta$ 42 waren im Mittel stark außerhalb des akzeptierten Bereichs (32,71 %  $\pm$  4,20).

In den Kontrollproben zeigte sich ein ähnliches Bild: Die geringste Wiederfindung lag für A $\beta$ 42 vor (siehe Tab. 3.14). PL 3 mit dem niedrigen *Spike*-Level scheint ein Ausreißer gewesen zu sein, da hier für alle Peptide auffallend niedrige *Spike*-Wiederfindungsraten gemessen wurden.



Tabelle 3.9: Zusammensetzung des *Spike*-Mixes

	[pg/ml] in Calibratorlösung	$\mu\text{l}/\text{Mix}$	[pg/ml] in <i>Spike</i> -Mix
A $\beta$ 38	564000	1	2820
A $\beta$ 40	608000	7	21280
A $\beta$ 42	94400	5	2360
Diluent 35		187	
Endvolumen		200	

Tabelle 3.10: Theoretische Konzentrationen der Amyloid- $\beta$ -Peptide in den *Spikes* (Konzentrationen in pg/ml)

	<i>Spike</i> -Mix [ $\mu\text{l}$ ]	<i>Spike</i> -Mix [ml]	A $\beta$ 38	A $\beta$ 40	A $\beta$ 42
Hoch	10	0,01	28,2	212,8	23,6
Mittel	5	0,005	14,1	106,4	11,8
Niedrig	2,5	0,0025	7,05	53,2	5,9
Blanko	0	0	0	0	0
Kontrolle	10	0,01	28,2	212,8	23,6

Tabelle 3.11: Zusammensetzung der Proben mit *Spikes* [ $\mu\text{l}$ ]

	Plasma	5fach-IP-Puffer	<i>Spike</i> -Mix	Diluent 35	1E8-M280-Beads
Hoch	400	100	10	0	25
Mittel	400	100	5	5	25
Niedrig	400	100	2,5	7,5	25
Blanko	400	100	0	10	25
Kontrolle	0	100	10	400	25

Tabelle 3.12: Gemessene Konzentrationen beim *Spiking* (Konzentrationen in pg/ml)

	A $\beta$ 38			A $\beta$ 40			A $\beta$ 42		
	PL 3	PL 5	PL Pool	PL 3	PL 5	PL Pool	PL 3	PL 5	PL Pool
Hoch	311,69	289,34	272,24	1723,77	1701,84	1585,11	80,90	82,76	74,26
Mittel	209,51	203,09	188,62	1140,06	1061,71	1070,82	52,11	56,40	48,85
Niedrig	141,45	162,90	148,50	688,98	775,05	737,93	33,11	42,13	34,53
Blanko	113,85	110,42	95,46	503,72	510,50	381,21	24,25	28,11	20,40
Kontrolle			199,73			1299,57			97,05

Tabelle 3.13: *Spike*-Wiederfindung (Konzentrationen in pg/ml)

	A $\beta$ 38			A $\beta$ 40			A $\beta$ 42		
	PL 3	PL 5	PL Pool	PL 3	PL 5	PL Pool	PL 3	PL 5	PL Pool
Hoch	28,49	25,76	25,46	175,69	171,55	173,36	8,16	7,87	7,76
Mittel	13,78	13,34	13,41	91,63	79,37	99,30	4,01	4,07	4,10
Niedrig	3,97	7,56	7,64	26,68	38,10	51,37	1,28	2,02	2,04
Kontrolle			28,76			187,14			13,97

Tabelle 3.14: *Spike*-Wiederfindungsrate in %

	A $\beta$ 38			A $\beta$ 40			A $\beta$ 42		
	PL 3	PL 5	PL Pool	PL 3	PL 5	PL Pool	PL 3	PL 5	PL Pool
Hoch	101,02	91,36	90,27	82,56	80,62	81,47	34,57	33,35	32,87
Mittel	97,70	94,64	95,14	86,12	74,60	93,33	34,00	34,53	34,73
Niedrig	56,38	107,19	108,34	50,15	71,61	96,56	21,63	34,22	34,49
Kontrolle			101,99			87,94			59,22

### 3.4.7.2 Retrospektive Betrachtung der *Spike*-Wiederfindung von A $\beta$ 42

Die *Spike*-Wiederfindung wurde auf Assayplatte vier kontrolliert. Auf dieser Platte und auf Platte fünf wurde je ein Teil der unabhängigen klinischen Kohorte gemessen. Zwischen den beiden Platten lag ein signifikanter Unterschied für A $\beta$ 42 ( $p = 0,008$ , zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test) und die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio ( $p < 0,0001$ , zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test) vor. Möglicherweise war dies auf einen Fehler beim MSD-Assay, vermutlich der Herstellung des Kalibratormixes, zurückzuführen. Daher wurde überprüft wie die Wiederfindungsraten für A $\beta$ 42 nach Normalisierung nur für den MSD-Fehler ausfallen.

Dazu wurden einerseits die Korrekturfaktoren für Platte vier, die aus den QC-Proben von Platte 1 - 5 gebildet wurden, verwendet (siehe Tab. 3.20). Sie zeigten die Varianzen des kompletten Zweischnitt-Immunoassays.

Zum anderen wurden aus auf Platte 3 - 5 gemessenen Kontrollproben nach demselben Vorgehen wie in Abschnitt 3.4.10 Korrekturfaktoren berechnet (siehe Tab. 3.15). Diese Kontrollproben (Pl 2, PL 4, PL 5, PL Pool; jeweils gemessen in Duplikaten) wurden in einer IP aufgearbeitet, gepoolt und anschließend aliquotiert. Sie zeigten demnach im Gegensatz zu den QC-Proben nur Varianzen des MSD-Assays und nicht der IP.

Die normalisierte *Spike*-Wiederfindungsrate wurde analog zu Abschnitt 3.4.7 berechnet. Es zeigten sich mit beiden Korrekturfaktoren deutliche Verbesserungen der *Spike*-Wiederfindung (siehe Tab. 3.16, 3.17). Dies galt insbesondere für die Kontrollprobe im Vergleich zu den nicht-normalisierten Messwerten (siehe Tab. 3.14).

Tabelle 3.15: Korrekturfaktoren berechnet aus den Kontrollproben von Platte 3 - 5

	Platte 3	Platte 4	Platte 5
Korrekturfaktor A $\beta$ 38	0,98	1,06	0,97
Korrekturfaktor A $\beta$ 40	0,95	1,02	1,04
Korrekturfaktor A $\beta$ 42	0,83	1,44	0,91

Tabelle 3.16: Korrigierte *Spike*-Wiederfindung in % von A $\beta$ 42 mittels Korrekturfaktoren von Platte 1 - 5 (QC-Proben)

	A $\beta$ 42		
	PL 3	PL 5	PL Pool
Hoch	37,85	36,51	35,99
Mittel	37,23	37,81	38,03
Niedrig	23,68	37,48	37,77
Kontrolle			64,84

Tabelle 3.17: Korrigierte *Spike*-Wiederfindung in % von A $\beta$ 42 mittels Korrekturfaktoren von Platte 3 - 5

	A $\beta$ 42		
	PL 3	PL 5	PL Pool
Hoch	49,74	47,98	47,29
Mittel	48,92	49,69	49,97
Niedrig	31,12	49,24	49,63
Kontrolle			85,20

### 3.4.8 Intraassay-Varianz: Parallele Immunpräzipitationen

Um die technischen und manuellen Varianzen, die während der IP auftreten zu überprüfen, wurden drei Plasmaproben in jeweils drei technischen Replikaten aufgetragen, die zuvor parallel immunpräzipitiert wurden. Parallel bedeutet hierbei, dass die Proben am selben Tag angesetzt und in drei unmittelbar aufeinanderfolgenden IPs aufgearbeitet und am nächsten Tag ebenso gemessen wurden.

Verglichen wurden IP-Ansatz A, B und C derselben Plasmaprobe. Von jeder Probe (PL 1, PL 4, PL 5) wurden am ersten Tag jeweils ein IP-Ansatz A, B und C hergestellt. Der Ansatz A (PL 1A, PL 4A, PL 5A) wurde zuerst aufgearbeitet, unmittelbar gefolgt von Ansatz B und C. Nach der Inkubation über Nacht erfolgten am nächsten die Waschschritte, die Elution und die Messung in Triplikaten mit dem MSD-Reader. Der mittlere Variationskoeffizient zwischen den parallel durchgeführten IPs betrug für alle Proben  $< 15\%$  (siehe Tab. 3.18).

Tabelle 3.18: Parallele Immunpräzipitationen (Konzentrationen in pg/ml)

		A	B	C	MW	SD	%CV
A $\beta$ 38	PL 1	106,21	96,88	108,20	103,76	6,04	5,82
	PL 4	107,06	114,36	112,10	111,17	3,74	3,36
	PL 5	121,77	111,37	114,06	115,73	5,40	4,67
A $\beta$ 40	PL 1	483,24	460,36	483,22	475,61	13,20	2,78
	PL 4	475,96	484,97	502,05	487,66	13,25	2,72
	PL 5	582,17	501,11	499,80	527,69	47,18	8,94
A $\beta$ 42	PL 1	52,15	50,23	55,35	52,58	2,59	4,92
	PL 4	47,60	49,64	49,41	48,88	1,12	2,29
	PL 5	62,63	57,91	60,46	60,33	2,36	3,92
A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio	PL 1	0,11	0,11	0,11	0,11	0,00	3,20
	PL 4	0,10	0,10	0,10	0,10	0,00	1,98
	PL 5	0,11	0,12	0,12	0,11	0,01	5,87

### 3.4.9 Interassay-Varianz des Zweischnitt-Immunoassay

Die drei Plasmaproben und die Poolprobe zur Analyse der Interassay-Varianz wurden in fünf IPs vor den jeweiligen Assay-Durchgängen aufgearbeitet.

Als QC-Proben für den ersten Assay wurden die Proben PL 1, PL 2, PL 3 und PL Pool aus Ansatz A (einmalig eingefroren) zu den Untersuchungen von Einfrieren und Wiederauftauen einbezogen. Dabei wurden diese Proben jeweils in Duplikaten gemessen.

Auf die folgenden vier Platten wurden die IP-Eluat aus den Plasmaproben 1 - 3 in je drei technischen Replikaten und die Pool-Probe in vier technischen Replikaten aufgetragen. Das bedeutet, dass die Varianzen zwischen den fünf kompletten Assay-Durchgängen beobachtet werden konnten, nicht jedoch die Tag-zu-Tag-Schwankungen der IP (Intraassay-Varianz).

Die Variationskoeffizienten zwischen den Assay-Durchgängen waren groß (siehe Abb. 11, 12). Sie lagen für alle Proben über 15 %. Der mittlere Variationskoeffizient aus den Proben PL 1, PL 2 und PL 3 betrug für A $\beta$ 38 21,5 %, für A $\beta$ 40 16,1 % und für A $\beta$ 42 24,4 % (siehe Tab. 3.19).

### 3.4.10 Normalisierung der Interassayvarianz mittels der Kontrollproben

Um die Varianzen der Assay-Durchläufe auszugleichen, wurde eine Normalisierung mittels der Plasmapoolprobe aus den Kontrollproben durchgeführt. Dazu wurden zuerst die Korrekturfaktoren berechnet (siehe Tab. 3.20). Durch die Normalisierung konnten die mittleren Variationskoeffizienten zwischen den Assay-Durchgängen deutlich reduziert werden (siehe Tab. 3.19, 3.21).

Zuerst wurde der Mittelwert  $\mu_c$  für die jeweiligen A $\beta$ -Peptide aus Messungen des QC-Plasmapools der fünf Durchgänge berechnet:

$$\mu_c = \frac{1}{5} \sum_{i=1}^5 c_p(i) \quad (3.3)$$

Im Anschluss daran wurde der Korrekturfaktor gebildet, indem der Mittelwert durch die Konzentration  $c_p(i)$  der Poolprobe auf der jeweiligen Platte dividiert wurde:

$$k(i) = \frac{\mu_c}{c_p(i)} \quad (3.4)$$

Die Normalisierung wurde durchgeführt, indem jeder Messwert  $c(i)$  des jeweiligen Peptids mit dem für den Durchgang berechneten Korrekturfaktor multipliziert wurde:

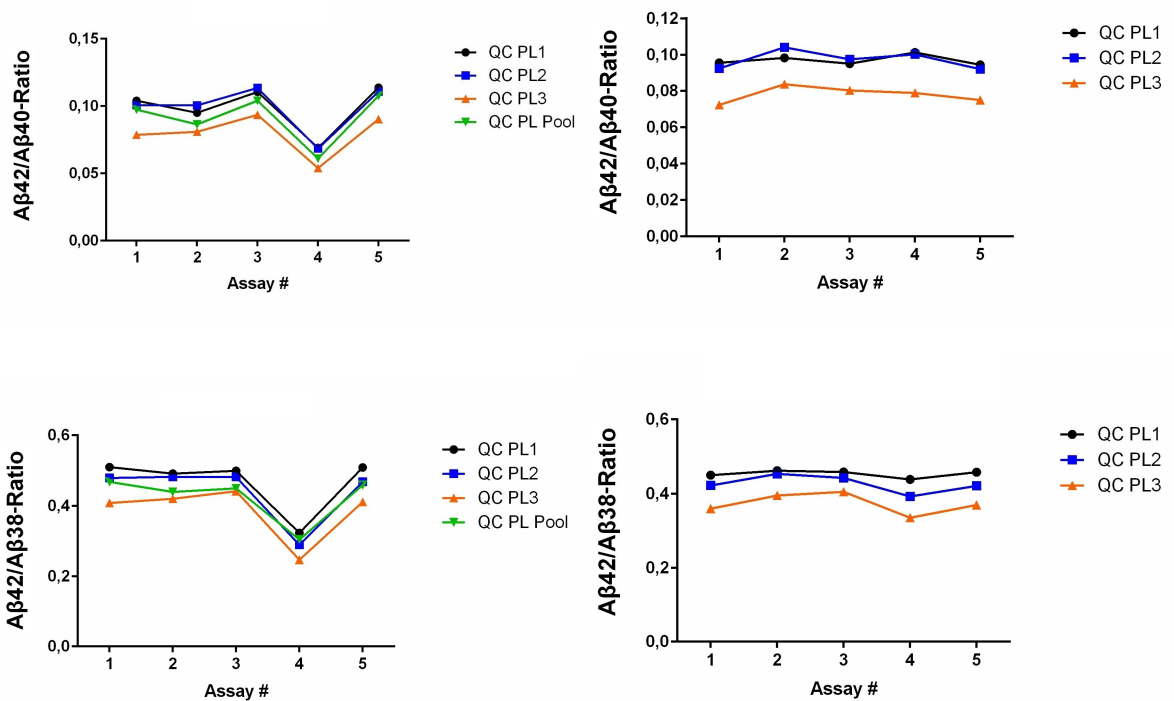
$$c_{norm}(i) = c(i) \cdot k(i) \quad (3.5)$$

Tabelle 3.19: Kontrollproben vor und nach Normalisierung

	Nicht normalisiert				Normalisiert		
	PL 1	PL 2	PL 3	PL Pool	PL 1	PL 2	PL 3
MW A $\beta$ 38	90,73	118,88	95,77	93,48	90,60	119,45	96,06
SD	21,98	23,60	19,54	20,59	8,25	6,25	2,61
% CV	24,22	19,85	20,40	22,03	9,10	5,23	2,71
MW A $\beta$ 40	425,95	522,99	458,65	435,46	428,9	530,48	464,03
SD	83,25	72,72	67,53	93,38	50,97	56,67	42,30
% CV	19,54	13,91	14,72	21,44	11,88	10,68	9,12
MW A $\beta$ 42	41,77	51,57	36,32	38,97	41,53	51,52	36,21
SD	10,90	12,00	8,67	7,67	4,40	5,28	3,42
% CV	26,09	23,26	23,86	19,69	10,60	10,25	9,45
MW A $\beta$ 42/A $\beta$ 40	0,10	0,10	0,08	0,09	0,10	0,10	0,08
SD	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00	0,01	0,00
% CV	18,31	18,25	19,72	20,64	2,90	5,32	5,75
MW A $\beta$ 42/A $\beta$ 38	0,47	0,44	0,39	0,42	0,46	0,43	0,38
SD	0,08	0,08	0,08	0,07	0,01	0,02	0,03
% CV	17,32	19,24	20,43	16,06	2,08	5,50	7,54

Tabelle 3.20: Korrekturfaktoren für die Normalisierung

	Platte 1	Platte 2	Platte 3	Platte 4	Platte 5
Korrekturfaktor A $\beta$ 38	1,194	1,406	0,924	0,798	0,896
Korrekturfaktor A $\beta$ 40	1,158	1,289	0,997	0,747	0,982
Korrekturfaktor A $\beta$ 42	1,064	1,335	0,857	1,095	0,812

Abbildung 11: A $\beta$ 42/A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio vor und nach Normalisierung

Vergleich der Peptid-Ratios vor (links) und nach (rechts) Normalisierung. Die Normalisierung erfolgte anhand von QC PL Pool und wurde auf QC PL1, PL2 und PL3 angewendet. Es wurden plattenspezifische Korrekturfaktoren berechnet, mit denen die Messwerte einer Platte multipliziert wurden. Noch deutlicher als für die Peptide (siehe Abb. 12) fiel die Reduktion der initial hohen Varianz bei der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio und der A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio aus.



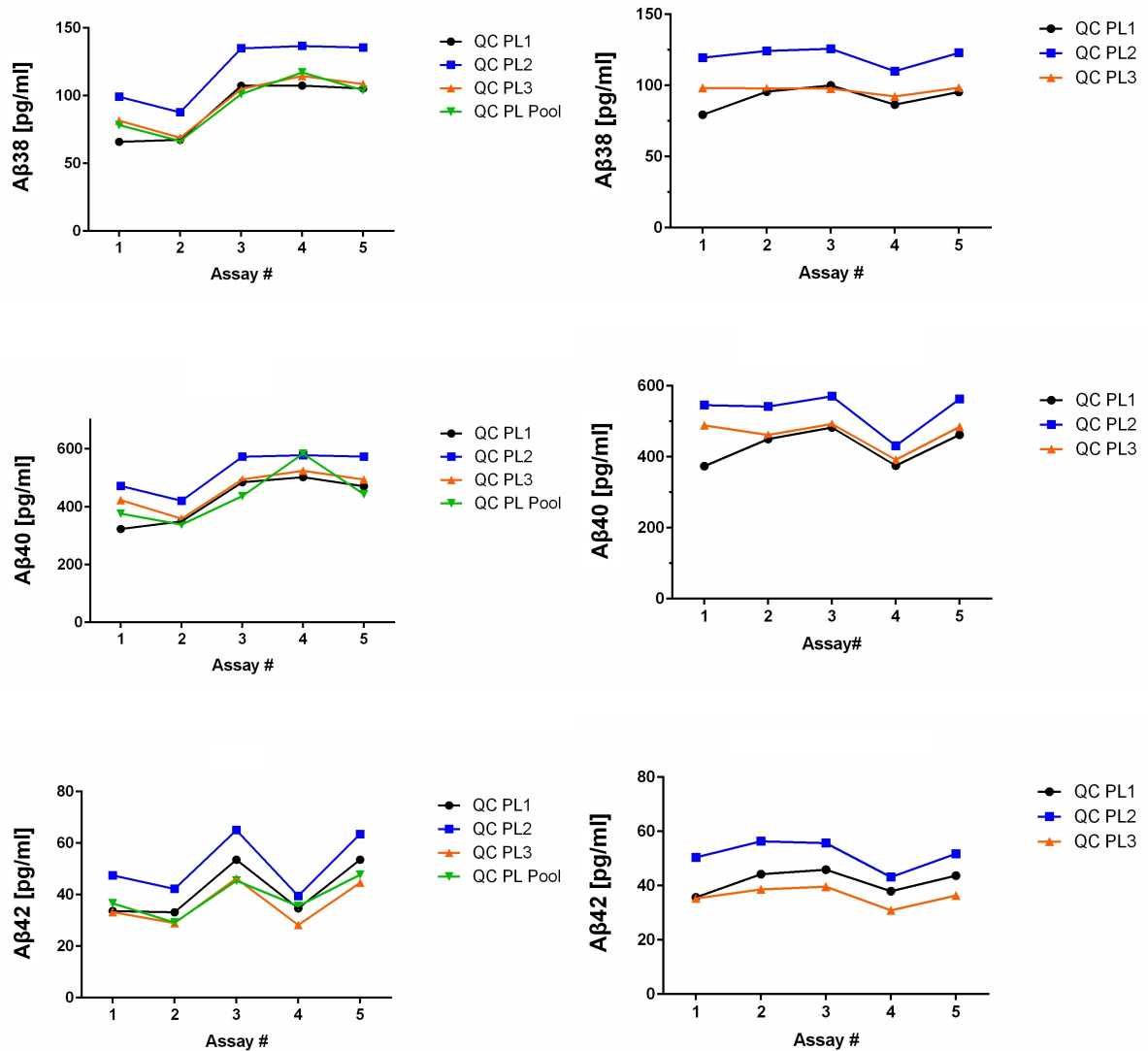


Abbildung 12: **Gemessene Peptidkonzentrationen vor und nach Normalisierung**

Vergleich der Peptid-Konzentrationen vor (links) und nach (rechts) Normalisierung. Die Normalisierung erfolgte anhand von QC PL Pool und wurde auf QC PL1, PL2 und PL3 angewendet. Es wurden plattenspezifische Korrekturfaktoren berechnet, mit denen die Messwerte einer Platte multipliziert wurden. Deutlich zu erkennen ist, dass dadurch die initial hohe Varianz gut reduziert werden konnten.

Tabelle 3.21: Durchschnittliche %CV PL 1 - 3 der QC-Proben vor und nach Normalisierung

	Nicht normalisiert	Normalisiert
A $\beta$ 38	21,49	5,68
A $\beta$ 40	16,06	10,56
A $\beta$ 42	24,40	10,10

### 3.5 Überprüfung des Biomarkers in einer unabhängigen klinischen Kohorte

In einer unabhängigen klinischen Kohorte mit  $n = 40$  Proben mit 22 biomarkernegativen und 18 biomarkerpositiven Proben wurde der neue Biomarkerkandidat „erniedrigte A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Blutplasma bei Alzheimer“ überprüft.

Eingeteilt wurden sie nach der Liquor A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio und Liquor Tau. Dazu wurden die Proben aufgeteilt in zwei Assay-Durchgängen jeweils in Duplikaten gemessen (Assay 4: 7 BM- und 9 BM+; Assay 5: 15 BM- und 9 BM+).

#### 3.5.1 Kohortencharakterisierung

Zur Analyse der beiden Gruppen wurden der einseitige Welch-Test und der exakte Test nach Fisher angewendet (Geschlecht). In Tabelle 3.20 sind sowohl die entsprechenden unkorrigierten p-Werte als auch die Bonferroni-Holm korrigierten p-Werte angegeben.

Die lineare Regression zeigt mit steigendem Alter eine sinkende A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio. Der Einfluss des Alters ist allerdings nicht signifikant ( $p = 0,07$ ), wobei ein Trend erkennbar ist. In dieser Kohorte wiesen die Patientinnen im Mittel eine leicht, nicht signifikant, höhere A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio auf ( $p = 0,56$ ; siehe Abb. 13). Eine schwache bis mittlere Korrelation zwischen der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Liquor und der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Plasma lag in der Kohorte vor, die allerdings nicht signifikant war ( $p = 0,12$ ; siehe Abb. 24).

