

Fakultät für Medizin, Technische Universität München  
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Klinikum  
rechts der Isar  
(Prof. Dr. Johann Förstl)

# Clearance-Mechanismen von Amyloid- $\beta$ bei der Alzheimer-Krankheit

Oliver Goldhardt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin, der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten  
Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst. J. Rummeny

Prüfende/-r der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Timo Grimmer
2. Prof. Dr. Johann Förstl

Die Dissertation wurde am 01.07.2019 bei der Technischen Universität München

eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.12.2019 angenommen.

Dissertation

# **Clearance-Mechanismen von Amyloid- $\beta$ bei der Alzheimer-Krankheit**

Oliver Goldhardt

Fakultät für Medizin, Technische Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
(Univ.-Prof. Dr. med. Johann Förstl)

Mai 2019

## Dank an alle Motivatoren

PD Dr. med. Timo Grimmer  
Maria Luz Aliaga Márquez  
Emma Goldhardt  
Hanni und Hans-Henning Goldhardt

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>6</b>
1.1	Demenz.....	6
1.1.1	Daten zu Prävalenz und Inzidenz.....	6
1.1.2	Klinischer Verlauf und Diagnose der Alzheimer-Krankheit.....	7
1.2	Pathologie und Ursachen der Alzheimer-Krankheit.....	7
1.2.1	$\beta$ -Amyloid-Hypothese und neuronale Schädigung.....	8
1.2.2	Biomarker der Alzheimer-Krankheit.....	8
1.2.3	Ursachen der $\beta$ -Amyloid-Ablagerung.....	10
1.2.4	Abtransport und Abbaumechanismen von $\beta$ -Amyloid (Begriffsklärung " $\beta$ -Amyloid-Clearance").....	11
1.2.5	ApoE - Modulator der A $\beta$ -Akkumulation.....	12
1.3	Beispiele von Clearance-Mechanismen bei der Alzheimer-Krankheit.....	13
1.3.1	Abtransport über die Blut-Hirn-Schranke am Beispiel Low Density Lipoprotein-Related Protein 1 (LRP-1).....	13
1.3.2	$\beta$ -Amyloid-Clearance durch Proteasen am Beispiel Neprilysin (NEP).....	15
<b>2</b>	<b>Patientenkollektiv und Methoden.....</b>	<b>17</b>
2.1	Patientenkollektiv.....	17
2.2	Zerebrale Bildgebung.....	19
2.3	Zerebrale Amyloidangiopathie.....	20
2.4	t-Tau und A $\beta$ 42 im Liquor cerebrospinalis.....	20
2.5	Genetik ApoE.....	21
2.6	LRP-1 C667T Polymorphismus-Bestimmung.....	21
2.7	Neprilysinaktivität im Liquor cerebrospinalis (CSF-NEP).....	21
<b>3</b>	<b>Statistische Analysen.....</b>	<b>22</b>
3.1	LRP-1.....	22
3.1.1	C667T-Polymorphismus und globales [ $^{11}\text{C}$ ]PiB-PET-Signal.....	22
3.1.2	C667T-Polymorphismus und globales [ $^{11}\text{C}$ ]PiB-PET-Signal und weitere unabhängige Variablen.....	23
3.1.3	C667T-Polymorphismus und regionale Unterschiede im [ $^{11}\text{C}$ ]PiB-PET-Signal.....	23
3.1.4	C667T-Polymorphismus und ApoE-Genotyp.....	24
3.1.5	C667T-Polymorphismus und zusätzliche Analysen.....	24
3.2	CSF-NEP.....	24
3.2.1	CSF-NEP und [ $^{11}\text{C}$ ]PiB-PET-Signal.....	25
3.2.2	CSF-NEP-Aktivität und die Amyloid-Konzentrationen im Liquor.....	26
3.2.3	CSF-NEP-Aktivität und [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET-Signal.....	26