Tabelle 3.22: Charakterisierung der unabhängigen klinischen Kohorte

Parameter	Total	BM-	BM+	p-Wert	Korr. p-Wert	
n	40	22	18			
Alter				0,1989	0,3977	
	MW $\pm$ SD	74 $\pm$ 7.4	72 $\pm$ 6.6	75 $\pm$ 8.1		
	Median	74	72	78		
	(Min; Max)	(60; 87)	(62; 87)	(60; 85)		
Geschlecht				0,7547	0,7547	
	männlich	23	12	11		
		(57,5%)	(54,5%)	(61,1%)		
	weiblich	17	10	7		
		(42,5%)	(45,5%)	(38,9%)		
Liquor A $\beta$ 1-42				0,0001	0,0003	
	MW $\pm$ SD	801 $\pm$ 292	947 $\pm$ 313	623 $\pm$ 117		
	Median	736 (442;	907 (442;	597 (444;		
	(Min; Max)	1598)	1598)	863)		
Liquor A $\beta$ 1-40				< 0,0001	< 0,0001	
	MW $\pm$ SD	11978 $\pm$ 4210	9072 $\pm$ 3056	15530 $\pm$ 2199		
	Median	11930	8888	15242		
	(Min; Max)	(3562;	(3562;	(11799;		
		20150)	16848)	20150)		
Liquor A $\beta$ 42/A $\beta$ 40- Ratio				< 0,0001	< 0,0001	
	MW $\pm$ SD	0,8 $\pm$ 0,46	1,1 $\pm$ 0,38	0,4 $\pm$ 0,065		
	Median	0,57	1,1 (0,56;	0,41		
	(Min; Max)	(0,26; 1,8)	1,8)	(0,26;		
				0,49)		
Liquor t-TAU				0,0001	0,0004	
	MW $\pm$ SD	485 $\pm$ 421	234 $\pm$ 89	791 $\pm$ 464		
	Median	343 (95;	235 (95;	578 (282;		
	(Min; Max)	1877)	425)	1877)		
Liquor p-TAU				< 0,0001	< 0,0001	
	MW $\pm$ SD	70 $\pm$ 45	40 $\pm$ 11	106 $\pm$ 44		
	Median	56 (22;	40 (22;	91 (56;		
	(Min; Max)	219)	58)	219)		

Tabelle 3.22: Charakterisierung der unabhängigen klinischen Kohorte

Parameter	Total	BM-	BM+	p-Wert	Korr. p-Wert
Amyloid PET vorliegend					
ja	16 (40,0%)	11 (50,0%)	5 (27,8%)		
nein	24 (60,0%)	11 (50,0%)	13 (72,2%)		

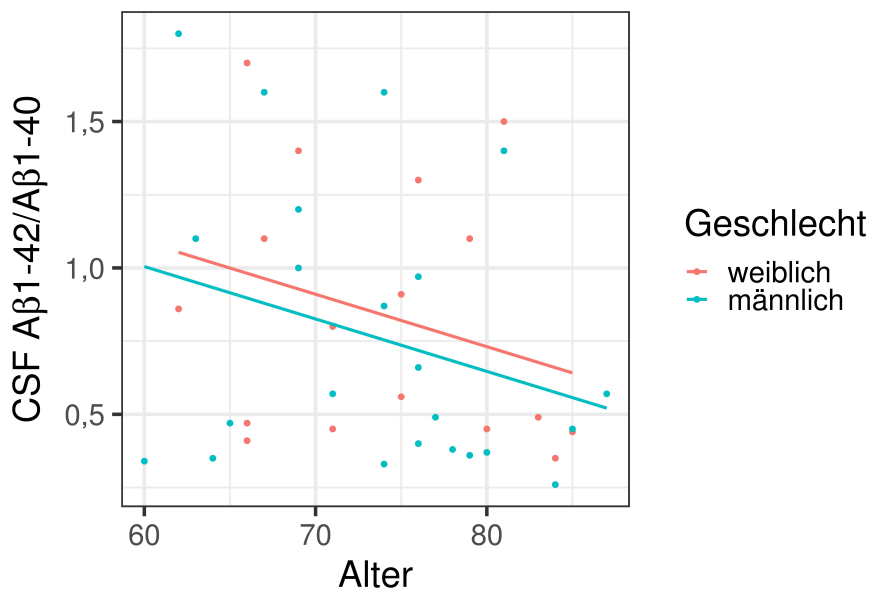


Abbildung 13: **Multiple lineare Regression mit der  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio im Liquor als abhängige Variable und Geschlecht sowie Alter als unabhängige Variablen für die unabhängige Kohorte**

Mit steigendem Alter sinkt die  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio im Liquor, wobei der Einfluss des Alters nicht signifikant ist ( $p = 0,07$ ). Die Patientinnen weisen im Mittel eine leicht höhere, nicht signifikante,  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio im Liquor auf ( $p = 0,56$ ).

### 3.5.2 Auffälligkeiten von Assayplatte vier: Unabhängige klinische Kohorte

Für die nicht-normalisierten Daten zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen Assay vier und fünf für  $A\beta_{42}$ , die  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio und die  $A\beta_{42}/A\beta_{38}$ -Ratio ( $A\beta_{42}$   $p < 0,0001$ ,  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio  $p < 0,0001$ ,  $A\beta_{42}/A\beta_{38}$ -Ratio  $p < 0,0001$ , beidseitiger Mann-Whitney-U-Test, siehe Abb. 14, 16).

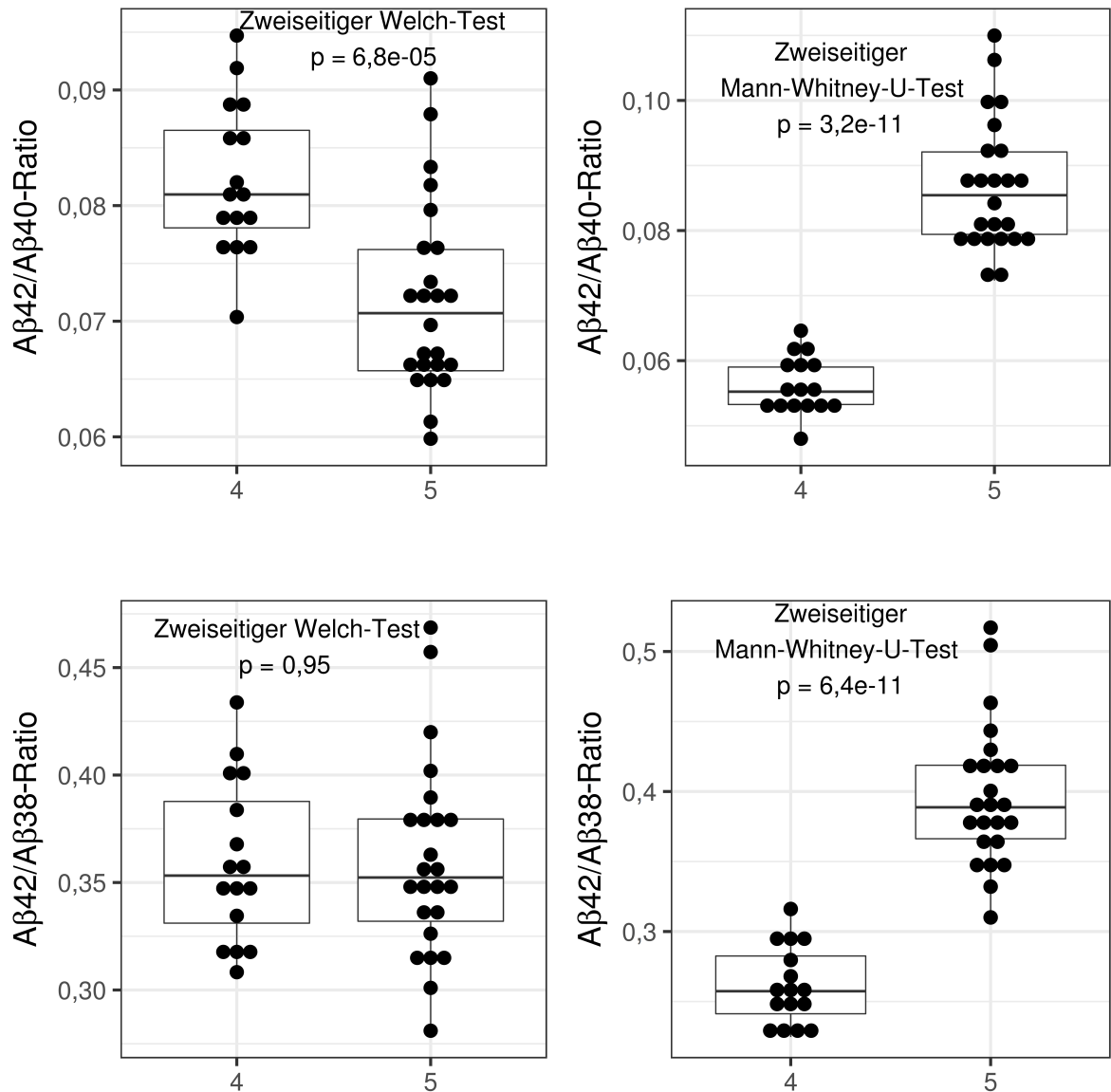


Abbildung 14: Unterschied der nicht-normalisierten und normalisierten  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ - und  $A\beta_{42}/A\beta_{38}$ -Ratio zwischen Assay vier und fünf

Verglichen wurden die Assay-Durchgänge vier und fünf miteinander, in denen die unabhängige Kohorte gemessen wurde. Hierbei wurde die Einteilung in biomarkerpositiv (BM+) und biomarkernegativ (BM-) nicht berücksichtigt. Die  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio unterschied sich ohne (links) und mit (rechts) Normalisierung. Die  $A\beta_{42}/A\beta_{38}$ -Ratio unterschied sich nach Normalisierung nicht signifikant.

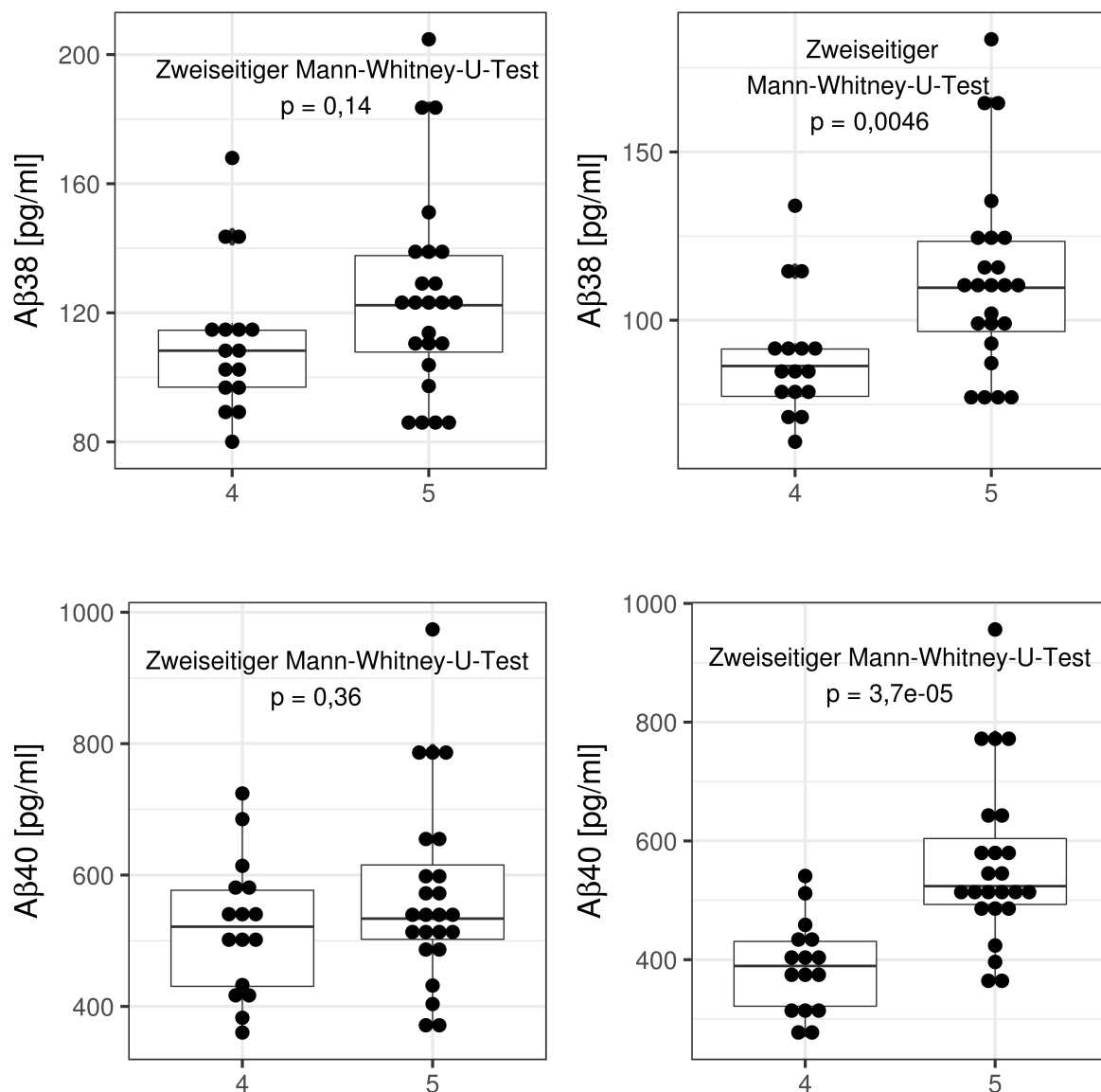


Abbildung 15: Unterschied zwischen nicht-normalisiertem und normalisiertem Aβ38 und Aβ40 zwischen Assay vier und fünf

Verglichen wurden die Assay-Durchgänge vier und fünf miteinander, in denen die unabhängige Kohorte gemessen wurde. Hierbei wurde die Einteilung in biomarkerpositiv (BM+) und biomarkernegativ (BM-) nicht berücksichtigt. Für Aβ38 und Aβ40 lag nach der Normalisierung (rechts) ein signifikanter Unterschied vor.

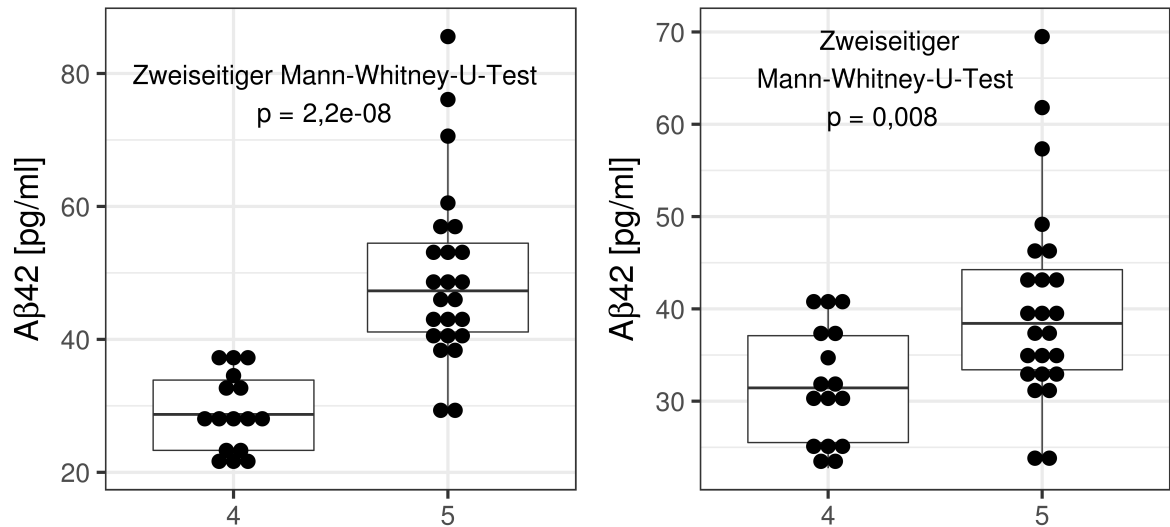


Abbildung 16: **Unterschied zwischen nicht-normalisiertem und normalisiertem Aβ42 zwischen Assay vier und fünf**

Verglichen wurden die Assay-Durchgänge vier und fünf miteinander, in denen die unabhängige Kohorte gemessen wurde. Hierbei wurde die Einteilung in biomarkerpositiv (BM+) und biomarkernegativ (BM-) nicht berücksichtigt. Es lag ein signifikanter Unterschied für Aβ42 ohne (links) und mit (rechts) Normalisierung vor.

Aβ38 und Aβ40 unterscheiden sich nicht signifikant (Aβ38  $p = 0,14$ , Aβ40  $p = 0,36$ , beidseitiger Mann-Whitney-U-Test; siehe Abb. 15).

Um zu überprüfen, ob dieser Unterschied möglicherweise durch eine Normalisierung der Daten reduziert werden kann, wurden die Daten mit den zuvor bestimmten plattenspezifischen Korrekturfaktoren normalisiert (siehe Tab. 3.20).

Beim Vergleich von Assay vier zu Assay fünf anhand der normalisierten Daten, ungeachtet der Gruppe mit alzheimerartigen Biomarkerveränderungen und der Gruppe ohne alzheimerartige Biomarkerveränderungen, zeigt sich ebenso ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Assay-Durchläufen in vier von fünf zu untersuchenden Parametern: Ein signifikanter Unterschied zwischen Assay vier und fünf zeigt sich für Aβ42 ( $p = 0,008$ , beidseitiger Mann-Whitney-U-Test), Aβ40 ( $p < 0,0001$ , beidseitiger Mann-Whitney-U-Test), Aβ38 ( $p = 0,0046$ ) und die Aβ42/Aβ40-Ratio ( $p < 0,0001$ , ungepaarter beidseitiger Welch-Test). Nur die Aβ42/Aβ38-Ratio unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Assaydurchgängen ( $p = 0,95$ , beidseitiger Welch-Test; siehe Abb. 14, 15, 16).

### 3.5.3 Vergleich der biomarkerpositiven mit der biomarkernegativen Gruppe

Um die beiden Gruppen zu vergleichen, wurden die Messwerte normalisiert. Dazu wurden die mittels QC-Proben bestimmten Korrekturfaktoren benutzt (siehe Tab. 3.20). Die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio und die A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio wurden aus den normalisierten Werten gebildet.

Die Normalverteilung wurde jeweils für die biomarkerpositive Gruppe und die biomarkernegative Gruppe für die nicht-normalisierten und normalisierten Daten überprüft.

Für A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 und die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio konnte nach Normalisierung in beiden Gruppen von einer Normalverteilung ausgegangen werden; für A $\beta$ 42 sowie die A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio hingegen nicht (siehe Abb. 17, 18, 19, 20).

In der biomarkerpositiven Gruppe konnte für die die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio vor der Normalisierung keine Normalverteilung angenommen werden (Shapiro-Wilk-Test,  $p = 0,02212$ ). Für die biomarkerpositive Gruppe fiel der Test (Shapiro-Wilk-Test,  $p = 0,16$ ) nach Normalisierung weniger eindeutig aus (siehe Abb. 18, 19).

Bei der biomarkernegativen Gruppe konnte ohne Normalisierung näherungsweise von Normalverteilung ausgegangen werden (Shapiro-Wilk-Test,  $p = 0,44$ ). Nach Normalisierung war sie annähernd normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test,  $p = 0,9153$ , siehe Abb. 21).

Es konnte kein signifikanter Unterschied der normalisierten A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio zwischen der Gruppe mit alzheimerartigen Biomarkerveränderungen und der Gruppe ohne alzheimerartige Biomarkerveränderungen gezeigt werden ( $p = 0,37$ , einseitiger Welch-Test, siehe Abb. 23). Für die normalisierte A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied gezeigt werden ( $p = 0,72$ , einseitiger Mann-Whitney-U-Test, siehe Abb. 24).

A $\beta$ 42 unterscheidet sich signifikant zwischen den beiden Gruppen ( $p = 0,014$ , einseitiger Mann-Whitney-U-Test, siehe Abb. 23). A $\beta$ 38 unterscheidet sich ebenfalls signifikant ( $p = 0,03$ , zweiseitiger Welch-Test, siehe Abb. 22). Auch für A $\beta$ 40 ergibt sich im Mittel ein deutlicher Unterschied, der allerdings nicht statistisch signifikant ist (A $\beta$ 40  $p = 0,1$ , zweiseitiger Welch-Test).

Ähnliche Ergebnisse liegen auch bei den nicht-normalisierten Daten vor. Hier ist ebenfalls für A $\beta$ 42 ein signifikanter Unterschied festzustellen ( $p = 0,017$ , einseitiger Welch-Test), nicht jedoch für A $\beta$ 40 ( $p = 0,17$ , zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test) und A $\beta$ 38 ( $p = 0,095$ , zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test). Die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio unterscheidet sich ebenfalls signifikant ( $p = 0,047$ , einseitiger Mann-Whitney-U-Test). Nicht signifikant ist die A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio ( $p = 0,23$ , einseitiger Mann-Whitney-U-Test).

Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der normalisierten A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Plasma und vorliegenden PET-Daten von 13 Probanden konnte beobachtet werden (siehe Abb. 24).

Von einem Mitarbeiter des Labors wurden 36 von 40 Liquorproben der unabhängigen klinischen Kohorte mit dem MSD-V-Plex-Assay gemessen, mit dem zuvor die Plasmaproben gemessen wurden.



Die Liquorproben wurden zur Messung 16-fach verdünnt mit Diluent 35 und nach der üblichen SOP aufgearbeitet. Durch die 16-fache Verdünnung werden Matrix-Effekte mutmaßlich ausreichend neutralisiert und die Konzentrationen in den Messbereich des Assays verschoben (Klafki et al. 2016).

Die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio, die A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio sowie A $\beta$ 40 und A $\beta$ 38 der mit dem MSD-Triplex gemessenen Liquorproben der unabhängigen Kohorte unterschieden sich signifikant zwischen biomarkerpositiver und biomarkernegativer Gruppe (A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio:  $p < 0,0001$ , A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio:  $p < 0,0001$ , A $\beta$ 40:  $p < 0,0001$ , A $\beta$ 38:  $p < 0,0001$ , einseitiger Mann-Whitney-U-Test). Nur A $\beta$ 42 war nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen ( $p = 0,42$ ).

Die Korrelation der mittels MSD-Triplex gemessenen Liquor A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio zu der normalisierten Plasma A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio war stark signifikant ( $p = 0,012$ , Pearson-Korrelationskoeffizient = 0,41; siehe Abb. 25).

Die normalisierte Plasma A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio korrelierte weiterhin statistisch signifikant mit der in Erlangen mittels ELISA gemessenen Liquorratio ( $p = 0,01$ ; Pearson-Korrelationskoeffizient: 0,45; siehe Tab. 3.23).

Nicht statistisch signifikant korrelierte die normalisierte Plasma A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio mit der an der UMG mittels ELISA gemessenen A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Liquor ( $p = 0,12$ , Pearson-Korrelationskoeffizient = 0,25).

A $\beta$ 42 war signifikant zwischen Liquor-Triplex-Messung und Plasma korreliert ( $p = 0,02$ , siehe Abb. 25). Nicht signifikant korrelierte A $\beta$ 40 ( $p = 0,8$ ; siehe Abb. 25).

Tabelle 3.23: Korrelationsmatrix: Korrelationen der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio in Plasma und Liquor nach verschiedenen Messungen sowie globalen Amyloid-PET-Daten

Pearson r	UMG Plasma, Triplex	UMG CSF, Triplex	UMG CSF, ELISA	Erlangen CSF, ELISA	Amyloid-PET, global
UMG Plasma, Triplex	1	0,4157	0,2492	0,4514	-0,6518
UMG CSF, Triplex	0,4157	1	0,8333	0,9570	-0,5172
UMG CSF, ELISA	0,2492	0,8333	1	0,7534	-0,0442
Erlangen CSF, ELISA	0,4514	0,9570	0,7536	1	-0,5374
Amyloid-PET	-0,6518	-0,51725	-0,0442	-0,5374	1

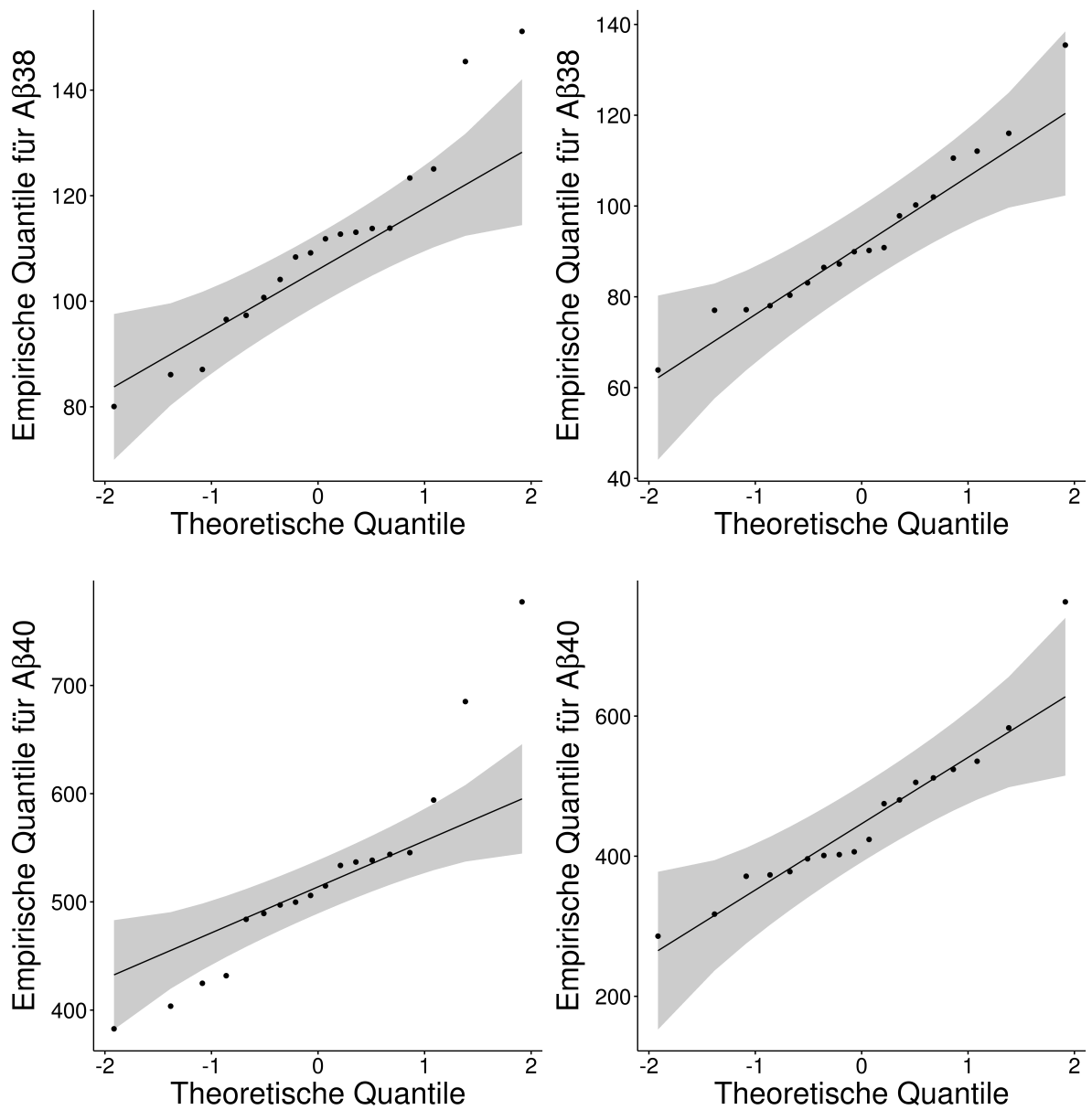


Abbildung 17: **QQ-Plots von A $\beta$ 38 und A $\beta$ 40 der biomarkerpositiven Gruppe in der unabhängigen klinischen Kohorte ohne und mit Normalisierung im Plasma**

Die Peptidkonzentrationen von A $\beta$ 38 und A $\beta$ 40 waren nach Normalisierung (rechts) annähernd normalverteilt.

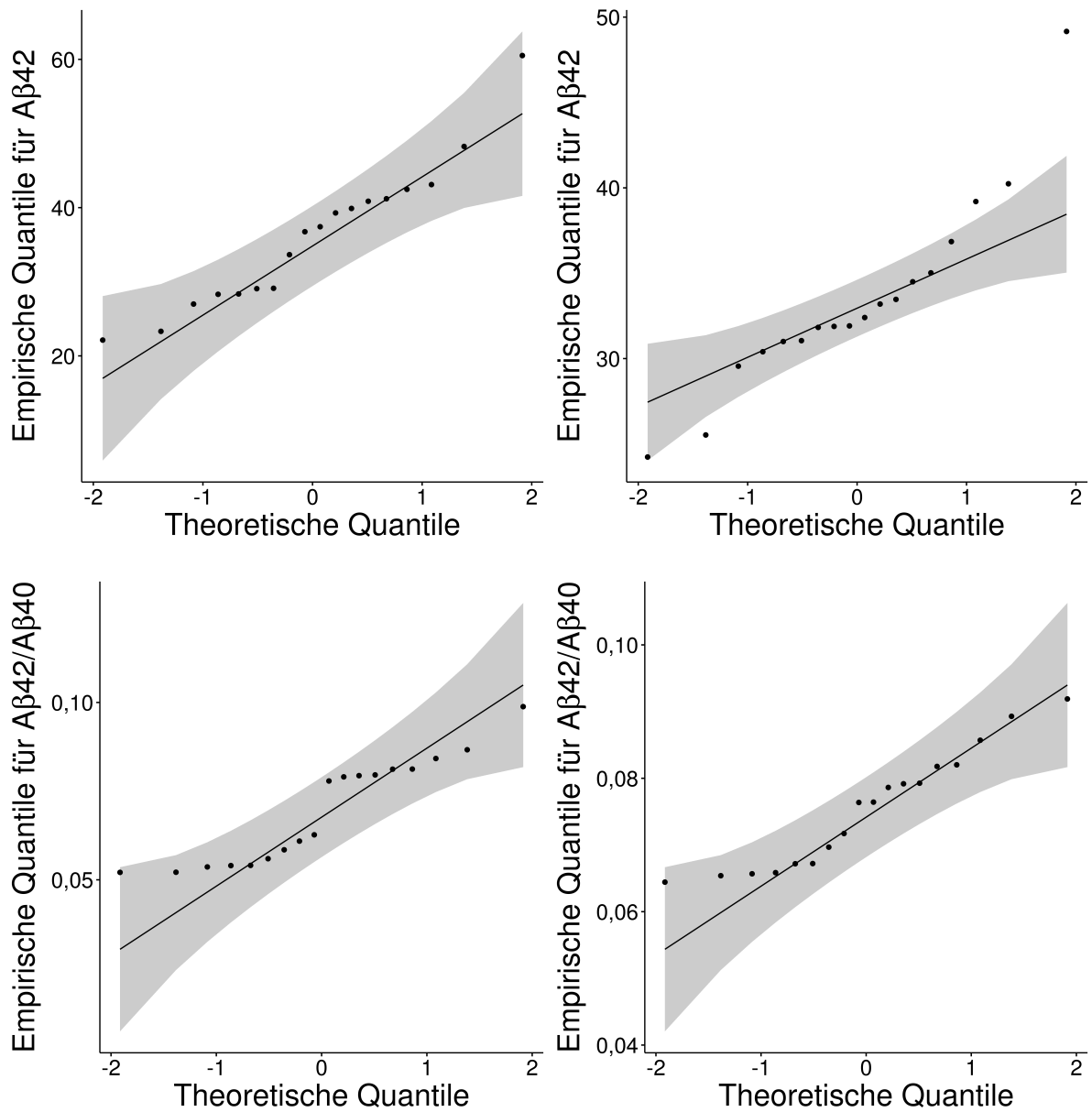


Abbildung 18: **QQ-Plots von Aβ42 und der Aβ42/Aβ40-Ratio der biomarkerpositiven Gruppe in der unabhängigen klinischen Kohorte ohne und mit Normalisierung im Plasma**

Aβ42 war nach Normalisierung (rechts) nicht normalverteilt und die Aβ42/Aβ40-Ratio war näherungsweise normalverteilt.

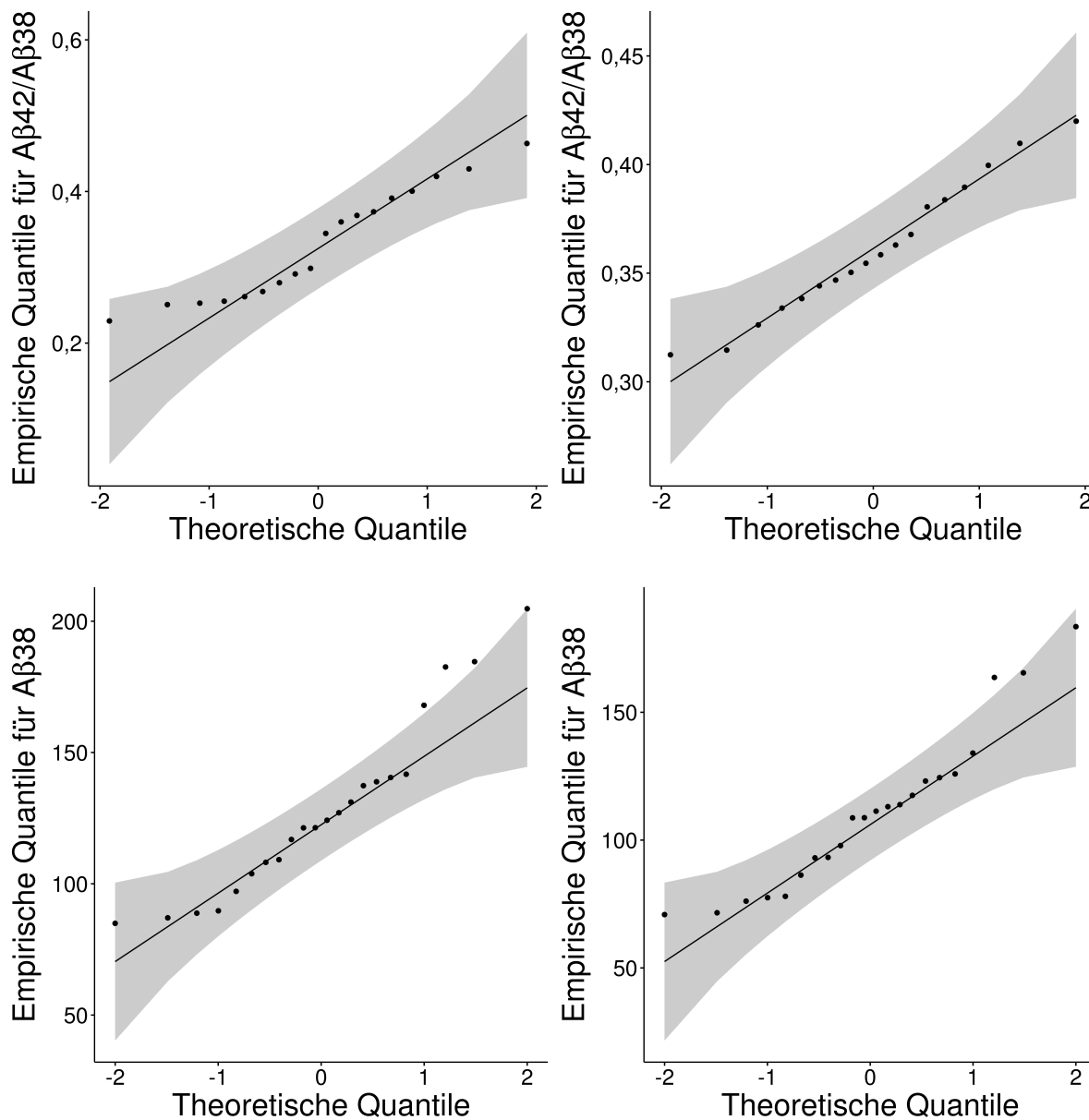


Abbildung 19: **QQ-Plots der Aβ42/Aβ38-Ratio (biomarkerpositive Gruppe) und von Aβ38 (biomarkernegative Gruppe) in der unabhängigen klinischen Kohorte ohne und mit Normalisierung im Plasma**

Die Aβ42/Aβ38-Ratio in der biomarkerpositiven Gruppe war vor (links) und nach Normalisierung (rechts) annähernd normalverteilt. In der biomarkernegativen Gruppe war Aβ38 vor und nach Normalisierung annähernd normalverteilt.

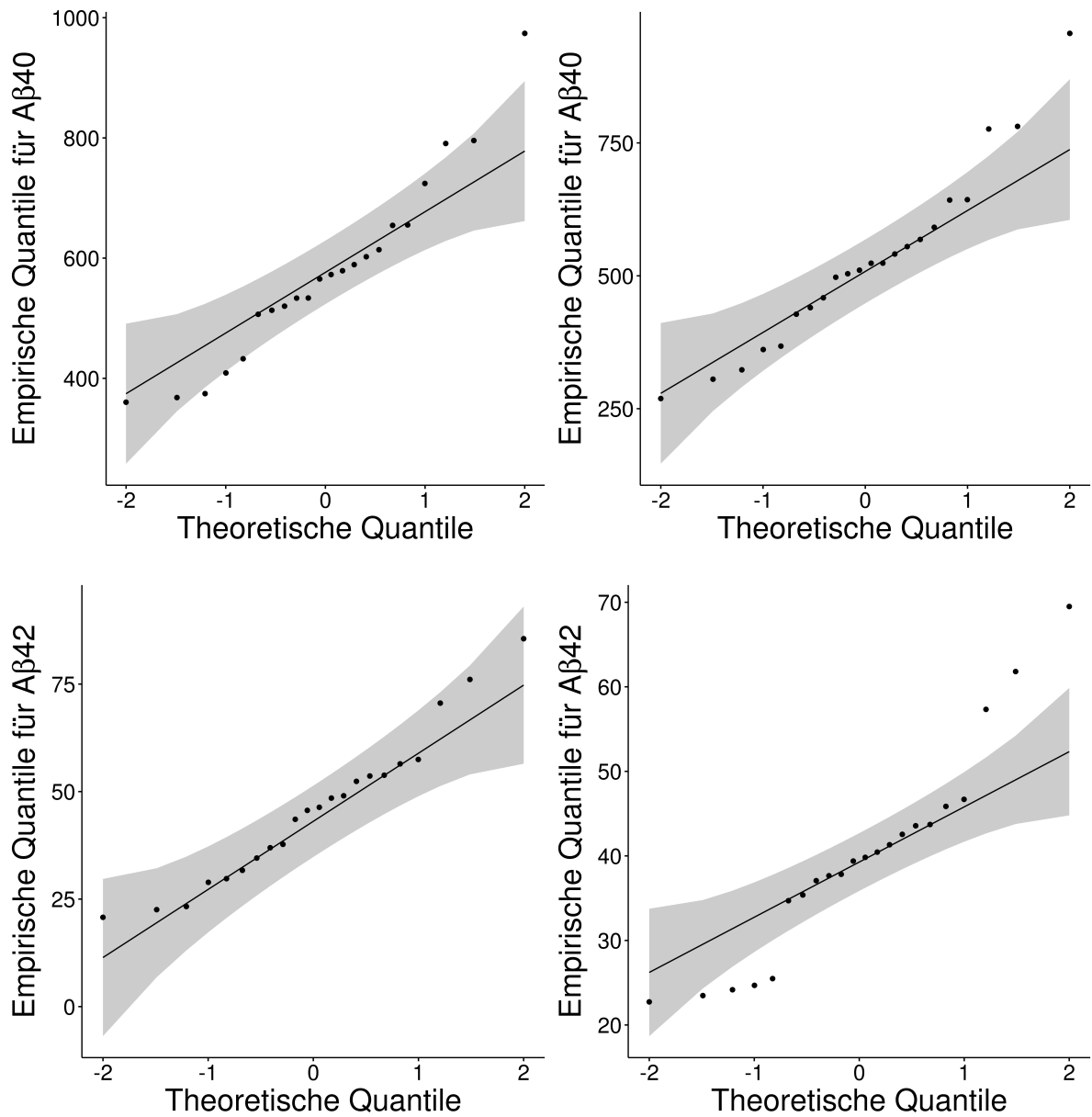


Abbildung 20: **QQ-Plots von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 der biomarkernegativen Gruppe in der unabhängigen klinischen Kohorte ohne und mit Normalisierung im Plasma**

Die Peptidkonzentrationen von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 wiesen nach Normalisierung (rechts) keine Normalverteilung auf.

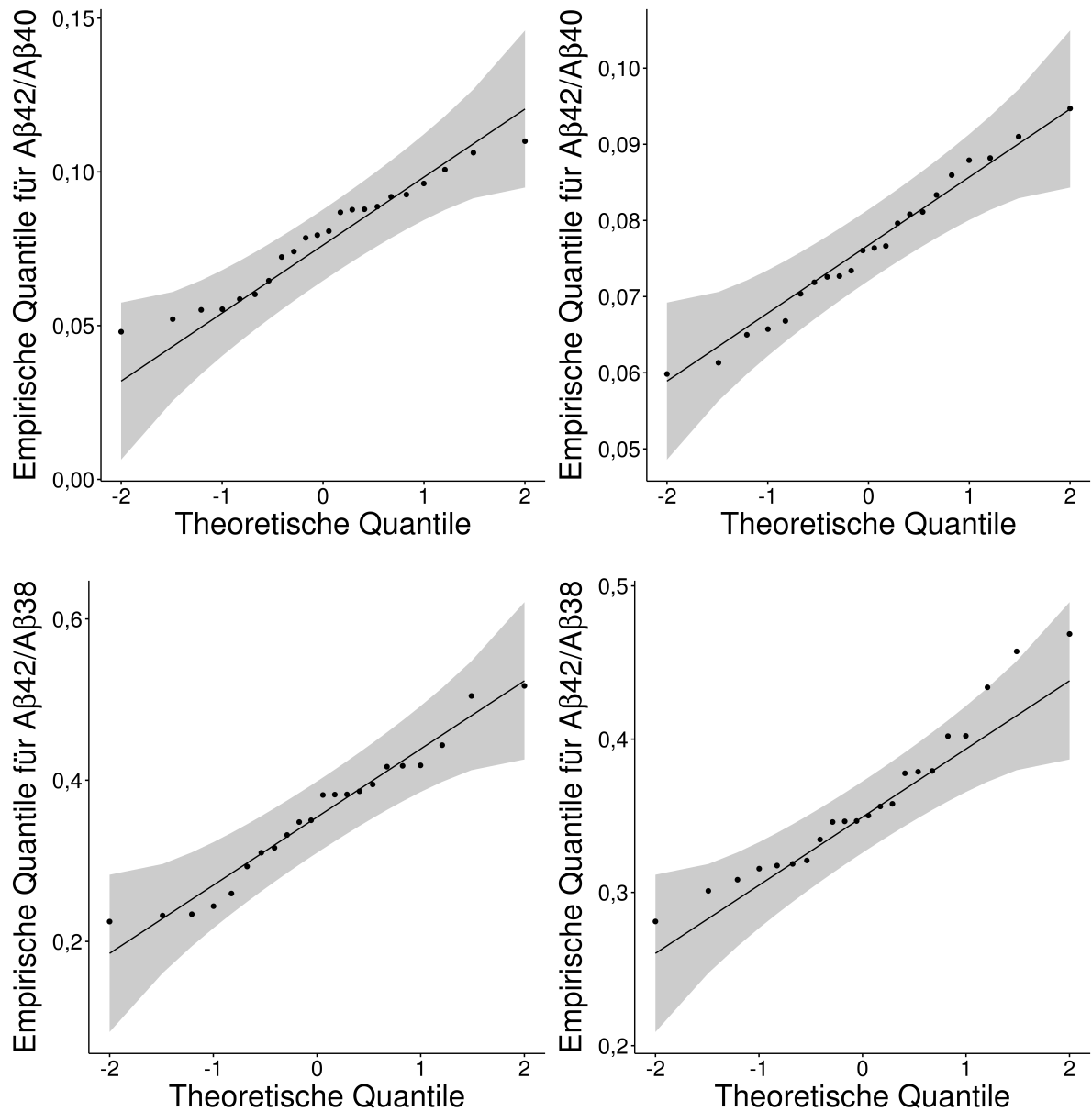


Abbildung 21: **QQ-Plots von Aβ42/Aβ40-Ratio und der Aβ42/Aβ38-Ratio der biomarkerneгатiven Gruppe in der unabhängigen klinischen Kohorte ohne und mit Normalisierung im Plasma**

Nach Normalisierung (rechts) waren die Ratios annähernd normalverteilt.

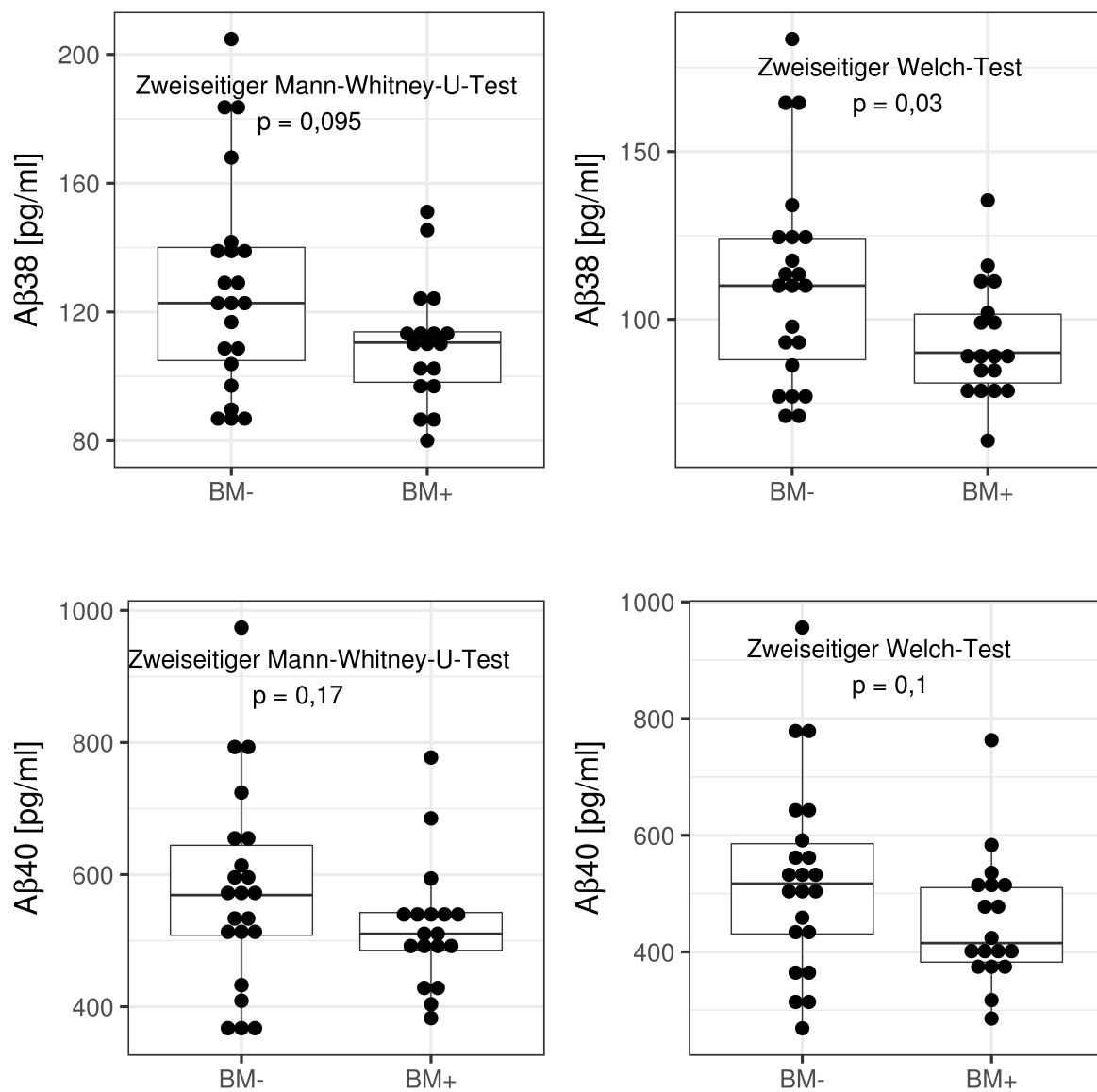


Abbildung 22: **Signifikanzniveau von Aβ38 und Aβ40 in der unabhängigen klinischen Kohorte ohne und mit Normalisierung**

Aβ38 unterschied nur nach Normalisierung (rechts) signifikant zwischen biomarkerpositiver Gruppe (BM+) und biomarkernegativer Gruppe (BM-). Aβ40 war nicht signifikant unterschiedlich.

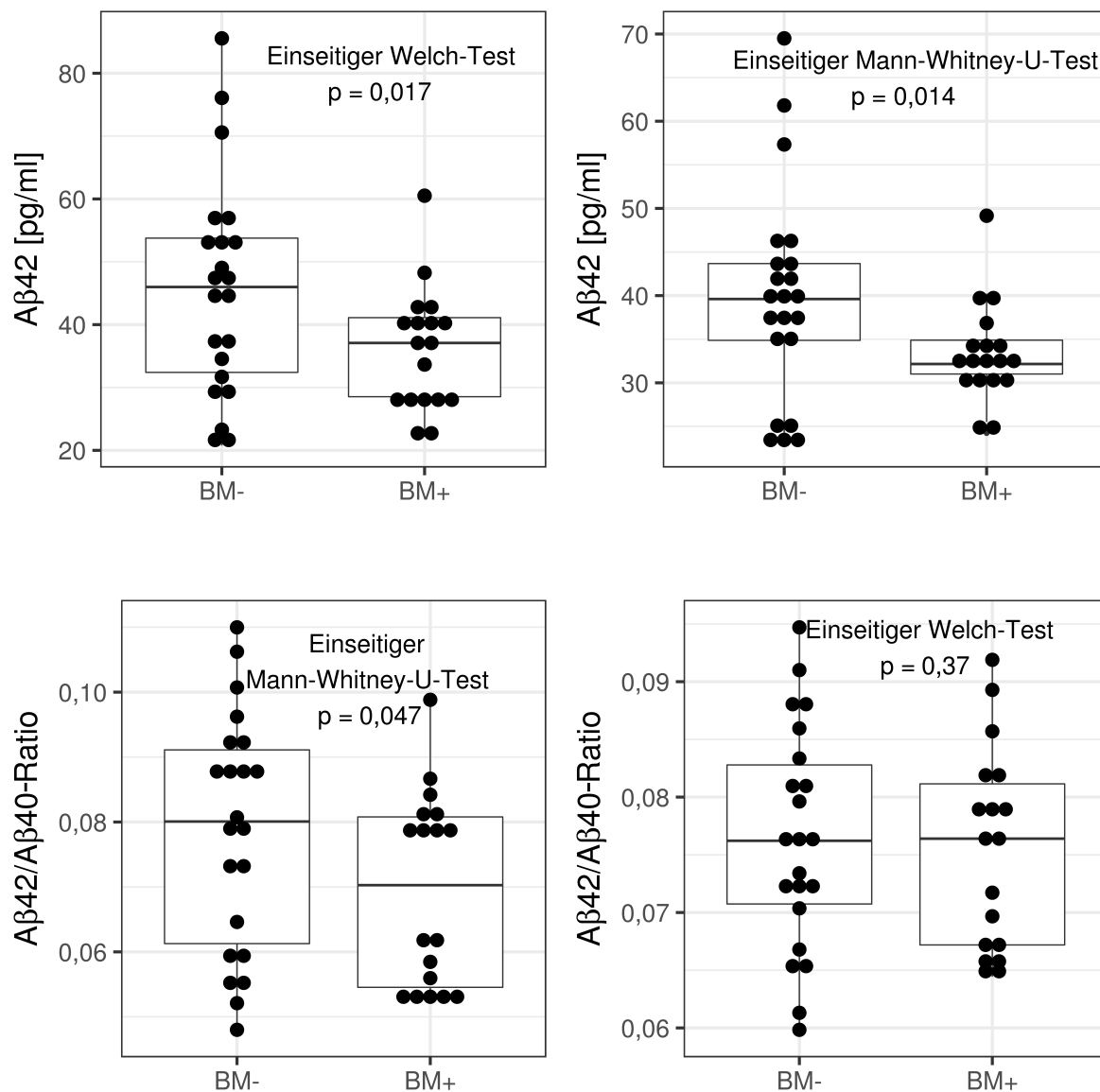


Abbildung 23: **Signifikanzniveau von Aβ42 und Aβ42/Aβ40-Ratio der unabhängigen klinischen Kohorte ohne und mit Normalisierung**

Aβ42 und unterschied sich sowohl ohne (links) als auch mit Normalisierung (rechts) signifikant zwischen biomarkerpositiver Gruppe (BM+) und biomarkernegativer Gruppe (BM-). Die Aβ42/Aβ40-Ratio unterschied sich nach Normalisierung (rechts) nicht signifikant.



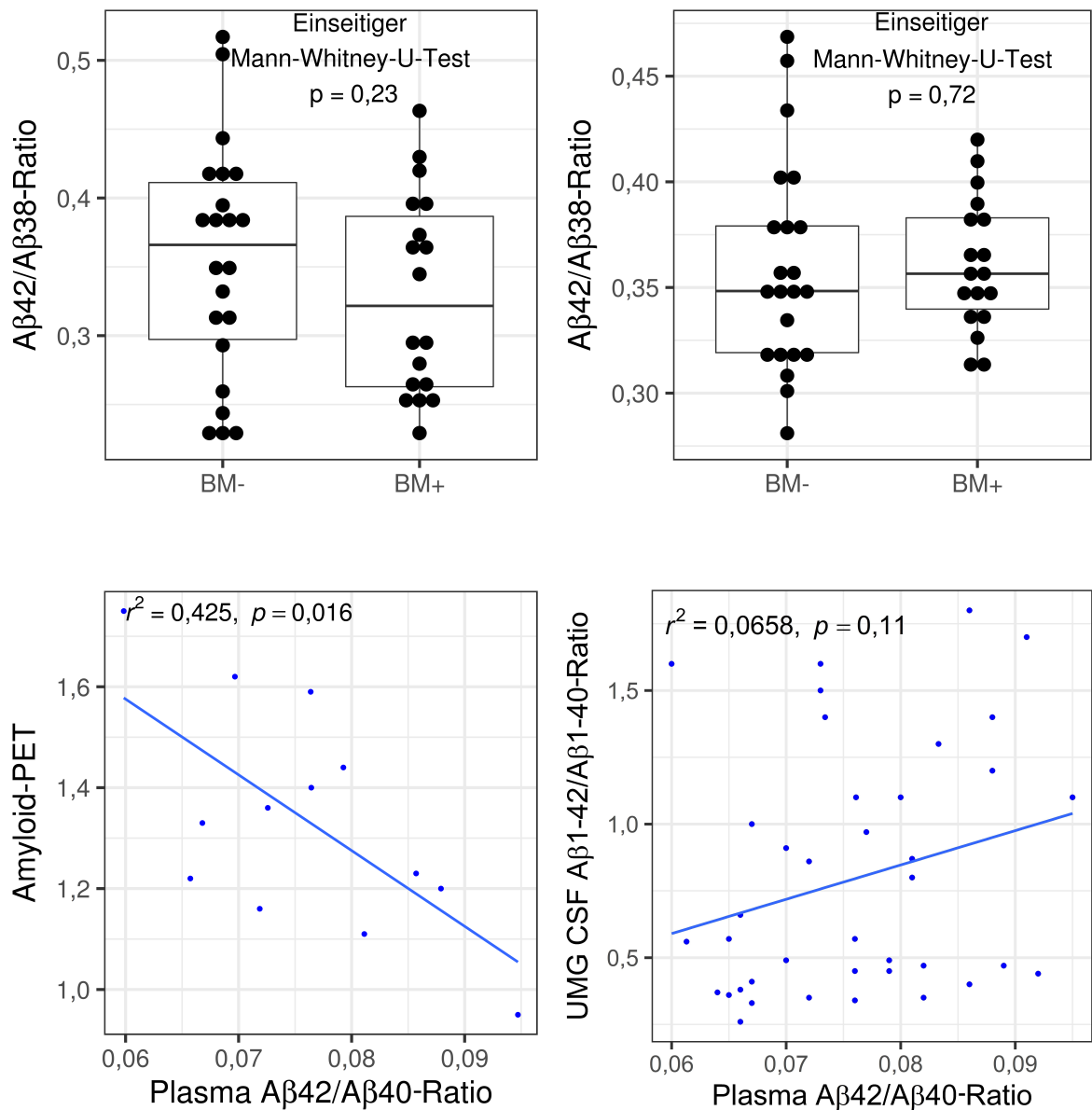


Abbildung 24: **A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio** in der unabhängigen klinischen Kohorte ohne und mit Normalisierung sowie die lineare Regression: **Korrelation** zwischen normalisierter A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Plasma und globalen Amyloid-PET-Daten bzw. der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Liquor

Es lag vor (links) und nach Normalisierung (rechts) kein signifikanter Unterschied der A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio zwischen biomarkerpositiver Gruppe (BM+) und biomarkernegativer Gruppe (BM-) vor. Zwischen Amyloid-PET und normalisierter Plasma A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio lag eine signifikante negative Korrelation vor. Keine statistische Signifikanz erreichte die schwache bis mittlere Korrelation zwischen der Plasma A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio und Liquor A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio.

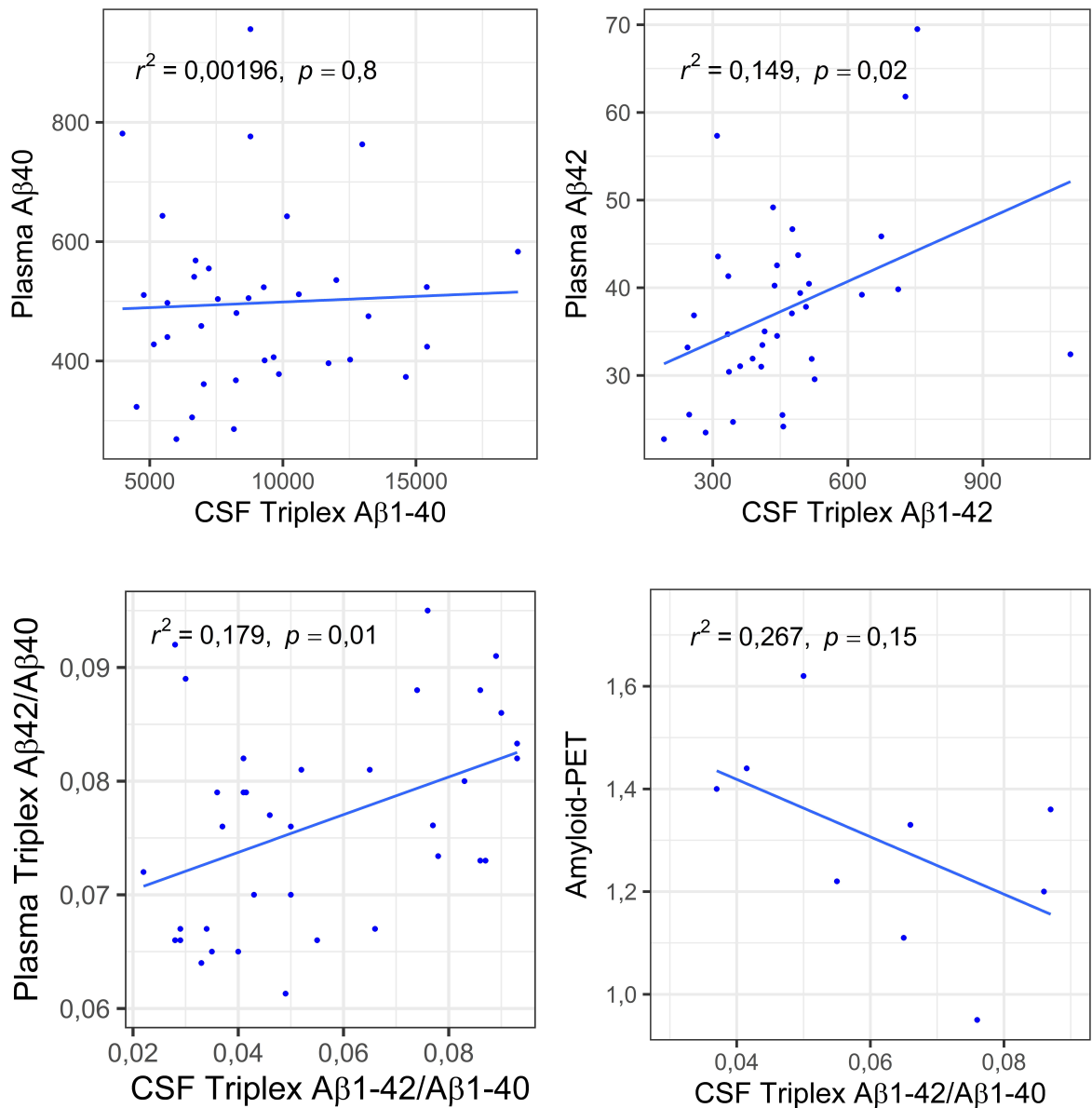


Abbildung 25: **Lineare Regression: Korrelation zwischen normalisiertem A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 und der normalisierten A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Plasma und den im Liquor mittels MSD-Triplex gemessenen Peptidkonzentrationen sowie den globalen Amyloid-PET-Daten.**

Die lineare Regression für die Konzentration im Liquor und der normalisierten Konzentration im Plasma gemessenen A $\beta$ 40 Konzentration deutet darauf hin, dass keine Korrelation vorliegt. A $\beta$ 42 und die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio korrelieren hingegen positiv signifikant zwischen Plasma und Liquor. Zwischen Amyloid-PET und im Liquor gemessener A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio lag eine schwache, nicht signifikante, negative Korrelation vor.

## 4 Diskussion

In einer Publikation wurde von Shahpasand und Kollegen ein neu entwickelter zweischrittiger Immunoassay vorgestellt (Shahpasand-Kroner et al. 2018). Mittels des Assays war es möglich A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 trotz der sehr geringen Konzentrationen im Plasma semiquantitativ gleichzeitig zu messen. Ein signifikanter Unterschied in dem Quotienten der Amyloid- $\beta$ -Peptide A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 zwischen einer Gruppe mit alzheimerartiger Pathologie und einer Gruppe ohne Pathologie wurde beobachtet, was im Einklang mit den publizierten Befunden von Ovod et al. (2017) und Nakamura et al. (2018a) war.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Verbesserung des praktischen Arbeitsablaufs durch Einfrieren der Proben zwischen dem ersten Schritt (Immunpräzipitation) und dem zweiten Schritt (Messung der A $\beta$ 38, A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 Konzentrationen in den IP-Eluaten sowie eine technische „*Fit-for-purpose*“-Assay-Validierung, um zu zeigen, dass das Testverfahren des Zwei-Schritt-Immunoassays für die Untersuchung der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Quotienten in EDTA-Blutplasmaproben geeignet ist. Weiterhin sollte überprüft werden, ob die von Shahpasand-Kroner et al. (2018) beobachtete Verringerung der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio bei Patienten mit einer Demenz vom Alzheimerart im Vergleich zu Patienten mit anderen Demenzen in einer unabhängigen klinischen Stichprobe, die allein anhand der an der UMG gemessenen Liquor-Biomarker A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio und Tau in die Gruppen unauffällig/auffällig und im Einklang mit einer möglichen Alzheimerkrankheit dichotomisiert wurde.

Als Leitfaden für die Validierung diente eine Publikation von Andreasson und Kollegen, in der sie Vorschläge für die gezielte Validierung eines neuen Assayverfahrens machen (Andreasson et al. 2015).

### 4.1 Stellenwert der Amyloid- $\beta$ -Peptide

Früher war die Diagnose Alzheimerdemenz vor allem klinisch zu stellen. Nach den NINCDS-ADRDA Kriterien von 1984 beruhte die Diagnose wesentlich auf zwei Säulen: Die Feststellung eines dementiellen Syndroms und dem Ausschluss anderer möglicherweise reversibler Ursachen (McKhann et al. 1984).

Obwohl diese Kriterien nur eingeschränkt dazu geeignet waren zwischen Alzheimerdemenz und anderen Demenzen zu unterscheiden, konnten Knopman und Kollegen zeigen, dass sie eine studienübergreifende Spezifität von 70 % oder eine Sensitivität von 81 % hatten (Knopman et al. 2001).

2011 wurden die Diagnosekriterien überarbeitet und umfassen jetzt zusätzlich Diagnostikver-

fahren, die auf Biomarkern basieren. Dazu gehören natürlich die A $\beta$ -Peptide und die Tau-Proteine im Liquor cerebrospinalis und bildgebende Verfahren wie Amyloid-PET, FDG-PET oder MRT (McKhann et al. 2011). Mehrere internationale Arbeitsgruppen vermerken, dass die Kombination verschiedener Biomarker im Liquor miteinander, aber auch mit Bildgebungsdaten und dem klinischen Bild, zu präziseren diagnostischen Ergebnissen führt (Andreasen et al. 2001; 2003; Lewczuk und Wiltfang 2008). Aktuell gibt es vielversprechende Publikationen, die eine starke Korrelation der Plasma-Biomarker mit dem Amyloid-PET zeigen (Schindler et al. 2019).

Es konnte gezeigt werden, dass eine erniedrigte Konzentration von A $\beta$ 42 im Liquor schon im Stadium des MCI nachweisbar ist und für die Entwicklung einer Alzheimerdemenz hinweisend ist (Wiltfang et al. 2001; 2002; Blennow et al. 2001; Hansson et al. 2006; Mattsson et al. 2009). Diese Veränderung der Peptidkonzentrationen bereits Jahre vor den ersten Symptomen wurde mittlerweile vielfach bestätigt. Buchhave et al. (2012) zeigten, dass schon fünf bis zehn Jahre vor Beginn der Demenz A $\beta$ 42 im Liquor reduziert ist, wobei Tau und phospho-Tau später als A $\beta$ 42 Veränderungen zeigen. Einige Studien konnten einen Nachweis von 20 bis 30 Jahren vor der Diagnose zeigen (Jansen et al. 2015). Die Ursache für die erniedrigte Konzentration des A $\beta$ 42 ist nach wie vor unklar; verschiedene Hypothesen werden jedoch diskutiert (Spies et al. 2012; Lewczuk et al. 2018).

Die gängige Hypothese über die Entstehung der Neuropathologie bei der Alzheimerdemenz ist die Amyloid-Kaskaden-Hypothese. Sie besagt, dass die Akkumulation von Amyloid- $\beta$ -Peptiden in bestimmten Hirnregionen eine Kaskade von pathologischen Veränderungen auslöst, die zum Untergang von Synapsen und Nervenzellen und den daraus resultierenden kognitiven Verlusten führt (Hardy und Higgins 1992).

Die A $\beta$ -Peptide entstehen dabei aus dem Amyloid-Precursor-Protein (APP). Dieses Transmembranprotein hat durch alternatives Splicen drei Isoformen, von denen das APP 695 dasjenige ist, welches vor allem im Gehirn vorkommt (Panegyres 1997). Es wird durch die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase an unterschiedlichen Stellen gespalten (Selkoe 2001).

Es gibt eine sogenannte amyloidogene und eine nicht-amyloidogene Prozessierung. Bei dem amyloidogenen Weg wird APP durch die  $\beta$ -Secretase (BACE 1) zuerst zum löslichen sAPP $\beta$  und membranständigen CFT $\beta$  gespalten. Im Anschluss trennt die  $\gamma$ -Secretase von CTF $\beta$  das Amyloid- $\beta$  ab. Zurück bleibt die AICD; die intrazelluläre APP-Domäne (Selkoe 2001). Selkoe und Wolfe haben gezeigt, dass die  $\gamma$ -Sekretase an verschiedenen Positionen spalten kann (Selkoe und Wolfe 2007).

Beim nicht-amyloidogenen Weg trennt die  $\alpha$ -Secretase (BACE 2) sAPP $\alpha$  und CTF $\alpha$ , welches dann von der  $\gamma$ -Secretase zum AICD und Fragment p3 gespalten wird. Es wird kein Amyloid- $\beta$  gebildet (Esch et al. 1990). Die Bildung von Amyloid- $\beta$  ist allerdings ein normaler sekretorischer Vorgang von Zellen (Busciglio et al. 1993).

In den Plaques dominiert das Amyloid- $\beta$ -Peptid A $\beta$ 42 (Roher et al. 1993). Bezüglich der löslichen Peptidkonzentrationen sind allerdings A $\beta$ 40 gefolgt von A $\beta$ 38 die am häufigsten beobachteten Formen (Wiltfang et al. 2002). A $\beta$ 40 wird häufig als Äquivalent für die Gesamtproduktion der Amyloid- $\beta$ -Peptide angesehen (Wiltfang et al. 2007; Hansson et al. 2007).

Die physiologische Funktion der Amyloid-Peptide ist noch nicht geklärt. Vermutlich erfüllen sie eine Funktion in der normalen Kommunikation zwischen Nervenzellen (Abramov et al. 2009). Ungeklärt ist auch, aus welchem Grund die extrazelluläre Plaquetbildung zum Zelluntergang und zu kognitiver Einschränkung führt (Bates et al. 2009). Mutmaßlich sind die löslichen Oligomere ursächlich (Walsh et al. 2002; Zetterberg et al. 2010).

Derzeit als Biomarker von Interesse sind A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42, sowie die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio und die A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio in Liquor und Plasma. Eine zentrale Bedeutung haben insbesondere erniedrigtes A $\beta$ 42 und die erniedrigte A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio bei der Alzheimerkrankheit.

Diverse Wissenschaftler haben gezeigt, dass die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio eine stärkere Aussagekraft als diagnostischer Biomarker für die Alzheimerdemenz hat als A $\beta$ 42 allein (Lewczuk et al. 2004a; Hansson et al. 2007; Lewczuk et al. 2015; Janelidze et al. 2016b; Willemse et al. 2017; Vogelgsang et al. 2018b; Schauer et al. 2018). Dabei führen sie unterschiedliche Hypothesen an, durch die erklärt werden kann, dass die Ratio im Liquor anscheinend besser Alzheimerpatienten und entsprechende Kontrollgruppen differenzieren kann als A $\beta$ 42 allein.

Zum einen scheint sich anzudeuten, dass die *Cut-off*-Werte für die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio weniger stark voneinander abweichen als für die jeweiligen Amyloid- $\beta$ -Peptide. Lewczuk et al. (2018) haben zwei Studien verglichen und zwei nahezu identische *Cut-off*-Werte bei unterschiedlichen ELISA-Sets und verschiedenen Laboren beobachtet.

Zum anderen ist die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio zur Abgrenzung gegenüber anderen Demenzformen besser geeignet als A $\beta$ 42 allein (Janelidze et al. 2016b). Andreasen et al. (2001) haben gezeigt, dass A $\beta$ 42 im Liquor die geringste Abgrenzbarkeit gegenüber vaskulärer Demenz hat. Vogelgsang et al. (2018b) konnten zeigen, dass durch die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Liquor übereinstimmendere Interpretation von Messwerten zweier Labore mit zwei verschiedenen Assays erreicht werden konnten als mit A $\beta$ 42 (Reduktion der widersprüchlichen Interpretationen von Messwerten von 31,5 % auf 16,8 %).

Schauer et al. (2018) sehen zwei weitere mögliche Ursachen: Entweder korrigiert die Ratio für den Verlust der Peptide während der Prozedur oder sie spiegelt den veränderten Stoffwechsel wider, der zur Aggregation der Peptide führt. Eine ähnliche Erklärung reflektierten Janelidze et al. (2016b): Möglicherweise findet durch die Ratio eine Korrektur der interindividuellen Konzentrationsunterschiede statt. Damit würde die Ratio die Funktion einer Normalisierung übernehmen (Lewczuk et al. 2015; Klafki et al. 2016).

Auch die A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio im Liquor scheint ein guter Marker zu sein. Janelidze et al. (2016a) konnten zeigen, dass sie ähnlich wie die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio einen positiven Amyloid-PET-Befund voraussagen kann. Zusammenfassend sind die Peptide und Ratios gut belegte und weithin akzeptierte Biomarker für die Früherkennung und Diagnostik.

#### 4.1.1 Einflussfaktoren auf die Konzentrationen der Peptide und die Analyse

Beschrieben wurden bisher zahlreiche Einflussfaktoren, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen: *in vivo* und *in vitro*. Die Faktoren *in vivo* müssen unterteilt werden in diejenigen, die

sich auf die Konzentration im Liquor auswirken und diejenigen, welche die Konzentration im Plasma beeinflussen. Einige überschneiden sich dabei.

#### 4.1.1.1 *In vivo*

Zu den Faktoren, die die Liquor-Konzentration beeinflussen, werden in der Literatur vor allem Konzentrationsgradienten entlang des Rückenmarks sowie Blutbeimengungen bei der Liquorpunktion genannt. Konzentrationsgradienten im Rückenmark konnten Bjerke et al. (2010) für A $\beta$ 42 nicht beobachten, jedoch eine deutliche Reduktion von A $\beta$ 42, falls es eine Blutbeimengung gab. Als einen sehr wahrscheinlichen Grund dafür führen sie die Proteine aus dem Blut an, die die Amyloid- $\beta$ -Peptide binden (Bjerke et al. 2010).

Tageszeitliche Schwankungen der Amyloid- $\beta$ -Peptide im Liquor stellten Bateman et al. (2007) fest. Im Gegensatz dazu fanden Bjerke et al. (2010) keine zirkadianen Schwankungen. Zwischen beiden Untersuchungen unterschieden sich jedoch die Entnahmebedingungen und -mengen. Slats et al. (2012) hingegen stellten leichte zirkadiane Schwankungen fest. Sie führten aus, dass diese Schwankungen durch Stoffwechselprozesse bedingt sein könnten.

Im Blut konnten geringgradige zirkadiane Schwankungen für A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42, nicht jedoch für die Ratios gezeigt werden (Rózga et al. 2019). Weitere Faktoren, welche die Konzentration im Blut beeinflussen, sind Plasmaproteine, eventuelle tageszeitliche Schwankungen, die Blut-Hirn-Schranke und die Blut-Liquor-Schranke (Lewczuk und Wiltfang 2008; Spies et al. 2012). Ebenso scheint die Nierenfunktion eine gewisse Rolle zu spielen (Gronewold et al. 2016; Vogelgsang et al. 2018a; Nakamura et al. 2018b). Viele andere Faktoren nehmen vermutlich Einfluss auf die Konzentrationen. Dazu gehören Medikamente, der Zeitpunkt der Blutentnahme, die Ernährung, sportliche Aktivität und viele weitere (Henriksen et al. 2014; Janelidze et al. 2016a; O'Bryant et al. 2017).

#### 4.1.1.2 *In vitro*

Faktoren, die *in vitro* die Analyse der A $\beta$ -Peptiden in biologischen Proben beeinflussen sind die Eigenschaften der Peptide, wie Neigung zu Aggregation, Adsorption und Hydrophobie, ihre Gewinnung, die verwendeten Probengefäße und die präanalytische Verarbeitung der Proben sowie das jeweilige Labor. Verschiedene Methoden und Antikörper sorgen insbesondere während der Analyse für unterschiedliche Ergebnisse.

Für A $\beta$ 42 wurde mehrfach nachgewiesen, dass es eine erhöhte Neigung zur Aggregation *in vivo* und *in vitro* hat (Lewczuk et al. 2006; Bjerke et al. 2010). Im Gegensatz dazu neigt A $\beta$ 40 weniger zur Aggregation. Die Peptide unterscheiden sich des Weiteren in ihrem Adsorptionsverhalten gegenüber den Reaktionsgefäßwänden. Auch in diesem Fall weist A $\beta$ 42 die stärkste Adsorption auf, gefolgt von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 38 (Toombs et al. 2018).

Als eine Ursachen für die starke Adsorption, insbesondere des A $\beta$ 42, werden die hydrophoben Eigenschaften der Peptide diskutiert (Vanderstichele et al. 2000; Schauer et al. 2018): Dabei

fürte die Verwendung von LoBind-Reaktionsgefäßen zu wesentlich höheren Detektionsraten von A $\beta$ 42. Doch bereits die Probengefäße bei der Liquorentnahme können die messbaren Konzentrationen beeinflussen (Lewczuk et al. 2006). Auch die verwendeten Nadelgrößen sind relevant; dies gilt sowohl bei der Liquor- als auch bei der Plasmaentnahme (O'Bryant et al. 2017).

Die Häufigkeit der Überführung der Probe in ein anderes Gefäß hat Einfluss auf die messbaren Konzentrationen: Willemse et al. (2017) zeigten, dass jedes Überführen einer Liquorprobe in ein anderes Reaktionsgefäß 5 % Verlust der Konzentration von A $\beta$ 42 zur Folge hatte. Bei kleineren Volumina war der Verlust noch höher. Je größer dabei die Kontaktfläche des Reaktionsgefäßes war, desto mehr Adsorption wurde beobachtet. Einen ähnlichen Effekt konnten sie für A $\beta$ 40 zeigen, was zu einer konstanten A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio führte (Willemse et al. 2017). Mehrere Publikationen konnten dieselbe Beobachtung zeigen (Wiltfang et al. 2007; Gervaise-Henry et al. 2017; Schauer et al. 2018).

Eine ähnliche Beobachtung publizierten Toombs et al. (2018). Sie konnten zeigen, dass der erste Transfer des Liquors für bis zu 39 % des Verlusts an A $\beta$ 42 verantwortlich ist, dieser jedoch nicht durch die Aspiration mittels Pipetten zustande kam. Dabei waren die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio und die A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio leicht reduziert. Je größer dabei das Volumen einer Liquorprobe war, desto mehr Peptide, vor allem A $\beta$ 42, konnten nachgewiesen werden (Schauer et al. 2018; Toombs et al. 2018).

Im Gegensatz dazu konnte für die Marke des Reaktionsgefäßes, das Vortexen oder eine kontinuierliche Bewegung des Reaktionsgefäßes bisher kein Einfluss auf die Adsorption festgestellt werden (Willemse et al. 2017).

Für die Messung von Amyloid- $\beta$ -Peptiden im Plasma konnten Vanderstichele et al. (2000) zeigen, dass nur EDTA in den Abnehmeröhrchen zu messbaren Konzentrationen an Amyloid- $\beta$ -Peptiden im Plasma führte. Eine aktuelle Publikation unterstützt diese Beobachtung und zeigt, dass EDTA im Gegensatz zu anderen Antikoagulationen nicht zu einer Reduktion der Biomarker führt (Rózga et al. 2019).

Die Studienlage zu Effekten des Einfrierens von Liquor- und Plasmaproben vor der Analyse ist unklar. Es finden sich sowohl Hinweise für eine Reduktion der Peptidkonzentrationen durch das Einfrieren als auch Hinweise, die gegen eine Reduktion sprechen. Für das präanalytische Handling von Liquorproben gibt es mehr Literaturbelege als für den präanalytischen Umgang mit Plasmaproben.

Konsens ist derzeit, dass sowohl Liquor- als auch Plasmaproben nach Gewinnung zügig aufbereitet und eingefroren werden sollten, um die Detektionsraten hoch und einen eventuellen Verlust zu minimieren (O'Bryant et al. 2015; Schauer et al. 2018; Lewczuk et al. 2018). Als Konsens für die längerfristige Lagerung sowohl von Liquor- als auch Plasmaproben ist eine Temperatur von -80 °C etabliert (O'Bryant et al. 2015; Schauer et al. 2018). Für Temperaturen über dem Gefrierpunkt konnte sogar eine Reduktion der A $\beta$ 42 Konzentration um bis zu 20 % innerhalb von zwei Tagen nachgewiesen werden (Schoonenboom et al. 2005).

Keinen wesentlichen Einfluss durch die Anzahl der Einfriervorgänge oder Bedingungen auf die

Konzentration von A $\beta$ 42 im Liquor stellten mehrere Publikationen fest. Sjögren et al. (2001) konnten für A $\beta$ 42 im Liquor in acht einmalig eingefrorenen Proben von nicht neurologisch oder psychiatrisch erkrankten Patienten durch Messungen mittels ELISA keinen signifikanten Unterschied feststellen. Die Stabilität der Peptide wurde in einer anderen Publikation für bis zu fünf Zyklen von Einfrieren und Auftauen gezeigt (Lachno et al. 2015). Bei Variationen der Einfrierbedingungen von Liquorproben konnten Bjerke et al. (2010) ebenso keinen signifikanten Unterschied des A $\beta$ 42 mittels ELISA zeigen.

Dem widerspricht eine Publikation von Gervaise-Henry et al. (2017), die einen signifikanten Unterschied für A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 zwischen drei Einfrier- und Auftauvorgängen zeigen konnte. Vanderstichele et al. (2000) beobachteten die größten Unterschiede zwischen einmaligem und zweimaligem Einfrieren der Liquorproben. Sie fassen folgend zusammen, dass die Anzahl der Einfriervorgänge so gering wie möglich gehalten werden sollte. 2016 konnten sie feststellen, dass kein signifikanter Unterschied mehr zwischen einmaligem und zweimaligem Einfrieren vorlag, sofern LoBind-Reaktionsgefäße verwendet wurden (Vanderstichele et al. 2016). Auch Lewczuk et al. (2018) empfehlen Liquorproben maximal zwei Zyklen von Einfrieren und Auftauen zu unterziehen.

Bibl et al. (2004) zeigten, dass Einfrieren des Liquors die Konzentration der Amyloid- $\beta$ -Peptide, insbesondere A $\beta$ 42, drastisch reduziert. Dieser Effekt konnte allerdings durch SDS-Hitzedenaturierung vollständig unterbunden werden. Dennoch führte eine Lagerungszeit von sechs Monaten trotz SDS-Hitzedenaturierung ebenso zu einem Verlust von A $\beta$ 42. In der Folge war die Differenzierung zwischen der erkrankten und gesunden Gruppe erschwert (Bibl et al. 2004).

Die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio hat sich in einigen Studien stabiler gegenüber Einflüssen durch das Einfrieren gezeigt als A $\beta$ 42 (Vanderstichele et al. 2016; Schauer et al. 2018). Eine Publikation zeigte jedoch, dass die Varianzen, die sich unter mehrfachem Einfrieren und Auftauen ergaben, nicht durch die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio korrigiert werden konnten (Gervaise-Henry et al. 2017).

Diese Beobachtungen von Liquorproben lassen sich nicht direkt auf Plasmaproben übertragen. Sie weisen in der Summe jedoch darauf hin, dass A $\beta$ 42 das anfälligste Peptid für Veränderungen ist, gefolgt von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 38. Zudem konnten die Effekte des Einfrierens durch Verwendung von LoBind-Reaktionsgefäße, Hitzedenaturierung oder Reduktion der Einfriervorgänge minimiert werden (Schauer et al. 2018).

Die Konzentrationen in Plasmaproben sinken bereits eine Stunde nach Abnahme und vor oder nach Zentrifugation (Rózga et al. 2019). Dabei blieb die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio für die ersten sechs Stunden stabil.

Beobachtung an Plasmaproben von Vanderstichele und Kollegen zeigen, dass einmaliges Einfrieren nahezu keinen Effekt auf die Konzentrationen hatte (Vanderstichele et al. 2000).

Lewczuk et al. (2004a) beobachteten, dass die kürzesten und die längsten Amyloid- $\beta$ -Peptide, in diesem Fall A $\beta$ 1-37 und A $\beta$ 1-42, am stärksten von einem Einfrieren vor der IP betroffen sind.

Auf die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio stellten sie jedoch ebenfalls keinen Einfluss durch das Einfrieren



des Plasmas vor der IP fest. Die Gesamtkonzentration stieg jedoch durch das Einfrieren signifikant an.

Die Lagerungstemperatur der Plasmaproben ist ähnlich entscheidend wie bei Liquorproben. Bibl et al. (2012) zeigten mit Untersuchungen durch eine SDS-Page, dass ein Lagern der Proben bei RT über 24 Stunden einen deutlichen Verlust der Peptide zur Folge hatte. Die Auswirkungen auf die Ratios fielen geringer aus. Diese Beobachtung machten Rózga et al. (2019) bei der Analyse frischer Plasmaproben ebenfalls: Nach 24 Stunden Lagerung bei RT oder 4 °C konnte ein deutlicher Abfall der Konzentrationen, vor allem für A $\beta$ 42 gezeigt werden (40 %). In der ersten Stunde nach dem Auftauen gab es keinen Konzentrationsunterschied, wenn die Proben bei RT oder 4 °C gelagert wurden.

Keshavan et al. (2018) zeigen in einer aktuellen Publikation, dass sie mit viermaligem Einfrieren und Auftauen von 200  $\mu$ l Aliquots frischen Plasmas keine Veränderung für A $\beta$ 42, aber für A $\beta$ 40 nach dem dritten und vierten Vorgang beobachten konnten.

Es konnte gezeigt werden, dass die Variationskoeffizienten zwischen Messungen der Amyloid- $\beta$ -Peptide im Liquor verschiedener Labore zwischen 20 % und 30 % betragen (Lewczuk und Wiltfang 2008; Mattsson et al. 2013). Mattsson et al. (2013) beobachteten longitudinale Variationskoeffizienten innerhalb eines Labores und eines Biomarkers zwischen 5 - 19 %. Sie vermuten daher, dass die longitudinale Variation vom Assay abhängig ist. Die geringsten Variationskoeffizienten wurden innerhalb eines einzigen Assays (5 - 10 %) beobachtet. Daraus leiten sie ab, dass jedes Labor individuelle *Cut-off*-Werte festlegen muss. Die Einordnung der Proben zwischen den Laboren stimmte jedoch trotz der unterschiedlichen Variationskoeffizienten zu > 90 % überein.

2018 konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung des MSD 96-Well MULTI-SPOT human A $\beta$ 42 V-PLEX Kit (Meso Scale Discovery) die Variationskoeffizienten zwischen Laboren auf 15,5 % reduziert werden konnten (Lewczuk et al. 2018).

In einer aktuelleren Publikation konnten, abhängig vom verwendeten Assay, die Unterschiede bezüglich der Konzentration von A $\beta$ 40 im Liquor innerhalb eines Labores auf < 10 % reduziert werden (van Waalwijk van Doorn et al. 2017).

Zusammenfassend ist die Messung und Analyse von A $\beta$ -Peptiden schwierig und erfordert präzise und robuste Assays. Die Assays sollten unbedingt gründlich validiert werden und Faktoren, die die Messung beeinflussen kontrolliert und minimiert werden. Vorschläge für die Reduktion der Varianzen von präanalytischer Plasmaprobenbehandlung machten O'Bryant et al. (2015) und Schauer et al. (2018).

Doch selbst wenn diese Varianzen zukünftig weiter reduziert werden können, ist unklar wie die Daten interpretiert werden sollen; vor allem da bisher keine allgemein gültigen *Cut-off*-Werte definiert werden konnten.

Dies liegt unter anderem daran, dass die Messwerte der unterschiedlichen Assayverfahren stark voneinander abweichen und Referenzmaterial fehlt (van Waalwijk van Doorn et al. 2017). In der Literatur finden sich Vorschläge für laborübergreifende vereinheitlichte Algorithmen zur Interpretation der Messwerte (Lewczuk et al. 2009; McKhann et al. 2011; Lewczuk et al. 2015).

Eine mögliche klinische Anwendung sehen Lewczuk et al. (2015) in dem Erlangen-Score, der stark mit Auftreten der Alzheimer-Demenz korreliert ist. Er teilt die Probanden nach Auffälligkeiten der Biomarker-Daten ein und kann auch bei unterschiedlichen *Cut-off*-Werten verschiedener Labore angewandt werden.

#### 4.1.2 Zusammenhang zwischen den Amyloid- $\beta$ -Peptiden in humanem Liquor und Plasma

Es gibt einige wesentliche Unterschiede bezüglich der Peptide zwischen Liquor und Plasma. Dazu gehören die Konzentrationen, die Halbwertszeit, die Zusammensetzung der Peptidfraktionen sowie andere Proteininteraktionen.

A $\beta$ 42 und A $\beta$ 40 können die Blut-Hirn-Schranke durch verschiedene Transportmechanismen in beide Richtungen überqueren (Deane et al. 2009; Spies et al. 2012; Roberts et al. 2014; Ovod et al. 2017). Es wird geschätzt, dass zwischen 30 % bis 50 % der Peptide im Blut aus dem Gehirn kommen (Roberts et al. 2014). Im Blut werden Amyloid- $\beta$ -Peptide zum größten Teil an Albumin und Lipoproteine gebunden transportiert (Biere et al. 1996).

Es konnte gezeigt werden, dass die Amyloid- $\beta$ -Peptide stark mit diesen Proteinen im Blut interagieren: Bjerke et al. (2010) haben Liquorproben mit Plasma verdünnt, um unterschiedliche Konzentrationen an Albumin im Liquor zu erreichen. Anschließend konnte durch Analysen mittels ELISA nur noch die Hälfte der Konzentration von A $\beta$ 42 wiedergefunden werden.

Die Höhe der Peptidkonzentration im humanen Plasma wird in der Literatur unterschiedlich angegeben. Es finden sich Angaben, dass sie im Plasma sechsfach (Bates et al. 2009), zehnfach (Vanderstichele et al. 2000) oder hundertfach (Lewczuk et al. 2004a) geringer als im Liquor sein kann.

Ebenso scheinen unterschiedliche Halbwertszeiten vorzuliegen: Ovod et al. (2017) publizierten eine Halbwertszeit von drei Stunden im Plasma gegenüber einer Halbwertszeit von neun Stunden im Liquor. A $\beta$ 38 wies die geringste Halbwertszeit auf.

Des Weiteren konnte von mehreren Publikationen gezeigt werden, dass die Zusammensetzung im Plasma eine andere als im Liquor ist. A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 stellen im Plasma einen gemeinsamen Anteil von weniger als 60 % dar (Maler et al. 2007). Den Rest stellen andere Formen der Amyloid-Peptide (Ida et al. 1996; Maler et al. 2007). Es konnte jedoch keine plasmaspezifische Zusammensetzung der Peptide festgestellt werden (Lewczuk et al. 2004a; Lewczuk und Wiltfang 2008).

A $\beta$ 40 kann sowohl im Liquor als auch im Plasma 1,5- bis zehnfach höher als A $\beta$ 42 ausfallen (Deane et al. 2009). Aufgrund der unterschiedlichen Peptidvarianten in Plasma und Liquor wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Peptide nicht nur aus dem Gehirn stammen könnten (Ida et al. 1996; Mehta et al. 2001; Bates et al. 2009; Henriksen et al. 2014). Daher werden mögliche Quellen diskutiert.

Ob die Peptidkonzentrationen im Blut abhängig von Alter, Geschlecht und dem Vorliegen des ApoE  $\epsilon$ 4 Allels sind, ist noch unklar. Zwei neuere Studien konnten jedoch eine signifikan-

te Reduktion der der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Plasma bei höherem Alter, Vorliegen des ApoE  $\epsilon$ 4 Allels und männlichem Geschlecht feststellen (Nakamura et al. 2018b; Schindler et al. 2019). Eine weitere Publikation stellt eine negative Korrelation zwischen Alter und A $\beta$ 42 im Plasma, nicht jedoch A $\beta$ 40 und der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio fest (Lue et al. 2019). In zwei älteren Publikationen wurden dagegen keine Korrelationen für A $\beta$ 42 zu diesen Parametern festgestellt (Vanderstichele et al. 2000; Lewczuk et al. 2004a).

Dadurch, dass Proteine wie Albumin im Blutkreislauf natürlichen Schwankungen unterliegen, kann es zu Schwierigkeiten bei der Interpretation kommen; ebenso müssen die möglicherweise zahlreichen Komorbiditäten bei Patienten mit Alzheimer berücksichtigt werden (Janelidze et al. 2016a). Blutfette und Medikamente können die Konzentrationen der Amyloid- $\beta$ -Peptide im Blut beeinflussen (Henriksen et al. 2014). Nakamura und Kollegen stellten in einer Untersuchung an der IHPP-Kohorte fest, dass Cystatin C im Plasma die A $\beta$ 42 Konzentration beeinflusst (Nakamura et al. 2018b).

Für A $\beta$ 42 im Liquor wurde vielfach in der Literatur belegt, dass die Reduktion ein aussagekräftiger Parameter für die Alzheimerdemenz und MCI ist sowie in gewissem Umfang eine Vorhersage ermöglichen kann (Mehta et al. 2000; Andreasen et al. 2001; van Oijen et al. 2006; Olsson et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass Amyloid-PET-Daten in gewissem Umfang vor allem in früheren Stadien eine präzisere Vorhersage zum Verlauf erlauben als Liquordaten (Bouallègue et al. 2017).

Nur eine Publikation konnte eine Erhöhung von A $\beta$ 42 bei vorliegender Alzheimerdemenz feststellen; in diesen Fällen wurde auch ein frühzeitigeres Versterben festgestellt (Mayeux et al. 1999). Lewczuk et al. (2004b) und Olsson et al. (2016) zeigten, dass sich übereinstimmend kein Konzentrationsunterschied von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 38 im Liquor zwischen Erkrankten und Kontrollgruppen feststellen ließ.

Die Studienlage zur Eignung der Plasmakonzentrationen als Biomarker für die Alzheimer Krankheit ist derzeit noch widersprüchlich. Aktuellere Publikationen stützen jedoch die Eignung der Peptide und insbesondere die der Ratios, in Verbindung mit bildgebenden Verfahren, als Biomarker.

Die Reduktion von A $\beta$ 42 kann im Plasma bei vorliegender Alzheimerdemenz ebenfalls belegt werden (Lewczuk et al. 2004b; van Oijen et al. 2006; Hilal et al. 2018). Es wurde eine Abnahme zwischen 10 - 15 % für A $\beta$ 42 und die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Plasma bei gleichzeitig höherer Reduktion im Liquor (30 - 50 %) gezeigt (Lewczuk et al. 2010).

Einige Publikationen zeigten, dass A $\beta$ 40 im Plasma bei Alzheimerdemenz erhöht war (Mehta et al. 2000; van Oijen et al. 2006). Es gibt auch gegenteiligen Beobachtungen, dass A $\beta$ 40 keinen wesentlichen Unterschied aufwies (Lewczuk et al. 2004b; Olsson et al. 2016).

A $\beta$ 38 im Plasma ist als zusätzlicher Marker zur Diagnostik interessant (Wiltfang et al. 2002), allerdings bisher weniger erforscht als A $\beta$ 42 und A $\beta$ 40. Hilal et al. (2018) zeigten, dass eine reduzierte A $\beta$ 38 Konzentration im Plasma im Verlauf mit einem erhöhten Risiko für Alzheimerdemenz einherging.

Des Weiteren sind die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40- und die A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio im Plasma von Interesse. Für beide konnte bisher gezeigt werden, dass sie gut geeignet sind, um Alzheimerdemenz von an-

deren Demenzformen abzugrenzen und besser zur Detektion geeignet sind als die jeweiligen Peptide (Janelidze et al. 2016b; Ovod et al. 2017; Nakamura et al. 2018a).

Auch für die Liquor A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio wurde bereits früher festgestellt, dass sie ebenfalls besser zwischen Alzheimerdemenz, nicht-Alzheimerdemenz und gesunden Kontrollen unterscheiden kann als A $\beta$ 42 alleine (Lewczuk et al. 2004b).

Ein wichtiger Grund für die voneinander abweichenden Ergebnisse ist, dass unterschiedliche Messverfahren (Assays) verwendet wurden und die Messung von A $\beta$  im Blut technisch sehr schwierig ist, weil die Konzentrationen sehr niedrig sind und andere Proteine mit A $\beta$ -Peptiden interagieren können und so die Messung stören können.

#### 4.1.2.1 Korrelation der Peptide zwischen Plasma und Liquor

Drei wesentliche Punkte zum Zusammenhang zwischen Plasma- und Liquorkonzentrationen sind bisher ungeklärt. Zentral muss die Frage beantwortet werden, ob die Konzentrationen der Peptide sowie die Ratios im Plasma mit denen im Liquor korrelieren. Weiterhin ist unklar, ob die Peptide im Plasma gegenüber der Alzheimerdemenz ebenso aussagekräftig wie im Liquor sind; und sich daraus ergebend, ob die Peptidkonzentrationen im Plasma zur Diagnose und eventuell Prognose geeignet sind.

Für A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 wird in der Literatur vielfach eine geringe bis gar keine Korrelation zwischen Liquorkonzentrationen und Plasmakonzentrationen angegeben (Mehta et al. 2001; Olsson et al. 2016; Shahpasand-Kroner et al. 2018; Schindler et al. 2019). In den starken Proteininteraktionen im Plasma sehen Bjerke et al. (2010) eine mögliche Ursache für eine geringe Korrelation zwischen Plasma- und Liquorkonzentrationen.

Eine schwach positive signifikante Korrelation für A $\beta$ 42 und A $\beta$ 40 zwischen Liquor und Plasma konnte bereits gezeigt werden (Janelidze et al. 2016a). Teunissen et al. (2018) zeigten für A $\beta$ 42 eine negative Korrelation: Bei einem reduzierten A $\beta$ 42 im Liquor stieg A $\beta$ 42 im Plasma an.

#### 4.1.2.2 Korrelation der Ratios zwischen Plasma und Liquor

Ovod et al. (2017) haben festgestellt, dass die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Liquor in Anwesenheit von Amyloidpathologie im Vergleich zu Proben ohne Pathologie um die Hälfte reduziert war. Der Unterschied der Plasmakonzentrationen fiel jedoch wesentlich geringer aus (14,3 %). Interessanterweise wurden nahezu identische Ergebnisse von Shahpasand-Kroner et al. (2018) während der ersten Untersuchung zu dem zweischriftigen Immunoassay für die erkrankte Gruppe beobachtet (Reduktion der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Liquor um 58 %; im Plasma um 14 %).

Ovod et al. (2017) konnten zusätzlich eine starke Korrelation zwischen der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Liquor und der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Plasma feststellen (Ovod et al. 2017).

### 4.1.2.3 Korrelation von Liquor- und Plasmakonzentrationen zu bildgebenden Verfahren

Für A $\beta$ 42 im Liquor konnte bereits gezeigt werden, dass es negativ mit den Befunden aus „*in vivo amyloid imaging*“ korreliert (Fagan et al. 2006; Grimmer et al. 2009; Janelidze et al. 2016a; Nakamura et al. 2018a). Schindler et al. (2019) wiesen für die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Liquor ebenfalls eine signifikant negative Korrelation zu Amyloid-PET-Daten nach. Sie konnten zeigen, dass eine erniedrigte A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Plasma ein guter Prädiktor für das Risiko ist, im zeitlichen Verlauf ebenfalls einen alzheimerartigen Amyloid-PET-Befund zu bekommen und legten dabei einen *Cut-off*-Wert von 0,1218 für die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Plasma fest. Diese Beobachtung wurde auch von Janelidze et al. (2016b) und Doecke et al. (2020) publiziert.

Ob die Biomarker im Plasma zur Voraussage über die Konversion von MCI zur Alzheimerdemenz geeignet sind, ist unklar. Eine Metaanalyse konnte keinen Unterschied von A $\beta$ 42 im Plasma zwischen MCI und Kontrollen feststellen (Olsson et al. 2016). Graff-Radford et al. (2007) heben im Gegensatz dazu hervor, dass die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Plasma möglicherweise geeignet ist, um eine Vorhersage über den weiteren Verlauf zu machen (Graff-Radford et al. 2007). Diverse Studien konnten zeigen, dass veränderte Biomarker im Plasma, insbesondere die Ratios, hinweisend für ein erhöhtes Risiko sind, eine Alzheimerdemenz zu entwickeln (Mehta et al. 2000; van Oijen et al. 2006; Graff-Radford et al. 2007).

Es gibt jedoch die Grauzone, in der die Biomarker im Liquor bereits positiv sind, aber noch keine klinischen Symptome aufgetreten sind und zusätzlich die Bildgebung noch negativ ist (de Wilde et al. 2019). Diese Befundkonstellation weist jedoch ebenso auf ein erhöhtes Risiko hin, im Verlauf eine Demenz zu entwickeln.

Da es noch keine zuverlässigen *Cut-off*-Werte gibt, bleibt die Einordnung in den Frühstadien der Alzheimerkrankheit schwierig und unpräzise. Die Diskordanz kann in einigen Fällen durch die verwendete Grenze für die cutpoints der Biomarker begründet sein (Jack et al. 2018). Dadurch werden die Ergebnisse und eine mögliche Voraussage eventuell beeinträchtigt. Für A $\beta$ 42 konnte zusätzlich ein Anstieg der Konzentrationen über die Jahre gezeigt werden, der wahrscheinlich abhängig von den verwendeten ELISA-Kits waren (Tijms et al. 2018), was eine Anpassung der *cutpoints* erfordern könnte.

## 4.2 Analyse der partiellen Assay-Validierung

In der vorliegenden Arbeit wurden gezielte Validierungsexperimente für den zweischrittigen Immunoassay (Shahpasand-Kroner et al. 2018) durchgeführt. Im Sinne einer „*Fit-for-purpose*“-Validierung sollte die technische Eignung des Zwei-Schritt-Immunoassays für die Bestimmung der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Quotienten in humanen EDTA-Blutplasmaproben untersucht werden.

Um die Durchführbarkeit des Assays unter normalen Laborbedingungen zu optimieren, sollte weiterhin geprüft werden, ob die beiden Schritte des Nachweisverfahrens (Immunpräzipitati-

on und A $\beta$ -Messungen mit einem Sandwich-Immunoassay) durch zwischenzeitliches Einfrieren der durch Immunpräzipitation angereicherten A $\beta$ -Peptide zeitlich voneinander getrennt werden können. Das würde die Durchführbarkeit des Gesamtverfahrens erleichtern und u.U. die Möglichkeit einer Automatisierung der einzelnen Schritte verbessern.

Ein Leitfaden, um einen Immunoassay einheitlich zu validieren, wurde von Andreasson et al. (2015) publiziert. Sie stellen darin ein standardisiertes Arbeitsprotokoll (SOP) für zehn verschiedene Validierungsparameter vor, die für eine vollständige Assay-Validierung überprüft werden sollten. Sie schränken ein, dass unter gewissen Umständen auch weniger Parameter kontrolliert werden können.

Die Validierung eines Assays soll zeigen, dass der Assay für den beabsichtigten Verwendungszweck geeignet ist (Lee et al. 2006).

Ein „*Fit-for-purpose*“-Assay ist ein partiell validierter Assay, der insbesondere die Eignung des Biomarkers für eine spezifische Anwendung überprüft (Lee et al. 2006). Optimalerweise sollten über die gesamte Dauer der Assay-Validierung die Standards aus einer Charge kommen (Lee et al. 2006). Das wurde in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt. Zwei zentrale Begriffe der Validierung sind Präzision und Richtigkeit („*Trueness*“), die als „*Accuracy*“ zusammengefasst werden. Richtigkeit beschreibt wie nah Messwerte an einem akzeptierten Referenzstandard sind (systematischer Fehler), wohingegen die Präzision beschreibt wie nah die Messergebnisse zueinander sind (zufälliger Fehler, Streuung) nach The International Organization for Standardization (1994).

Lee et al. (2006) definieren Arten von Assays, so zum Beispiel den relativ quantitativen Assay, bei dem die Referenzstandards noch nicht vollständig repräsentativ für den Biomarker sind, aber eine Calibratorfunktionskurve verwendet wird. In diesem Fall könne die Präzision bestimmt werden, aber die Richtigkeit könne nur geschätzt werden, da die Referenzstandards nicht ausreichend bekannt sind (Lee et al. 2006). Dies trifft auch auf den in dieser Arbeit validierten semiquantitativen zweiseitigen Immunoassay zu. Der Assay ist semiquantitativ, da keine absoluten, sondern relative Konzentrationen der Peptide gemessen werden.

Mit dem Assay soll langfristig eine Unterscheidung zwischen erkrankten und gesunden Probanden in einem klinischen Setting ermöglicht werden.

### 4.2.1 Präanalytisches Einfrieren

Es sollte überprüft werden, ob die IP-Eluat direkt im MSD-Triplex-Assay gemessen werden müssen oder ob es möglich ist, die IP-Eluat nach Verdünnen mit Diluent 35 einzufrieren und somit die Anreicherung durch IP und die Analyse mit dem MSD-Triplex zeitlich zu trennen. Dazu wurden Häufigkeit und Dauer der Einfriervorgänge nach der IP kontrolliert. Da eine zeitliche und damit ggf. auch örtliche Trennung von A $\beta$ -Anreicherung durch die IP sowie der Analyse erfolgen kann, sowie die Durchführung des relativ arbeitsaufwendigen Zweiseitigen Verfahrens in der Laborroutine erheblich erleichtert wird, war diese Untersuchung entscheidend.

In dieser Arbeit wurden die Plasmaproben einmalig aufgetaut, der IP unterzogen und in 120  $\mu$ l Aliquots 4,8-fach in Diluent 35 verdünnt bis zur Analyse bei  $-80$  °C gelagert. Die in dieser Arbeit verwendeten standardisierten Bedingungen für die Einfrier- und Auftauvorgänge der IP-Eluate unterschieden sich von denen der angeführten Publikationen bezüglich Plasmaproben in Abschnitt 4.1.1.2.

Aufgrund der bisher publizierten Ergebnisse zu Untersuchungen von eingefrorenen Plasmaproben (Vanderstichele et al. 2000; Lewczuk et al. 2004a; Keshavan et al. 2018) kann davon ausgegangen werden, dass das Einfrieren wahrscheinlich zu gewissen Änderungen der Peptidkonzentrationen und Ratios führt. In dieser Arbeit sollte durch die statistischen Analysen insbesondere gezeigt werden, dass diese Änderungen für die IP-Eluate klein sind und im Mittel unter der akzeptierten Grenzen von 80 - 120 % liegen.

Der mittlere Variationskoeffizient der Peptide lag zwischen allen drei Aufarbeitungen  $< 15$  % in vier von fünf Plasmaproben; für die  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio und  $A\beta_{42}/A\beta_{38}$ -Ratio betrug er sogar  $< 10$  %. Für die Peptide konnte durch das Einfrieren kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Es wurde der Einfluss auf die  $A\beta_{42}/40$  Ratio und  $A\beta_{42}/A\beta_{38}$ -Ratio untersucht: bei einmaligem Einfrieren war die relative Änderung signifikant kleiner als 20 % ( $p = 0,03$ ). Nach Bonferroni-Korrektur war das Ergebnis nicht signifikant ( $p = 0,06$ ). Da die Stichprobe klein ist, deutet dies nicht auf einen starken Einfluss durch das Einfrieren hin. Daher konnte das Lagern der IP-Eluate bei  $-80$  °C als Zwischenschritt in das standardisierte Arbeitsprotokoll (SOP) aufgenommen werden.

Vergleichbare Arbeiten in der Literatur, die nach der IP von  $A\beta$ -Peptiden im Plasma die Eluate einfrieren, liegen nach derzeitigem Kenntnisstand nicht vor. Die Anreicherung der Peptide im Plasma durch IP (und anschließende Analyse durch Massenspektrometrie) findet sich hingegen in der Literatur (Ovod et al. 2017; Nakamura et al. 2018a).

Das einmalige Einfrieren der IP-Eluate hatte in dieser Arbeit einen größeren Effekt als weiteres Einfrieren (siehe Abb. 3, 4). Die Ratios jedoch waren stabiler gegenüber den Einfriervorgängen als die jeweiligen Peptide. Damit konnte die Beobachtung aus anderen Publikationen, dass die Ratios in Liquor- und Plasmaproben gegenüber dem Einfrieren vergleichsweise stabil sind, bestätigt werden (Lewczuk et al. 2004a; Bibl et al. 2012; Vanderstichele et al. 2016).

#### 4.2.2 Speziell ausgewählte Kohorte

Mittels der speziell ausgewählten Kohorte wurde überprüft, ob der zweischrittige Immunoassay inklusive Einfrieren der IP-Eluate als neuen Zwischenschritt, den Biomarker „verringerte  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio bei Alzheimerdemenz“ erneut nachweisen kann. Ausgewählt wurden Proben die bereits mit dem Zwei-Schrittassay jedoch ohne Einfrieren als Zwischenschritt, gemessen worden waren (Shahpasand-Kroner et al. 2018). Dabei wurden im Rahmen dieser Arbeit zehn Proben mit einer besonders hohen und zehn Proben mit einer besonders niedrigen  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Ratio ausgewählt.

Ausgewertet wurden die nicht-normalisierten Daten, da alle Proben auf einer Platte gemessen wurden. Die Normalverteilung der Peptide und der Ratios wurde mittels QQ-Plots überprüft und für die speziell ausgewählte Kohorte angenommen.

Es konnte gezeigt werden, dass der Assay geeignet ist, um zwischen biomarkerpositiven und -negativen Proben zu differenzieren. Stark signifikante Unterschiede zwischen biomarkerpositiver und biomarkernegativer Gruppe konnten für A $\beta$ 42, die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio und die A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio gezeigt werden. Die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio war zwischen den Gruppen um 19 % reduziert, die A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio um 16 %. Keine statistische Signifikanz erreichten A $\beta$ 40 und A $\beta$ 38.

Die ROC Kurve zeigte mit einer AUC von 0,99 für die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio eindeutig, dass der Assay, inklusive des Einfrier-Zwischenschritts, mittels der Ratio gut geeignet ist, um zwischen der biomarkerpositiven Gruppe und biomarkernegativen Gruppe zu unterscheiden (siehe Abb. 7).

Der Bland-Altman-Plot weist auf systematische Effekte auf die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio durch das Einfrierintervall von eineinhalb Jahren zwischen der erstmaligen Messung (frische IP) und der jetzigen Messung in der speziell ausgewählten Kohorte hin (siehe Abb. 8).

### 4.2.3 IP aus unterschiedlichen Volumina

Um herauszufinden, ob sich die im EDTA-Blutplasma vorhandenen und zu messenden A $\beta$ -Peptide ähnlich wie die mittels chemischer Synthese hergestellten Kalibratorpeptide des MSD-Assay-Kits ähnlich verhalten bzw. in ähnlicher Weise mit anderen Blutbestandteilen interagieren, bzw. mit vergleichbarer Ausbeute immunpräzipitiert werden (Bindungseigenschaften), wurde der „*Parallelism*“ untersucht. Für die Untersuchungen machen Andreasson et al. (2015) Vorgaben: Es müssen Proben mit natürlich hohen Konzentrationen, die sich unter dem ULOQ befinden sollen, verwendet werden. Ein *Spiking* der Proben ist nicht erlaubt.

Die Akzeptanz-Kriterien bezüglich der Abweichung des mittleren Variationskoeffizienten sind noch nicht einheitlich definiert. Andreasson et al. (2015) stellten fest, dass manche Autoren sich für eine Grenze der %CV < 30 % aussprechen, sich aber auch Angaben für einen Bereich von 75 - 125 % im Vergleich zur Blanko-Probe finden. Die strengsten Grenzen werden in älteren Publikationen genannt und erlauben eine %CV < 20 % oder eine %CV < 15 % (Plikaytis et al. 1994).

Der Publikation von Andreasson et al. (2015) folgend, wurden drei Plasmaproben mit zwei unterschiedlichen Plasmavolumina untersucht und eine Akzeptanzgrenze von < 20 % angenommen. Die Plasmaproben wurden nach vorherigen Messungen und der Höhe ihrer Konzentrationen für die Peptide ausgewählt.

Erwartet wurde eine Abnahme der Konzentration um die Hälfte bei Einsatz des halben Plasmavolumens. Gemessen wurden noch 58,4 % von A $\beta$ 38, 51,1 % von A $\beta$ 40 und 60,5 % von A $\beta$ 42. Der mittlere Variationskoeffizient der Verdünnung betrug für die jeweiligen Amyloid- $\beta$ -Peptide < 10 % (A $\beta$ 38: 8,34 %, A $\beta$ 40: 8,60 % und A $\beta$ 42: 7,65 %). Damit ist der „*Parallelism*“



erfüllt. Es bleibt unklar, was die Ursache für die geringere Detektion des A $\beta$ 42 ist. Als Ursache können Bindungseffekte angenommen werden.

Insbesondere A $\beta$ 42 ist an andere Proteine oder Lipoproteine im Blut gebunden; damit wird es vor der IP durch 1E8 quasi abgeschirmt. Diverse Proteine, die A $\beta$ -Peptide binden, wurden in der Literatur beschrieben (Biere et al. 1996; Bates et al. 2009; Spies et al. 2012).

Man spricht auch von Matrixeffekten: Bestimmte Bestandteile der Matrix (hier: Blutplasma) interagieren mit dem Analyten und verhindern die korrekte Messung. Eine einfache Möglichkeit, Matrixeffekte zu reduzieren, ist Verdünnen wie in dieser Arbeit. Dies steht in Übereinstimmung mit bisherigen Publikationen für Untersuchungen im Liquor (Bjerke et al. 2010; Toombs et al. 2018; Schauer et al. 2018; Vogelgsang et al. 2018b).

#### 4.2.4 IP-Effizienz

Mit der Überprüfung der Effizienz der IP wurde kontrolliert wie gut der Antikörper 1E8 geeignet ist, die Amyloid- $\beta$ -Peptide zu binden. Nach zweifacher IP konnte für A $\beta$ 38 in zwei von drei Proben eine Reduktion unter die Nachweisgrenze beobachtet werden. A $\beta$ 40 wurde ebenfalls deutlich reduziert, im Mittel um 93 %. Am geringsten war die Reduktion für A $\beta$ 42 im Mittel um 78 %. Die IP unter den verwendeten Bedingungen erreicht demnach keine 100 % Ausbeute und ist für A $\beta$ 42 am wenigsten effektiv; dies spricht möglicherweise erneut für interferierende Blutbestandteile. Für A $\beta$ 38 ist keine gute Aussage möglich, da der MSD-Assay vermutlich zu unempfindlich ist.

Shahpasand-Kroner et al. (2018) konnten zeigen, dass die vorangestellte IP die Analyse der Amyloid- $\beta$ -Peptide erleichtert. Mit den Beobachtungen aus dieser Arbeit kombiniert zeigt sich, dass die IP sehr effizient die Peptide binden kann, jedoch der Antikörper 1E8 A $\beta$ 42 nicht so effektiv bindet wie A $\beta$ 38 und A $\beta$ 40. Die Effizienz für unterschiedliche A $\beta$ -Peptide ist nicht gleich gut, daher geben die Messungen der IP-Eluate nicht die exakten Verhältnisse im Blutplasma wieder. Möglicherweise ist auch die Effizienz in Blutproben von unterschiedlichen Probanden nicht immer gleich gut.

#### 4.2.5 Assay-Selektivität

Die Assay-Selektivität beschreibt die Eigenschaft des Assays nur das zu analysierende Produkt zu erkennen und nicht ähnliche strukturelle Substanzen (Lee et al. 2006). Hierbei spielen auch nicht näher definierbare Bindungseffekte wie zum Beispiel Bindungen an die Probengefäßwände eine Rolle. Die hier verwendeten Antikörper 1E8 und 6E10 sind spezifisch für den Aminoterminus der Amyloid- $\beta$ -Peptide (Wiltfang et al. 2001).

Der Antikörper 6E10 bindet dabei an die Aminosäurepositionen drei bis acht (Wang et al. 2017), ist aber reaktiv für die Positionen eins bis 16 (Baghallab et al. 2018). Position vier bis zehn wurden in der Publikation von Baghallab und Kollegen als Epitop nachgewiesen (Baghallab et al. 2018). Daher erkennt der Antikörper 6E10 auch am N-terminalen Ende verkürzte

Amyloid- $\beta$ -Peptide (Vanderstichele et al. 2005) und Teile vom APP (Grant et al. 2019). Der Antikörper 1E8 erkennt den N-Terminus, aber weniger verkürzte Varianten als 6E10, reagiert ebenso mit APP, sAPP $\alpha$  und verlängertem A $\beta$  (Lewczuk et al. 2004a; Maler et al. 2007; Haußmann et al. 2013; Shahpasand-Kroner et al. 2018).

Mittels der IP wurden die Peptide vorab konzentriert. Durch die Hinzunahme von Igepal CA-63, Natriumdesoxycholat und SDS während der IP sollten mögliche Interaktionen mit anderen Bestandteilen im Blutplasma reduziert werden (Shahpasand-Kroner et al. 2018). Die Elution wurde in Anwesenheit von Bicine-CHAPS durchgeführt, um spezifisch A $\beta$ -Peptide zu konzentrieren. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die A $\beta$ -Peptide selektiv von den 1E8-Magnetbead-Immunkomplexen eluiert werden können, indem in Bicine-CHAPS erhitzt wird (Haußmann et al. 2013).

Die geringste Reduktion durch die dreimalige IP mit den Antikörpern 1E8 und 6E10 ließ sich bezüglich A $\beta$ 42 feststellen. Mögliche Gründe dafür könnten Matrix-Effekte sein. Dadurch, dass A $\beta$ 42 stärker dazu neigt zu aggregieren und an die Reaktionsgefäßwände zu binden, ist die freie Konzentration möglicherweise geringer. Möglich wäre auch, dass die Antikörper weniger spezifisch für A $\beta$ 42 sind als für A $\beta$ 40 und A $\beta$ 38.

Ein weiteres Kontrollexperiment hierzu fand mit HT7-Antikörpern statt, die eine bestimmte Region des Tau-Proteins erkennen (Vanmechelen et al. 2000).

Nach Magnetbead-IP mit dem Antikörper gegen ein anderes Protein als A $\beta$ , wurden keine Signale für A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 im MSD-Assay gemessen. Daraus lässt sich schließen, dass das Signal im nachgeschalteten MSD-Triplex-Assay tatsächlich allein auf A $\beta$  zurückzuführen ist und es kein nennenswertes Hintergrundsignal gibt, das allein von den Beads oder aus unspezifisch an die verwendeten anti-Maus Ig Magnetbeads bindenden Molekülen entsteht. Nur wenn ein anti-A $\beta$  Antikörper an die Beads gekoppelt ist, wird ein Signal gemessen.

Durch vorgeschaltete Verringerung der A $\beta$ -Peptide mittels Magnetbead IP mit an M270-Epoxybeads gekoppelten 6E10 Antikörpern (Depletion) wurde die in den 1E8 IP-Eluaten nachweisbare Menge an A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 deutlich reduziert. Zusammengenommen sprechen diese Befunde dafür, dass der Zweischritt-Immunoassay hochselektiv für die genannten A $\beta$ -Peptide ist.

#### 4.2.6 Spike-Wiederfindung

Die *Spiking*-Experimente untersuchen, ob interferierende Substanzen in der Probe vorhanden sind, welche die Dosis-Signal-Beziehung beeinflussen, in dem sie zum Beispiel mit dem Analyten interagieren und die theoretisch hinzugegebenen Peptidkonzentrationen reduzieren.

Die Verwendung einer Kontrollprobe während dieser Untersuchungen, die an zu messendem Analyt nur den *Spike* enthält, erhöht die Präzision und kann eventuelle Verdünnungsfehler aufdecken (van Waalwijk van Doorn et al. 2017).

Bis auf einen Ausreißer (PL3, niedriges *Spike*-Level) lagen für A $\beta$ 38 gute *Spike*-Wiederfindungsraten vor (siehe Tab. 3.14). Für A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 fielen sie deutlich schlechter aus. A $\beta$ 42

wies im Mittel insgesamt die schlechtesten Wiederfindungsraten auf ( $32,71 \% \pm 4,20$ ) und lag stark außerhalb des akzeptierten Bereichs von 85 - 115 % (Klafki et al. 2016).

Das schlechte Ergebnis für A $\beta$ 42 stimmt mit den Ergebnissen der Untersuchung zur IP-Effizienz und IP aus verschiedenen Volumina dieser Arbeit überein, die für A $\beta$ 42 ebenfalls korrespondierend die geringsten Ergebnisse zeigten.

Die geringen Raten für A $\beta$ 42 sind bei den *Spike*-Experimenten wahrscheinlich auch durch einen technischen Fehler beim Verdünnen der Kalibrator-Lösungen zu erklären. Insbesondere die sehr geringe *Spike*-Wiederfindung in der Kontrollprobe stützt diese Hypothese.

Da auf Platte vier vermutlich ein systematischer Unterschied hinsichtlich der Messung von A $\beta$ 42 im Verhältnis zu A $\beta$ 38 und A $\beta$ 40 vorlag, wurden die *Spike*-Wiederfindungen analog zur unabhängigen klinischen Kohorte normalisiert: angewendet wurden zwei unterschiedliche Korrekturfaktoren (siehe Tab. 3.16, 3.17). Mit Normalisierung zeigten sich deutliche Verbesserungen der *Spike*-Wiederfindung für A $\beta$ 42. Da die Verbesserung durch die aus den *Long-freeze*-Proben berechneten Faktoren deutlich besser war, lässt sich darauf zurückführen, dass sie die Varianzen der IP nicht abbildeten. In Zukunft sollte das *Spike*-Wiederfindungs Experiment mit weiteren Kontrollen wiederholt werden

Dennoch ist die „*Trueness*“ des Assays auch mit Normalisierung für A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 nicht optimal, da die gemessenen Konzentrationen deutlich von den theoretisch angenommenen Konzentrationen abweichen. Dass die Wiederfindung des Kontroll-*Spikes* (hohe *Spike*-Konzentration) stets höher war als in den Plasmaproben, weist darauf hin, dass ein Teil der hinzugegebenen synthetischen Peptide im Plasma vor der Messung „verschwindet“. Für die geplante Anwendung des Assays können diese Ergebnisse dennoch akzeptiert werden.

Der Grund für die schlechten *Spike*-Wiederfindungsraten sind folglich vermutlich Matrixeffekte, die sich besonders stark auf A $\beta$ 42 auswirken. Matrixeffekte werden definiert als kombinierter Effekt aller Bestandteile der Probe, die nicht der Analyt sind (Guilbault und Hjelm 1989). Nach wie vor können sie für die A $\beta$ -Peptide weder im Liquor noch im Blut exakt quantifiziert oder die Stärke ihrer Auswirkungen bestimmt werden.

Slemmon et al. (2012) konnten jedoch zeigen, dass mehr als die Hälfte der Konzentration von A $\beta$ 42 im Liquor aufgrund von Matrixeffekten nicht in üblichen Immunoassays gemessen werden kann. Als wesentliche Ursachen für Matrixeffekte führen sie Oligomere der A $\beta$ -Peptide und andere A $\beta$  bindende Proteine im Liquor an, für die bereits gezeigt werden konnte, dass sie bei der Alzheimerkrankheit in höherer Konzentration vorliegen. Peptidwechselwirkungen im Blut wurden ebenfalls gezeigt (Bjerke et al. 2010).

Die APOE Isoformen werden ebenso als Ursache in Betracht gezogen, da sie womöglich A $\beta$  binden können, jedoch nicht alle im gleichem Ausmaß (Wisniewski et al. 1993; LaDu et al. 1994). Verghese et al. (2013) konnten keine Bindung von A $\beta$  an APOE feststellen. Ihre alternative Hypothese ist, dass APOE Isoformen und A $\beta$ -Peptide um den Abbau im Stoffwechsel konkurrieren.

Der Einfluss von APOE  $\epsilon$ 4 als Teil der Matrixeffekte bleibt somit unklar; er nimmt allerdings durch die Interaktionen möglicherweise Einfluss auf die fehlende Reproduzierbarkeit der Messungen zwischen den Laboren (Slemmon et al. 2012). Da die verwendeten Assays zu-

dem unterschiedlich sensitiv gegenüber den Einflussfaktoren im Liquor zu sein scheinen, kann hier eine weitere Ursache für hohe Varianzen und unterschiedliche Detektionsraten vermutet werden (Slemmon et al. 2012).

Laut Slemmon et al. (2012) führte die geringere Detektion von A $\beta$ 42 durch die Matrixeffekte zu einem reduzierten Gruppenunterschied. Um dies zu unterbinden, empfehlen Slemmon et al. (2012) und Nakamura et al. (2018b) bei Betrachtungen der A $\beta$ 42 Konzentration die Patienten abhängig vom APOE Genotyp zu klassifizieren.

#### 4.2.7 Intraassay-Varianz: Parallele Immunpräzipitationen

Die Intraassayvarianz beschreibt die Varianzen, die durch die manuellen Schritte auftreten. Diese kommen vor allem durch das Pipettieren zustande. Die Pipetten sollten optimal eingestellt und kalibriert sein; bei visköseren Flüssigkeiten muss für ein präziseres Ergebnis auf die Benetzung der Pipettenspitzen geachtet werden (Willemse et al. 2017).

Die in dieser Arbeit für die IP beobachteten mittleren Variationskoeffizienten zwischen den technischen Replikaten waren mit  $< 6\%$  recht gering. Ebenso beträgt der durchschnittliche Variationskoeffizient aller Peptide  $< 5\%$ .

Shahpasand-Kroner et al. (2018) stellten ähnliche, wenn auch höhere, mittlere Variationskoeffizienten für A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 fest.

#### 4.2.8 Interassay-Varianz und Normalisierung

Die Qualitätskontrollproben, anhand derer die Interassay-Varianz untersucht wurde, wurden nach der Konzentration der jeweiligen Peptide ausgewählt, sodass eine hohe Konzentration, eine mittlere und eine niedrige vorlag. Zusätzlich wurde eine Poolprobe verwendet.

Der initial in dieser Arbeit beobachtete mittlere Variationskoeffizient nach fünf Assay-Durchgängen war nahezu in allen Proben über der akzeptierten Grenze von  $< 20\%$  (siehe Tab. 3.19). Folglich muss in Zukunft eine technische Verbesserung des Assays angestrebt werden. Dazu müssen für alle Schritte detaillierte SOPs entworfen und alle Instrumente regelmäßig kontrolliert werden. Das Personal sollte für die einheitliche Durchführung geschult werden und es sollten stets QC-Proben in die Messungen eingeschlossen werden. Automatisierungen der Durchführung sollten aufgenommen werden.

Erstmalig wurde für den Assay eine Normalisierung mittels der QC-Pool-Probe durchgeführt. Plattenspezifische Korrekturfaktoren für die Peptide wurden gebildet (siehe Gleichungen (3.3), (3.4) und (3.5)).

Nach der Normalisierung betrug der mittlere Variationskoeffizient  $< 11\%$ . Es konnte somit gezeigt werden, dass die Normalisierung gut geeignet ist, um die Varianzen zwischen den Assay-Durchläufen zu korrigieren (siehe Abb. 12, 11).

Schauer et al. (2018) haben eine Normalisierung ihrer Daten bezüglich der Liquor-Konzentrationen der Peptide untersucht. Vor allem für die stärker schwankenden Ergebnisse von A $\beta$ 42

konnten die Varianzen deutlich reduziert werden.

Die Normalisierung in der vorliegenden Arbeit zeigt analog eine deutliche Reduktion der Varianzen. Ebenfalls lag die größte gemessene Schwankung für A $\beta$ 42 vor (siehe Abb. 12 und Tab. 3.19). Für die A $\beta$ 42/40 Ratio und die A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio wurden die niedrigsten Werte in Assay vier gemessen (siehe Abb. 11). Durch die Normalisierung wird dieser Effekt ausgeglichen.

Die größte Limitation stellt hier die geringe Anzahl von fünf Assay-Durchgängen dar, auch wenn bereits deutlich gezeigt werden konnte, wie gut die Normalisierung geeignet ist, um die Interassay-Varianzen auszugleichen. Angaben, die sich in der Literatur zur Optimierung der Interassay-Varianz finden, zeigen, dass die Anzahl der Durchläufe erhöht werden sollte, aber nicht die Anzahl der technischen Replikate (Lee et al. 2006).

### 4.3 Anwendung des Assays auf eine unabhängige klinische Kohorte

Der im ersten Teil der Arbeit hinsichtlich ausgewählter und auf die technische Qualität ausgerichteter Parameter validierte Assay wurde schließlich angewendet, um zu untersuchen, ob der Biomarker „erniedrigte A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Blutplasma bei Alzheimer“ in einer unabhängigen klinischen Stichprobe aus der Biobank der Klinik für Psychiatrie an der UMG ebenfalls nachgewiesen werden konnte. Anders als in der Studie von Shahpasand-Kroner et al. (2018), in der die Probanden auf Grundlage einer biomarkergestützten klinischen Diagnose in die Gruppen OD (andere Demenzen) und AD-D (Demenz vom Alzheimerstyp) klassifiziert wurden, erfolgte die Klassifizierung hier allein aufgrund des im klinischen Labor der UMG bestimmten A $\beta$ 1-42/A $\beta$ 1-40-Quotienten im Liquor und des dort angewandten diagnostischen Grenzwertes (*cutpoint*).

Weiterhin berücksichtigt wurden die Liquorkonzentration von Tau. Diesem Vorgehen, also einer Klassifizierung allein auf der Grundlage von CSF-Biomarkerbefunden, lag die Arbeitshypothese zugrunde, dass sowohl eine Erniedrigung der A $\beta$ 1-42/A $\beta$ 1-40 Ratio im Liquor als auch eine erniedrigte A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Blut (mit dem Zwei-Schritt-Immunoassay gemessen) Surrogatmarker einer zerebralen Amyloidpathologie sind.

In diesem Fall müsste eine Bestimmung der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratios im Plasma eine gute Vorhersage über die A $\beta$ 1-42/A $\beta$ 1-40 Ratios im Liquor ermöglichen.

Analysiert wurden die normalisierten Daten, da die Kohorte auf zwei Platten gemessen wurde. Betrachtet wurden auch die nicht-normalisierten Daten, wobei ähnliche Ergebnisse vorlagen. In dieser Kohorte ergab sich mit Normalisierung kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen für die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio. A $\beta$ 38 und A $\beta$ 42 unterschieden sich signifikant zwischen den zwei Gruppen.

Bei den nicht-normalisierten Daten ist zusätzlich die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio signifikant unterschiedlich.

Somit konnte der von Shahpasand-Kroner et al. (2018) beobachtete Biomarker (erniedrigte

A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im EDTA-Blutplasma) in Patienten mit Hinweisen auf zerebrale Amyloidpathologie in der hier untersuchten Kohorte nicht wiedergefunden werden. Der Grund hierfür ist nicht klar.

Auffällig bei der Analyse der hier vorgestellten Daten waren deutliche Unterschiede in den beiden Assaydurchgängen vier und fünf, die eine Rolle gespielt haben könnten. Diese Varianzen zwischen den Assaydurchgängen weisen daraufhin, dass weitere technische Verbesserungen des Zwei-Schritt-Verfahrens nötig sind.

Für alle Einzelschritte sollten genau definierte SOPs erstellt und angewendet werden. Wenn möglich sollten immer die gleichen, geprüften Pipetten verwendet werden und die verwendeten Reagenzien kontrolliert werden.

Um technische Fehler weiter zu minimieren, sollten die Abläufe nach Möglichkeit automatisiert werden. Insbesondere die manuelle Immunpräzipitation könnte vermutlich zu Varianzen zwischen Versuchstagen beitragen, insbesondere dann, wenn verschiedene Personen beteiligt sind.

Durch die Verwendung von Kontrollproben auf jeder im Labor gemessenen Assayplatte können Messwerte in größerem Umfang normalisiert werden. Die Normalisierung ist sinnvoll, um Ausreißer wie Platte vier zu kompensieren ohne Ausreißer auszuschließen.

Eine interessante Beobachtung ist, dass A $\beta$ 40 in dieser Kohorte innerhalb der biomarkerpositiven Gruppe im Liquor besonders hoch war (siehe Tab. 3.22, MW 15530 pg/ml). A $\beta$ 1-40 im Liquor war in der biomarkerpositiven Gruppe um 50 % höher und statistisch signifikant. Dies zeigte sich retrospektiv in allen drei Messungen der Kohorte im Liquor (Erlangen ELISA, UMG ELISA, UMG MSD-Triplex).

In der ersten mit dem Assay gemessenen biomarkerpositiven Gruppe (Shahpasand-Kroner et al. 2018) lagen deutlich geringere Liquorkonzentrationen vor (MW 11870 pg/ml). Die Erhöhung von A $\beta$ 40 im Liquor ist kein beschriebener Biomarker für die Alzheimererkrankung (Olsson et al. 2016).

Das bedeutet zusätzlich zu den technischen Ursachen, könnten auch Besonderheiten der Kohorte verantwortlich sein, dafür, dass die Plasmaratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 nicht unterschiedlich war. Dieser Konzentrationsunterschied der A $\beta$ 40 im Liquor nimmt möglicherweise Einfluss auf die Konzentration von A $\beta$ 40 im Plasma, da sie ebenfalls auffallend hoch ist (MW 562 pg/ml). In der speziell ausgewählten Kohorte lag im Gegensatz dazu ein MW von 360 pg/ml vor. Auffällig ist weiterhin, dass die Konzentrationen von A $\beta$ 42 in der gesamten Kohorte mit einer Ausnahme über dem laborinternen *Cut-off* des UMG-Labors liegen (450 pg/ml).

Im Verhältnis zu dem erhöhten A $\beta$ 40 wird die Liquor A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio beeinflusst, sodass sie unterhalb des laborinternen *Cut-off* von 0,5 liegt.

Die normalisierte A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Plasma korreliert gut mit den Amyloid-PET Befunden: Bei dreizehn vorliegenden Datenpaaren wurde eine signifikant stark negative Korrelation zwischen Amyloid-PET-Daten und der normalisierten A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Plasma beobachtet (Pearson-Korrelation: -0,65, siehe Abb. 24).

Dies steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Shahpasand-Kroner et al. (2018), die ebenfalls eine negative Pearson-Korrelation feststellen konnten (Pearson-Korrelation: -0,745).

Auffällig ist allerdings, dass bei sechs Probanden mit unauffälliger A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio im Liquor das Amyloid-PET auf zerebrale Amyloidpathologie hinweist.

Die Korrelation nach Messungen der Liquorproben mit dem MSD-Triplex ist weniger stark (Pearson-Korrelation: -0,517), allerdings konnten bei dieser Messung nur noch neun Probanden miteinbezogen werden, wodurch die Abschwächung erklärt werden kann. Zusätzlich waren fünf der sechs Probanden aus der biomarkernegativen Gruppe mit auffälligem Amyloid-PET darin eingeschlossen.

Die Messwerte aus dem Forschungslabor der UMG (MSD-Triplex), dem klinischen Labor der UMG (ELISA) und dem Labor in Erlangen (ELISA), in denen die Liquorproben der Kohorte gemessen wurden, unterschieden sich. Dennoch konnte ein stark signifikanter Unterschied zwischen biomarkerpositiver und biomarkernegativer Gruppe in allen Messungen für A $\beta$ 40 und die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio bestätigt werden. Für A $\beta$ 42 konnte nur in der Messung der Liquorproben mit ELISA im klinischen Labor der UMG ein signifikanter Gruppenunterschied festgestellt werden ( $p = 0,0004$ ; MSD-Triplex:  $p = 0,42$ ; Erlangen ELISA:  $p = 0,83$ ).

Vogelgsang et al. (2018b) haben bereits auffällige Unterschiede in den Messungen der Amyloidpeptide im Liquor bzw. den diagnostischen Beurteilungen anhand der von den Laboren angewendeten Grenzwerte (*cutpoints*) beobachtet.

## 4.4 Methodenkritik, Limitationen der Studie und Ausblick

Auffällig bei der Analyse der hier vorgestellten Daten waren deutliche Unterschiede in den beiden Assaydurchgängen vier und fünf, sowie eine deutliche Erhöhung von A $\beta$ 40 in der unabhängigen klinischen Kohorte. Die Varianzen zwischen den Assaydurchgängen weisen daraufhin, dass weitere technische Verbesserungen des Zwei-Schritt-Verfahrens nötig sind. Die ungewöhnliche Erhöhung um 50 % von Liquor A $\beta$ 40 in drei voneinander unabhängigen Messungen zeigt den Bedarf an umfassenderer Kohortendichotomisierung.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse der Assayvalidierung können als Grundlage für die technische Verbesserung und weitere Standardisierung des Zweischritt-Assays dienen. Angestrebt wird die Durchführung der IP mit anderen Partnern und eine Automatisierung der Messungen zur Reduktion technischer Fehler. Daher sollte der technische Ablauf des Assays weiter vereinfacht werden, SOPs erstellt werden und die Mitarbeiter für eine einheitliche Durchführung geschult werden. Vermutlich trägt vor allem die manuelle IP stark zu den Varianzen zwischen den Versuchstagen bei, insbesondere wenn verschiedene Personen beteiligt sind. Wenn möglich sollten immer die gleichen, geprüften Pipetten verwendet werden und die verwendeten Reagenzien kontrolliert werden.

Durch die Etablierung eines Einfrier-Zwischenschritts der IP-Eluat vor dem MSD-Assay konnte bereits eine wesentliche Vereinfachung erreicht werden, die eine zeitliche und räumliche Trennung ermöglicht. Langfristig, vor allem für die Kooperation mit anderen Partnern und die klinische Anwendung, kann die Etablierung laborübergreifender Referenzwerte ein Ziel sein. Die *Spike*-Experimente müssen erneut kontrolliert werden, da der anzunehmende Verdünn-

ungsfehler von A $\beta$ 42 und die Besonderheiten von Assay-Platte vier zur einer Verschlechterung des Ergebnis führten.

Ausgehend von den hier vorgestellten guten Ergebnissen der Normalisierung sollten in allen weiteren Untersuchungen bezüglich des Assays stets miteinander vergleichbare QC-Proben eingeschlossen werden. Dafür sollten einerseits QC-Proben verwendet werden, welche die Varianzen des vollständigen Zwei-Schritt-Verfahrens abbilden und zusätzlich Proben, die nur die Varianzen des MSD-Assays zeigen.

Weiterer Untersuchungsbedarf ergibt sich aus den widersprüchlichen Untersuchungsergebnissen der von Shahpasand-Kroner et al. (2018) und in dieser Arbeit mit dem Zweischritt-Assay kontrollierten klinischen Kohorten. In folgenden Untersuchungen mittels klinischer Kohorten könnten die Probanden vorrangig nach Amyloid-PET Befunden dichotomisiert werden, wie dies bereits Nakamura et al. (2018a) durchgeführt haben. Zusätzlich könnten zur Dichotomisierung die klinische Diagnose und der APOE Genotyp berücksichtigt werden. In der unabhängigen klinischen Kohorte lagen nicht für alle Probanden Amyloid-PET Daten vor; bei einigen standen sie zudem im Widerspruch zu den Liquorbiomarkern. Dennoch konnte eine signifikant negative Korrelation von globalen Amyloid-PET Daten und der Plasmaratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 festgestellt werden. Interessant wären weitere Studienanalysen, um diesen Zusammenhang gründlicher zu untersuchen. Vielversprechend scheint es zu sein die Messungen von Liquor- und Plasmaproben einer Kohorte in Zukunft mit demselben Assayverfahren durchzuführen.



## 5 Zusammenfassung

Gut belegte Biomarker der Alzheimerkrankheit sind eine selektive erniedrigte Konzentration von Amyloid- $\beta$ (A $\beta$ )-1-42 im Liquor bzw. ein erniedrigter A $\beta$ 1-42/A $\beta$ 1-40-Quotient. 2011 wurden Biomarker und Bildgebung in die überarbeiteten Diagnosekriterien der Alzheimerdemenz aufgenommen. Eine Biomarkermessung im Blut hätte erhebliche Vorteile gegenüber der Messung im Liquor, da Blut leichter zugänglich ist. Zudem ist die Probenentnahme im Gegensatz zur Liquorpunktion minimalinvasiv sowie günstiger und schneller durchzuführen als bildgebende Verfahren. Für die A $\beta$ -Peptide im Blut sind Aussagekraft und Anwendbarkeit in der Diagnostik noch nicht so eindeutig wie im Liquor belegt. Neuere Publikationen weisen jedoch stark darauf hin, dass die Sensitivität der Biomarker in Kombination mit dem Amyloid-Positronen-Emissions-Tomographie (Amyloid-PET) gesteigert werden kann und verlässliche Aussagen möglich sind.

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein neu entwickelter zweiseitiger Immunoassay, bestehend aus Immunpräzipitation (IP) und Immuno-Multiplex-Assay (V-PLEX A $\beta$  [6E10]) hinsichtlich der Durchführbarkeit im Alltag verbessert und anschließend im Sinne einer „*Fit-for-purpose*“-Validierung mittels partieller Validierungsexperimente überprüft.

Zur Analyse wurden kovalent vernetzte Magnetbeads für die IP hergestellt und ihre Funktion und Qualität mittels Semi-Dry-Western-Blot-Analysen überprüft. Um die Amyloid- $\beta$ -Peptide zu messen, wurden sie mittels manueller Immunpräzipitation aus humanem EDTA-Blutplasma angereichert und anschließend mit einem Assay mit Chemolumineszenzreadout quantifiziert. Im Rahmen der Validierung wurden Intra- und Interassayvarianz, *Limits of Detection* und *Limits of Quantification*, Positionseffekte während der Messung mit dem Multiplex Chemolumineszenzreadout, *Parallelism*, Assay-Selektivität, *Spiking*, die Effizienz der Immunpräzipitation sowie der Einfluss unterschiedlicher Volumina kontrolliert.

Der Assay wurde modifiziert, um die Durchführbarkeit unter normalen Laborbedingungen zu verbessern. Es wurde eingeführt, die IP-Eluate bei -80 °C vor der Messung mit dem MSD-Triplex-Assay einzufrieren und damit ermöglicht, den Arbeitsablauf zu unterbrechen und IP und Messung zeitlich und ggf. örtlich voneinander zu trennen. Anhand einer speziell ausgesuchten Minikohorte konnte gezeigt werden, dass das Einfrieren der 4,8-fach in Diluent 35 verdünnten IP Eluate nicht dazu geführt hat, dass der Gruppenunterschied nicht mehr messbar war, so dass der Einfrierschritt Eingang in das standardisierte Arbeitsprotokoll gefunden hat und bei allen weiteren Experimenten angewendet wurde. Es lag eine signifikante Reduktion der A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio um 19 % und der A $\beta$ 42/A $\beta$ 38-Ratio um 16 % zwischen biomarkerpositiver und -negativer Gruppe vor. Damit war eine wesentliche Voraussetzung geschaffen, um eine Automatisierung der IP in Kooperation mit anderen Partnern zu entwickeln.

Die IP mittels 1E8-Antikörpern war sehr effizient für die Anreicherung und die folgende semi-quantitative Messung der Amyloid- $\beta$ -Peptide. Auf Matrixeffekte im Plasma wies hin, dass die IP-Effizienz und *Spike*-Wiederfindungsraten für A $\beta$ 42 am geringsten waren sowie dass die Verdünnung der Plasmaproben vor der IP anscheinend die relative Wiederfindungsrate von A $\beta$ 42 verbessert hatte.

Die Interassay-Varianz war initial hoch ( $> 20\%$ ). Die daraufhin durchgeführte Normalisierung mittels plattenspezifischer Korrekturfaktoren zeigte gute Ergebnisse: Der mittlere Variationskoeffizient wurde auf  $< 11\%$  reduziert. Mittels des teilvalidierten „*Fit-for-purpose*“-Assays wurde anschließend eine unabhängige klinische Kohorte, die allein auf Grundlage von Biomarkerbefunden im Liquor klassifiziert worden war, untersucht. Der Biomarker konnte in dieser klinischen Kohorte nicht bestätigt werden. Nur A $\beta$ 42 und A $\beta$ 38 waren signifikant unterschiedlich zwischen der biomarkerpositiven und -negativen Gruppe. Die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio erreichte keine statistische Signifikanz. Dies steht im Widerspruch zu bisherigen Untersuchungen des Assays von Shahpasand-Kroner et al. aus dem Jahr 2018. Unklar ist derzeit, worauf das zurückzuführen ist.

Beim Vergleich der beiden verwendeten Assayplatten fielen Unterschiede auf, die auf technische Probleme hinweisen, die möglicherweise nicht vollständig durch die angewendete Normalisierung kompensiert werden konnten. Bei retrospektiver Betrachtung der untersuchten Stichprobe fielen folgende Beobachtungen auf: A $\beta$ 1-40 war im Liquor um ca. 50 % erhöht in der biomarkerpositiven Gruppe, was sehr ungewöhnlich ist. Die signifikante Erhöhung lag in drei unabhängigen Messungen der Liquorproben vor. Im Plasma war die Konzentration von A $\beta$ 40 ebenfalls auffallend hoch. Eine Erhöhung von A $\beta$ 1-40 ist nicht als Biomarker für die Alzheimerkrankheit beschrieben.

Die A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio und A $\beta$ 42, gemessen in Plasma und Liquor mit dem MSD-Triplex, korrelierten signifikant. Zwischen Amyloid-PET-Daten und der Plasma A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Ratio lag eine deutliche negative Korrelation, die statistische Signifikanz erreichte, vor.

Limitationen dieser Arbeit stellen die kleinen Kohortengrößen und die Dichotomisierung der unabhängigen klinischen Kohorte dar. In dieser unabhängigen klinischen Kohorte lagen nicht für alle Proben Amyloid-PET-Daten vor und standen zum Teil im Widerspruch zu den Liquorbiomarkern.

Der Zwei-Schritt-Assay sollte in Zukunft technisch verbessert und weiter standardisiert werden. Unbedingt sollten immer QC-Proben für die Normalisierung mitlaufen, welche die Varianzen des vollständigen Verfahrens und isoliert die MSD-Varianzen abbilden. Strenge standardisierte Arbeitsprotokolle müssen entworfen werden, das Personal gut trainiert werden und wenn möglich sollte eine Automatisierung der Arbeitsschritte erfolgen. Unter Umständen sollten andere sekundäre Messverfahren als Alternative zu MSD getestet werden.

Eine deutliche Methodenverbesserung des Assays konnte bereits in dieser Arbeit erreicht werden, da die IP-Eluate erfolgreich vor der MSD-Messung eingefroren werden konnten. Das resultierte in einer wesentlichen Erleichterung der praktischen Durchführbarkeit und Entwicklung weiterer Assaymodule.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E und Slutsky I (2009): Amyloid- $\beta$  as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 12, 1567–1576
- Andreasen N, Minthon L, Davidsson P, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Winblad B und Blennow K (2001): Evaluation of CSF-tau and CSF-A $\beta$ 42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. *Arch Neurol* 58, 373–379
- Andreasen N, Sjögren M und Blennow K (2003): CSF markers for Alzheimer’s disease: total tau, phospho-tau and Abeta42. *World J Biol Psychiatry* 4, 147–155
- Andreasson U, Perret-Liaudet A, van Waalwijk van Doorn LJC, Blennow K, Chiasserini D, Engelborghs S, Fladby T, Genc S, Kruse N, Kuiperij HB et al. (2015): A practical guide to immunoassay method validation. *Front Neurol* 6, 179
- Ashton NJ, Hye A, Rajkumar AP, Leuzy A, Snowden S, Suárez-Calvet M, Karikari TK, Schöll M, Joie RL, Rabinovici GD et al. (2020): An update on blood-based biomarkers for non-Alzheimer neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* 16, 1–20
- Baghallab I, Reyes-Ruiz JM, Abulnaja K, Huwait E und Glabe C (2018): Epitomic characterization of the specificity of the anti-amyloid A $\beta$  monoclonal antibodies 6E10 and 4G8. *J Alzheimer’s Dis* 66, 1235–1244
- Bateman R, Wen G, Morris J und Holtzman D (2007): Fluctuations of CSF amyloid- $\beta$  levels: implications for a diagnostic and therapeutic biomarker. *Neurology* 68, 666–669
- Bates KA, Verdile G, Li QX, Ames D, Hudson P, Masters CL und Martins RN (2009): Clearance mechanisms of Alzheimer’s amyloid- $\beta$  peptide: implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Mol Psychiatry* 14, 469–486
- Belger M, Haro JM, Reed C, Happich M, Argimon JM, Bruno G, Dodel R, Jones RW, Vellas B und Wimo A (2019): Determinants of time to institutionalisation and related healthcare and societal costs in a community-based cohort of patients with Alzheimer’s disease dementia. *Eur J Health Econ* 20, 343–355
- Bibl M, Esselmann H, Otto M, Lewczuk P, Cepek L, Rütger E, Kornhuber J und Wiltfang J (2004): Cerebrospinal fluid amyloid  $\beta$  peptide patterns in Alzheimer’s disease patients and nondemented controls depend on sample pretreatment: indication of carrier-mediated epitope masking of amyloid  $\beta$  peptides. *Electrophoresis* 25, 2912–2918

- Bibl M, Welge V, Esselmann H und Wiltfang J (2012): Stability of amyloid- $\beta$  peptides in plasma and serum. *Electrophoresis* 33, 445–450
- Biere AL, Ostaszewski B, Stimson ER, Hyman BT, Maggio JE und Selkoe DJ (1996): Amyloid  $\beta$ -Peptide Is Transported on Lipoproteins and Albumin in Human Plasma. *J Biol Chem* 271, 32916–32922
- Bjerke M, Portelius E, Minthon L, Wallin A, Anckarsäter H, Anckarsäter R, Andreassen N, Zetterberg H, Andreasson U und Blennow K (2010): Confounding Factors Influencing Amyloid Beta Concentration in Cerebrospinal Fluid. *Int J Alzheimers Dis* 2010, 986310
- Blennow K, Vanmechelen E und Hampel H (2001): CSF total tau, A $\beta$ 42 and phosphorylated tau protein as biomarkers for Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 24, 87
- Bouallègue FB, Mariano-Goulart D und Payoux P (2017): Comparison of CSF markers and semi-quantitative amyloid PET in Alzheimer's disease diagnosis and in cognitive impairment prognosis using the ADNI-2 database. *Alz Res Therapy* 9, 1–13
- Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K und Arrighi HM (2007): Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 3, 186–191
- Bruun M, Rhodius-Meester HF, Koikkalainen J, Baroni M, Gjerum L, Lemstra AW, Barkhof F, Remes AM, Urhema T, Tolonen A et al. (2018): Evaluating combinations of diagnostic tests to discriminate different dementia types. *Alzheimers Dement (Amst)* 10, 509–518
- Buchhave P, Minthon L, Zetterberg H, Wallin mK, Blennow K und Hansson O (2012): Cerebrospinal Fluid Levels of  $\beta$ -Amyloid 1-42, but Not of Tau, Are Fully Changed Already 5 to 10 Years Before the Onset of Alzheimer Dementia. *Arch Gen Psychiatry* 69, 98–106
- Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P und Yankner BA (1993): Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2092–2096
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL und Pericak-Vance MA (1993): Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923
- de Wilde A, Reimand J, Teunissen CE, Zwan M, Windhorst AD, Boellaard R, van der Flier WM, Scheltens P, van Berckel BNM, Bouwman F et al. (2019): Discordant amyloid- $\beta$  PET and CSF biomarkers and its clinical consequences. *Alzheimers Res Ther* 11, 78
- Deane R, Bell R, Sagare A und Zlokovic B (2009): Clearance of amyloid- $\beta$  peptide across the blood-brain barrier: Implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8, 16–30
- Deutsche Alzheimer Gesellschaft (2018): Neues Informationsblatt der Deutschen Alzheimer Gesellschaft: Alle 100 Sekunden erkrankt in Deutschland ein Mensch an Demenz. <https://www.deutsche-alzheimer.de/ueber-uns/presse/artikelansicht/artikel/die-zahl-der-demenzkranken-steigt-jaehrlich-um-40000.html>. Abgerufen am 20.02.2020

- Doecke JD, Pérez-Grijalba V, Fandos N, Fowler C, Villemagne VL, Masters CL, Pesini P, Sarasa M und AIBL Research Group (2020): Total A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio in plasma predicts amyloid-PET status, independent of clinical AD diagnosis. *Neurology* 94, e1580–e1591
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, DeKosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G et al. (2007): Research criteria for the diagnosis of Alzheimer’s disease: revising the NINCDS–ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 6, 734–746
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D und Ward PJ (1990): Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122–1124
- Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, Lee SY, Dence CS, Shah AR, LaRossa GN, Spinner ML, Klunk WE, Mathis CA et al. (2006): Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid A $\beta$ 42 in humans. *Ann Neurol* 59, 512–519
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y et al. (2005): Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366, 2112–2117
- Frank R und Hargreaves R (2003): Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2, 566
- Galvin JE und Sadowsky CH (2012): Practical Guidelines for the Recognition and Diagnosis of Dementia. *J Am Board Fam Med* 25, 367–382
- Gauthier S, Zhang H, Ng KP, Pascoal T und Rosa-Neto P (2018): Impact of the biological definition of Alzheimer’s disease using amyloid, tau and neurodegeneration (ATN): what about the role of vascular changes, inflammation, Lewy body pathology? *Transl Neurodegener* 7, 12
- Gervaise-Henry C, Watfa G, Albuissou E, Kolodziej A, Dousset B, Olivier JL, Jonveaux TR und Malaplate-Armand C (2017): Cerebrospinal Fluid A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 as a Means to Limiting Tube- and Storage-Dependent Pre-Analytical Variability in Clinical Setting. *J Alzheimers Dis* 57, 437–445
- Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J, Boeve BF, Knopman DS, Ivnik RJ, Smith GE, Younkin LH, Petersen RC und Younkin SG (2007): Association of Low Plasma A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 Ratios With Increased Imminent Risk for Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 64, 354–362
- Grant MKO, Handoko M, Rozga M, Brinkmalm G, Portelius E, Blennow K, Ashe KH, Zahr KR und Liu P (2019): Human cerebrospinal fluid 6E10-immunoreactive protein species contain amyloid precursor protein fragments. *PLoS ONE* 14, e0212815

- Grimmer T, Riemenschneider M, Förstl H, Henriksen G, Klunk WE, Mathis CA, Shiga T, Wester HJ, Kurz A und Drzezga A (2009): Beta Amyloid in Alzheimer's Disease: Increased Deposition in Brain Is Reflected in Reduced Concentration in Cerebrospinal Fluid. *Biol Psychiatry* 65, 927–934
- Gronewold J, Klafki HW, Baldelli E, Kaltwasser B, Seidel UK, Todica O, Volsek M, Haußmann U, Wiltfang J, Kribben A et al. (2016): Factors Responsible for Plasma  $\beta$ -Amyloid Accumulation in Chronic Kidney Disease. *Mol Neurobiol* 53, 3136–3145
- Group BDW (2001): Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69, 89–95
- Group TW (1998): Consensus Report of the Working Group on: “Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease”. *Neurobiol Aging* 19, 109–116
- Guilbault GG und Hjelm M (1989): Nomenclature for automated and mechanised analysis (Recommendations 1989). *Pure Appl Chem* 61, 1657–1664
- Hampel H, Frank R, Broich K, Teipel SJ, Katz RG, Hardy J, Herholz K, Bokde ALW, Jessen F, Hoessler YC et al. (2010): Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 9, 560–574
- Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Andreasson U, Londos E, Minthon L und Blennow K (2007): Prediction of Alzheimer's Disease Using the CSF A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 Ratio in Patients with Mild Cognitive Impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord* 23, 316–320
- Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K und Minthon L (2006): Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol* 5, 228–234
- Hansson O, Zetterberg H, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Andreasson U, Londos E, Wallin A, Minthon L und Blennow K (2010): Evaluation of plasma A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 as predictors of conversion to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 31, 357–367
- Hardy J und Selkoe DJ (2002): The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* 297, 353–356
- Hardy JA und Higgins GA (1992): Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185
- Haußmann U, Jahn O, Linning P, Janßen C, Liepold T, Portelius E, Zetterberg H, Bauer C, Schuchhardt J, Knölker HJ et al. (2013): Analysis of Amino-Terminal Variants of Amyloid- $\beta$  Peptides by Capillary Isoelectric Focusing Immunoassay. *Anal Chem* 85, 8142–8149
- Head E, Silverman W, Patterson D und Lott IT (2012): Aging and Down Syndrome. *Curr Gerontol Geriatr Res* 2012, 412536

- Henriksen K, O'Bryant SE, Hampel H, Trojanowski JQ, Montine TJ, Jeromin A, Blennow K, Lönneborg A, Wyss-Coray T, Soares H et al. (2014): The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)* 10, 115–131
- Hilal S, Wolters FJ, Verbeek MM, Vanderstichele H, Kamran Ikram M, Stoops E, Arfan Ikram M und Vernooij MW (2018): Plasma amyloid- $\beta$  levels, cerebral atrophy and risk of dementia: a population-based study. *Alzheimers Res Ther* 10, 63
- Ida N, Hartmann T, Pantel J, Schröder J, Zerfass R, Förstl H, Sandbrink R, Masters CL und Beyreuther K (1996): Analysis of Heterogeneous  $\beta$ A4 Peptides in Human Cerebrospinal Fluid and Blood by a Newly Developed Sensitive Western Blot Assay. *J Biol Chem* 271, 22908–22914
- Jack C, Dickson D, Parisi J, Xu YC, Cha RH, O'Brien P, Edland SD, Smith GE, Boeve BF, Tangalos E et al. (2002): Antemortem MRI Findings Correlate with Hippocampal Neuropathology in Typical Aging and Dementia. *Neurology* 58, 750–757
- Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, Holtzman DM, Jagust W, Jessen F, Karlawish J et al. (2018): NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)* 14, 535–562
- Janelidze S, Stomrud E, Palmqvist S, Zetterberg H, van Westen D, Jeromin A, Song L, Hanlon D, Tan Hehir CA, Baker D et al. (2016a): Plasma  $\beta$ -amyloid in Alzheimer's disease and vascular disease. *Sci Rep* 6, 26801
- Janelidze S, Zetterberg H, Mattsson N, Palmqvist S, Vanderstichele H, Lindberg O, van Westen D, Stomrud E, Minthon L, Blennow K et al. (2016b): CSF A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42/A $\beta$ 38 ratios: better diagnostic markers of Alzheimer disease. *Ann Clin Transl Neurol* 3, 154–165
- Jansen WJ, Ossenkoppele R, Knol DL, Tijms BM, Scheltens P, Verhey FRJ und Visser PJ (2015): Prevalence of Cerebral Amyloid Pathology in Persons Without Dementia. *JAMA* 313, 1924–1938
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K und Müller-Hill B (1987): The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733–736
- Kawooya JK, Emmons TL, Gonzalez-DeWhitt PA, Camp MC und D'Andrea SC (2003): Electrophoretic mobility of Alzheimer's amyloid- $\beta$  peptides in urea-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 323, 103–113
- Kern S, Zetterberg H, Kern J, Zettergren A, Waern M, Höglund K, Andreasson U, Wetterberg H, Börjesson-Hanson A, Blennow K et al. (2018): Prevalence of preclinical Alzheimer disease: Comparison of current classification systems. *Neurology* 90, e1682
- Keshavan A, Heslegrave A, Zetterberg H und Schott JM (2018): Stability of blood-based biomarkers of Alzheimer's disease over multiple freeze-thaw cycles. *Alzheimers Dement (Amst)* 10, 448–451

- Klafki HW, Abramowski D, Swoboda R, Paganetti PA und Staufenbiel M (1996): The Carboxyl Termini of  $\beta$ -Amyloid Peptides 1-40 and 1-42 Are Generated by Distinct  $\gamma$ -Secretase Activities. *J Biol Chem* 271, 28655–28659
- Klafki HW, Hafermann H, Bauer C, Haussmann U, Kraus I, Schuchhardt J, Muck S, Scherbaum N und Wiltfang J (2016): Validation of a Commercial Chemiluminescence Immunoassay for the Simultaneous Measurement of Three Different Amyloid- $\beta$  Peptides in Human Cerebrospinal Fluid and Application to a Clinical Cohort. *J Alzheimers Dis* 54, 691–705
- Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, Small GW, Miller B und Stevens JC (2001): Practice parameter: Diagnosis of dementia (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 56, 1143–1153
- Kremer BP und Bannwarth H (2011): Einführung in die Laborpraxis: Basiskompetenzen für Laborneulinge. 2. Auflage; Springer-Verlag, Heidelberg 2011
- Lachno DR, Evert BA, Maloney K, Willis BA, Talbot JA, Vandijck M und Dean RA (2015): Validation and Clinical Utility of ELISA Methods for Quantification of Amyloid- $\beta$  of Peptides in Cerebrospinal Fluid Specimens from Alzheimer’s Disease Studies. *J Alzheimers Dis* 45, 527–542
- LaDu MJ, Falduto MT, Manelli AM, Reardon CA, Getz GS und Frail DE (1994): Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J Biol Chem* 269, 23403–23406
- Langa KM und Burke JF (2019): Preclinical Alzheimer Disease – Early Diagnosis or Overdiagnosis? *JAMA Intern Med* 179, 1161–1162
- Lee JW, Devanarayan V, Barrett YC, Weiner R, Allinson J, Fountain S, Keller S, Weinryb I, Green M, Duan L et al. (2006): Fit-for-Purpose Method Development and Validation for Successful Biomarker Measurement. *Pharm Res* 23, 312–328
- Lewczuk P, Beck G, Esselmann H, Bruckmoser R, Zimmermann R, Fiszer M, Bibl M, Maler JM, Kornhuber J und Wiltfang J (2006): Effect of Sample Collection Tubes on Cerebrospinal Fluid Concentrations of Tau Proteins and Amyloid  $\beta$  Peptides. *Clin Chem* 52, 332–334
- Lewczuk P, Esselmann H, Bibl M, Paul S, Svitek J, Miertschischk J, Meyrer R, Smirnov A, Maler JM, Klein C et al. (2004a): Electrophoretic separation of amyloid  $\beta$  peptides in plasma. *Electrophoresis* 25, 3336–3343
- Lewczuk P, Esselmann H, Otto M, Maler JM, Henkel AW, Henkel MK, Eikenberg O, Antz C, Krause WR, Reulbach U et al. (2004b): Neurochemical diagnosis of Alzheimer’s dementia by CSF A $\beta$ 42, A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio and total tau. *Neurobiol Aging* 25, 273–281
- Lewczuk P, Kornhuber J, Toledo JB, Trojanowski JQ, Knapik-Czajka M, Peters O, Wiltfang J und Shaw LM (2015): Validation of the Erlangen Score Algorithm for the Prediction of the Development of Dementia due to Alzheimer’s Disease in Pre-Dementia Subjects. *J Alzheimers Dis* 48, 433–441



- Lewczuk P, Kornhuber J, Vanmechelen E, Peters O, Heuser I, Maier W, Jessen F, Bürger K, Hampel H, Frölich L et al. (2010): Amyloid  $\beta$  peptides in plasma in early diagnosis of Alzheimer's disease: A multicenter study with multiplexing. *Exp Neurol* 223, 366–370
- Lewczuk P, Riederer P, O'Bryant SE, Verbeek MM, Dubois B, Visser PJ, Jellinger KA, Engelborghs S, Ramirez A, Parnetti L et al. (2018): Cerebrospinal fluid and blood biomarkers for neurodegenerative dementias: An update of the Consensus of the Task Force on Biological Markers in Psychiatry of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry. *World J Biol Psychiatry* 19, 244–328
- Lewczuk P und Wiltfang J (2008): Neurochemical dementia diagnostics: State of the art and research perspectives. *Proteomics* 8, 1292–1301
- Lewczuk P, Zimmermann R, Wiltfang J und Kornhuber J (2009): Neurochemical dementia diagnostics: a simple algorithm for interpretation of the CSF biomarkers. *J Neural Transm (Vienna)* 116, 1163–1167
- Lobo A, Launer L, Fratiglioni L, Andersen K, Carlo AD, Breteler M, Copeland J, Dartigues JF, Jagger C, Martinez-Lage J et al. (2000): Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurology* 54, S4–S9
- Long GL und Winefordner J (1983): Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Anal Chem* 7, 712A–724A
- Lue LF, Pai MC, Chen TF, Hu CJ, Huang LK, Lin WC, Wu CC, Jeng JS, Blennow K, Sabbagh MN et al. (2019): Age-Dependent Relationship Between Plasma A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 and Total Tau Levels in Cognitively Normal Subjects. *Front Aging Neurosci* 11, 222
- Mahmood T und Yang PC (2012): Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci* 4, 429–434
- Maler JM, Klafki HW, Paul S, Spitzer P, Groemer TW, Henkel AW, Esselmann H, Lewczuk P, Kornhuber J und Wiltfang J (2007): Urea-based two-dimensional electrophoresis of beta-amyloid peptides in human plasma: Evidence for novel a $\beta$  species. *Proteomics* 7, 3815–3820
- Mattsson N, Andreasson U, Persson S, Carrillo MC, Collins S, Chalbot S, Cutler N, Dufour-Rainfray D, Fagan AM, Heegaard NHH et al. (2013): CSF biomarker variability in the Alzheimer's Association quality control program. *Alzheimers Dement (Amst)* 9, 251–261
- Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, Andreasen N, Parnetti L, Jonsson M, Herukka SK, Flier WMvd, Blankenstein MA, Ewers M et al. (2009): CSF Biomarkers and Incipient Alzheimer Disease in Patients With Mild Cognitive Impairment. *JAMA* 302, 385–393
- Mayeux R, Tang MX, Jacobs DM, Manly J, Bell K, Merchant C, Small SA, Stern Y, Wisniewski HM und Mehta PD (1999): Plasma amyloid  $\beta$ -peptide 1–42 and incipient Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46, 412–416

- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D und Stadlan EM (1984): Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34, 939–944
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R 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 (Amst)* 7, 263–269
- Mehta PD, Pirttilä T, Mehta SP, Sersen EA, Aisen PS und Wisniewski HM (2000): Plasma and Cerebrospinal Fluid Levels of Amyloid  $\beta$  Proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 57, 100–105
- Mehta PD, Pirttilä T, Patrick BA, Barshatzky M und Mehta SP (2001): Amyloid  $\beta$  protein 1–40 and 1–42 levels in matched cerebrospinal fluid and plasma from patients with Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 304, 102–106
- Michaelson DM (2014): APOE  $\epsilon$ 4: The most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)* 10, 861–868
- Moran MD (2003): Arguments for rejecting the sequential Bonferroni in ecological studies. *Oikos* 100, 403–405
- Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Doré V, Fowler C, Li QX, Martins R, Rowe C et al. (2018a): High performance plasma amyloid- $\beta$  biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature* 554, 249–254
- Nakamura T, Kawarabayashi T, Seino Y, Hirohata M, Nakahata N, Narita S, Itoh K, Nakaji S und Shoji M (2018b): Aging and APOE- $\epsilon$ 4 are determinative factors of plasma A $\beta$ 42 levels. *Ann Clin Transl Neurol* 5, 1184–1191
- O'Bryant SE, Gupta V, Henriksen K, Edwards M, Jeromin A, Lista S, Bazenet C, Soares H, Lovestone S, Hampel H et al. (2015): Guidelines for the standardization of preanalytic variables for blood-based biomarker studies in Alzheimer's disease research. *Alzheimers Dement (Amst)* 11, 549
- O'Bryant SE, Mielke MM, Rissman RA, Lista S, Vanderstichele H, Zetterberg H, Lewczuk P, Posner H, Hall J, Johnson L et al. (2017): Blood Based Biomarkers in Alzheimer Disease: Current State of the Science and a Novel Collaborative Paradigm for Advancing from Discovery to Clinic. *Alzheimers Dement (Amst)* 13, 45–58
- Olsson B, Lautner R, Andreasson U, Öhrfelt A, Portelius E, Bjerke M, Hölttä M, Rosén C, Olsson C, Strobel G et al. (2016): CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 15, 673–684

- Ovod V, Ramsey K, Mawuenyega K, Bollinger J, Hicks T, Schneider T, Sullivan M, Paumier K, Holtzman D, Morris J et al. (2017): Amyloid beta concentrations and stable isotope labeling kinetics of human plasma specific to CNS amyloidosis. *Alzheimers Dement (Amst)* 13, 841–849
- Panegyres PK (1997): The amyloid precursor protein gene: a neuropeptide gene with diverse functions in the central nervous system. *Neuropeptides* 31, 523–535
- Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG und Kokmen E (1999): Mild Cognitive Impairment: Clinical Characterization and Outcome. *Arch Neurol* 56, 303–308
- Plikaytis BD, Holder PF, Pais LB, Maslanka SE, Gheesling LL und Carlone GM (1994): Determination of parallelism and nonparallelism in bioassay dilution curves. *J Clin Microbiol* 32, 2441–2447
- Reisberg B, Ferris SH, Kluger A, Franssen E, Wegiel J und Leon MJd (2008): Mild cognitive impairment (MCI): a historical perspective. *Int Psychogeriatr* 20, 18–31
- Roberts KF, Elbert DL, Kasten TP, Patterson BW, Sigurdson WC, Connors RE, Ovod V, Munsell LY, Mawuenyega KG, Miller-Thomas MM et al. (2014): Amyloid- $\beta$  efflux from the CNS into the plasma. *Ann Neurol* 76, 837–844
- Rogers J, Webster S, Lue LF, Brachova L, Harold Civin W, Emmerling M, Shivers B, Walker D und McGeer P (1996): Inflammation and Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurobiol Aging* 17, 681–686
- Roher AE, Palmer KC, Yurewicz EC, Ball MJ und Greenberg BD (1993): Morphological and Biochemical Analyses of Amyloid Plaque Core Proteins Purified from Alzheimer Disease Brain Tissue. *J Neurochem* 61, 1916–1926
- Rózga M, Bittner T, Batrla R und Karl J (2019): Preanalytical sample handling recommendations for Alzheimer's disease plasma biomarkers. *Alzheimers Dement (Amst)* 11, 291–300
- Rüchel R, Steere RL und Erbe EF (1978): Transmission-electron microscopic observations of freeze-etched polyacrylamide gels. *J Chromatogr A* 166, 563–575
- Schauer SP, Mylott WR, Yuan M, Jenkins RG, Rodney Mathews W, Honigberg LA und Wildsmith KR (2018): Preanalytical approaches to improve recovery of amyloid- $\beta$  peptides from CSF as measured by immunological or mass spectrometry-based assays. *Alzheimers Res Ther* 10, 118
- Scheltens P, Blennow K, Breteler MMB, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S und Van der Flier WM (2016): Alzheimer's disease. *Lancet* 388, 505–517
- Schindler SE, Bollinger JG, Ovod V, Mawuenyega KG, Li Y, Gordon BA, Holtzman DM, Morris JC, Benzinger TL, Xiong C et al. (2019): High-precision plasma  $\beta$ -amyloid 42/40 predicts current and future brain amyloidosis. *Neurology* 93, e1647–59

- Schoonenboom NS, Mulder C, Vanderstichele H, Van Elk EJ, Kok A, Van Kamp GJ, Scheltens P und Blankenstein MA (2005): Effects of Processing and Storage Conditions on Amyloid  $\beta$  (1–42) and Tau Concentrations in Cerebrospinal Fluid: Implications for Use in Clinical Practice. *Clin Chem* 51, 189–195
- Selkoe DJ (1991): The molecular pathology of Alzheimer’s disease. *Neuron* 6, 487–498
- Selkoe DJ (2001): Alzheimer’s Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol Rev* 81, 741–766
- Selkoe DJ und Wolfe MS (2007): Presenilin: Running with Scissors in the Membrane. *Cell* 131, 215–221
- Shahpasand-Kroner H, Klafki HW, Bauer C, Schuchhardt J, Hüttenrauch M, Stazi M, Bouter C, Wirths O, Vogelgsang J und Wiltfang J (2018): A two-step immunoassay for the simultaneous assessment of A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 in human blood plasma supports the A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio as a promising biomarker candidate of Alzheimer’s disease. *Alzheimers Res Ther* 10, 121
- Sjögren M, Vanderstichele H, Ågren H, Zachrisson O, Edsbacke M, Wikkelso C, Skoog I, Wallin A, Wahlund LO, Marcusson J et al. (2001): Tau and A $\beta$ 42 in Cerebrospinal Fluid from Healthy Adults 21–93 Years of Age: Establishment of Reference Values. *Clin Chem* 47, 1776–1781
- Slats D, Claassen JAHR, Spies PE, Borm G, Besse KTC, van Aalst W, Tseng J, Sjögren MJC, Olde Rikkert MGM und Verbeek MM (2012): Hourly variability of cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer’s disease subjects and healthy older volunteers. *Neurobiol Aging* 33, 831.e1–9
- Slemmon JR, Meredith J, Guss V, Andreasson U, Andreasen N, Zetterberg H und Blennow K (2012): Measurement of A $\beta$ 1–42 in cerebrospinal fluid is influenced by matrix effects. *J Neurochem* 120, 325–333
- Spies PE, Verbeek MM, van Groen T und Claassen JA (2012): Reviewing reasons for the decreased CSF Abeta42 concentration in Alzheimer disease. *Front Biosci* 17, 2024–2034
- Teunissen CE, Chiu MJ, Yang CC, Yang SY, Scheltens P, Zetterberg H und Blennow K (2018): Plasma Amyloid- $\beta$  (A $\beta$  42) Correlates with Cerebrospinal Fluid A $\beta$  42 in Alzheimer’s Disease. *J Alzheimers Disease* 62, 1857–1863
- The Alzheimer’s Association (2018): 2018 Alzheimer’s disease facts and figures. *Alzheimers Dement (Amst)* 14, 367–429
- The International Organization for Standardization (1994): ISO 5725 Standard: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions, Geneva, Switzerland

- Tijms BM, Willemse EAJ, Zwan MD, Mulder SD, Visser PJ, van Berckel BNM, van der Flier WM, Scheltens P und Teunissen CE (2018): Unbiased Approach to Counteract Upward Drift in Cerebrospinal Fluid Amyloid- $\beta$  1–42 Analysis Results. *Clin Chem* 64, 576–585
- Toombs J, Foiani MS, Wellington H, Paterson RW, Arber C, Heslegrave A, Lunn MP, Schott JM, Wray S und Zetterberg H (2018): Amyloid  $\beta$  peptides are differentially vulnerable to preanalytical surface exposure, an effect incompletely mitigated by the use of ratios. *Alzheimers Dement (Amst)* 10, 311–321
- Törnqvist L, Vartia P und Vartia YO (1985): How Should Relative Changes be Measured? *Am Stat* 39, 43–46
- van Oijen M, Hofman A, Soares HD, Koudstaal PJ und Breteler MMB (2006): Plasma A $\beta$ (1–40) and A $\beta$ (1–42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study. *Lancet Neurol* 5, 655–660
- van Waalwijk van Doorn LJC, Kulic L, Koel-Simmelink MJA, Kuiperij HB, Versleijen AAM, Struyfs H, Twaalfhoven HAM, Fourier A, Engelborghs S, Perret-Liaudet A et al. (2017): Multicenter Analytical Validation of A $\beta$ 40 Immunoassays. *Front Neurol* 8, 310
- Vanderschaeghe G, Dierickx K und Vandenberghe R (2018): Review of the Ethical Issues of a Biomarker-Based Diagnoses in the Early Stage of Alzheimer’s Disease. *J Bioethic Inq* 15, 219–230
- Vanderstichele H, Kerschaver EV, Hesse C, Davidsson P, Buyse MA, Andreasen N, Minthon L, Wallin A, Blennow K und Vanmechelen E (2000): Standardization of measurement of  $\beta$ -amyloid(1–42) in cerebrospinal fluid and plasma. *Amyloid* 7, 245–258
- Vanderstichele H, Meyer GD, Andreasen N, Kostanjevecki V, Wallin A, Olsson A, Blennow K und Vanmechelen E (2005): Amino-Truncated  $\beta$ -Amyloid42 Peptides in Cerebrospinal Fluid and Prediction of Progression of Mild Cognitive Impairment. *Clin Chem* 51, 1650–1660
- Vanderstichele HMJ, Janelidze S, Demeyer L, Coart E, Stoops E, Herbst V, Mauroo K, Brix B und Hansson O (2016): Optimized Standard Operating Procedures for the Analysis of Cerebrospinal Fluid A $\beta$ 42 and the Ratios of A $\beta$  Isoforms Using Low Protein Binding Tubes. *J Alzheimers Dis* 53, 1121–1132
- Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, Van Kerschaver E, Van Der Perre B, Sjögren M, Andreasen N und Blennow K (2000): Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci Lett* 285, 49–52
- Verghese PB, Castellano JM, Garai K, Wang Y, Jiang H, Shah A, Bu G, Frieden C und Holtzman DM (2013): ApoE influences amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) clearance despite minimal apoE/A $\beta$  association in physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1807–E1816

- Vogelgsang J, Shahpasand-Kroner H, Vogelgsang R, Streit F, Vukovich R und Wiltfang J (2018a): Multiplex immunoassay measurement of amyloid- $\beta$ 42 to amyloid- $\beta$ 40 ratio in plasma discriminates between dementia due to Alzheimer's disease and dementia not due to Alzheimer's disease. *Exp Brain Res* 236, 1241–1250
- Vogelgsang J, Wedekind D, Bouter C, Klafki HW und Wiltfang J (2018b): Reproducibility of Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid-Biomarker Measurements under Clinical Routine Conditions. *J Alzheimers Dis* 62, 203–212
- von Arnim CAF, Bartsch T, Jacobs AH, Holbrook J, Bergmann P, Zieschang T, Polidori MC und Dodel R (2019): Diagnosis and treatment of cognitive impairment. *Z Gerontol Geriatr* 52, 309–315
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Rowan MJ und Selkoe DJ (2002): Amyloid- $\beta$  oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochem Soc* 30, 552–557
- Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ und Lee VMY (1999): The Levels of Soluble versus Insoluble Brain A $\beta$  Distinguish Alzheimer's Disease from Normal and Pathologic Aging. *Exp Neurol* 158, 328–337
- Wang MJ, Yi S, Han Jy, Park SY, Jang JW, Chun IK, Kim SE, Lee BS, Kim GJ, Yu JS et al. (2017): Oligomeric forms of amyloid- $\beta$  protein in plasma as a potential blood-based biomarker for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 9, 98
- Weller J und Budson A (2018): Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Res* 7, 1161
- Whitcomb BW und Schisterman EF (2008): Assays with lower detection limits: implications for epidemiological investigations. *Paediatr Perinat Epidemiol* 22, 597–602
- Willemsse E, van Uffelen K, Brix B, Engelborghs S, Vanderstichele H und Teunissen C (2017): How to handle adsorption of cerebrospinal fluid amyloid  $\beta$  (1-42) in laboratory practice? Identifying problematic handlings and resolving the issue by use of the A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio. *Alzheimers Dement (Amst)* 13, 885–892
- Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, Hüll M, Hampel H, Kessler H, Frölich L, Schröder J, Peters O, Jessen F et al. (2007): Amyloid  $\beta$  peptide ratio 42/40 but not A $\beta$ 42 correlates with phospho-Tau in patients with low- and high-CSF A $\beta$ 40 load. *J Neurochem* 101, 1053–1059
- Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, Smirnov A, Otto M, Paul S, Schmidt B, Klafki HW, Maler M, Dyrks T et al. (2002): Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated A $\beta$  peptides 1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in alzheimer's disease and in patients with chronic neuroinflammation. *J Neurochem* 81, 481–496
- Wiltfang J, Esselmann H, Maler JM, Bleich S, Hüther G und Kornhuber J (2001): Molecular Biology of Alzheimer's Dementia and Its Clinical Relevance to Early Diagnosis and New Therapeutic Strategies. *Gerontology* 47, 65–71

- Wimo A, Guerchet M, Ali GC, Wu YT, Prina AM, Winblad B, Jönsson L, Liu Z und Prince M (2017): The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010. *Alzheimers Dement (Amst)* 13, 1–7
- Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, Ballard C, Brayne C, Brodaty H, Cedazo-Minguez A, Dubois B, Edvardsson D, Feldman H et al. (2016): Defeating Alzheimer’s disease and other dementias: a priority for European science and society. *Lancet Neurol* 15, 455–532
- Wisniewski T, Golabek A, Matsubara E, Ghiso J und Frangione B (1993): Apolipoprotein E: Binding to Soluble Alzheimer’s  $\beta$ -Amyloid. *Biochem Biophys Res Commun* 192, 359–365
- Yankner BA, Duffy LK und Kirschner DA (1990): Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250, 279–282
- Zetterberg H, Blennow K und Hansson E (2010): Amyloid  $\beta$  and APP as biomarkers for Alzheimer’s disease. *Exp Gerontol* 45, 23–29

# Danksagung

Ich danke Professor Jens Wiltfang für die freundliche Aufnahme in die Abteilung, das interessante Thema und die Annahme meiner Doktorarbeit. Ich danke Professor Inga Zerr für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonderer Dank gilt Dr. Hans Klafki für die gute Zusammenarbeit, die herausragende fachliche Unterstützung, die sehr intensive Betreuung und seinen großen Einsatz.

Ich danke Petra Rieper, die mich außergewöhnlich engagiert und gründlich in die Labortechniken eingearbeitet und begleitet hat, für eine bereichernde Arbeit in stets sehr angenehmer Atmosphäre.

Dank geht an die Mitarbeiter Anke Jahn-Brodmann, Dr. Hermann Esselmann und Professor Oliver Wirths. Ich danke Dr. Fabian Kück von der Wissenschaftlichen Serviceeinheit „Medizinische Biometrie und statistische Bioinformatik“ für die ausführliche statistische Beratung, sein Verständnis und seine Geduld.