3.2.4	CSF-NEP-Aktivität und die Tau-Konzentrationen im Liquor.....	26
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
4.1	Patientenkollektiv und Ergebnisse zur C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit .....	27
4.1.1	Globales [ <sup>11</sup> C]PiB-PET-Signal und C667T-Polymorphismus .....	27
4.1.2	Globales [ <sup>11</sup> C]PiB-PET-Signal und C667T-Polymorphismus und weitere unabhängige Variablen	28
4.1.3	C667T-Polymorphismus und regionale Unterschiede im [ <sup>11</sup> C]PiB-PET-Signal.....	28
4.1.4	C667T-Polymorphismus und ApoE-Genotyp .....	31
4.1.5	C667-Polymorphismus und zusätzliche Analysen .....	31
4.2	Patientenkollektiv und Ergebnisse zur CSF-NEP-Aktivität .....	33
4.2.1	CSF-NEP-Aktivität und Amyloid-PET .....	34
4.2.2	CSF-NEP-Aktivität und A $\beta$ 42 im Liquor.....	34
4.2.3	CSF-NEP-Aktivität und das [ <sup>18</sup> F]FDG-PET.....	37
4.2.4	CSF-NEP-Aktivität und die Konzentration des Tau-Proteins im Liquor .....	39
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>39</b>
5.1	Diskussion zum LRP1 C667-Polymorphismus .....	39
5.1.1	Regionale Variabilität.....	41
5.1.2	Limitation der Studienergebnisse .....	42
5.2	Diskussion zu CSF-NEP .....	43
5.2.1	Nepriylisin und Amyloid im Liquor .....	43
5.2.2	Nepriylisin und zerebrale Amyloidablagerung.....	45
5.2.3	Nepriylisin und neuronaler Zelluntergang .....	46
5.2.4	Nepriylisin und das Tau-Protein .....	46
5.2.5	Nepriylisin und das [ <sup>18</sup> F]FDG -PET .....	46
5.2.6	Limitation der Studienergebnisse .....	47
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>Finanzieller Interessenkonflikt.....</b>	<b>48</b>
<b>8</b>	<b>Vorveröffentlichungen.....</b>	<b>48</b>
<b>9</b>	<b>Bibliografie.....</b>	<b>49</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Demenz

### 1.1.1 Daten zu Prävalenz und Inzidenz

Das Syndrom der Demenz ist durch chronische, kortikale und/ oder subkortikale Funktionsstörungen und einer dadurch bedingten Alltagsbeeinträchtigung charakterisiert. Patienten mit Demenz benötigen einen hohen Betreuungsaufwand. Krankheitsspezifische Nettokosten liegen schweregradabhängig zwischen 15.000 - 42.000 € pro Jahr und Patient, belasten Kranken- und Pflegesysteme und drohen das Sozialsystem insgesamt zu überfordern (Leicht et al., 2011). Eine ansteigende Belastung entsteht durch die geburtenreichen Jahrgänge der Nachkriegsgenerationen, die zunehmend ein Lebensalter mit höherer Demenzinzidenz erreichen (Ziegler and Doblhammer, 2009). Nach Schätzungen anhand von Bevölkerungszahlen des Statistischen Bundesamtes belief sich die Punktprävalenz in Deutschland Ende 2016 auf über 1,62 Millionen an Demenz erkrankten Einwohnern (Bickel, 2018). Nach Stichprobendaten von Versicherten der gesetzlichen Krankenkassen in Deutschland waren es im Jahr 2002 noch 1,07 Millionen Menschen, die an einer Demenz erkrankt waren (Ziegler and Doblhammer, 2009). Die jährliche Jahresinzidenzrate für alle Formen der Demenz lag Ende 2016 in Deutschland bei ca. 316.900 neuen Fällen im Jahr (Bickel, 2018). In 50-70% der Fälle liegt als häufigste Ursache eine Alzheimer-Krankheit zu Grunde (Qiu et al., 2007). Für die Alzheimer-Krankheit existiert bisher keine kausale Therapie und auslösende Faktoren sind bislang nicht hinreichend erforscht. Die prognostischen Aussagen der Frühdiagnostik sind unsicher. Ein besseres Verständnis der Pathophysiologie einhergehend mit spezifischen Biomarkern ist nötig, um neue Therapieansätze zu entwickeln oder diese früh genug am Menschen anzuwenden.

### **1.1.2 Klinischer Verlauf und Diagnose der Alzheimer-Krankheit**

Die Alzheimer-Krankheit durchläuft verschiedene konsekutive, klinisch voneinander abgrenzbare Phasen. Einer langjährigen asymptotischen Phase folgt das Stadium der subtilen bzw. subjektiven kognitiven Störung, in dem erste kognitive Defizite vom Patienten wahrgenommen und eine Verschlechterung in Verlaufstestungen dokumentiert werden kann, ohne dass sich diese durch abnorme Ergebnisse in etablierten neuropsychologischen Tests objektivieren lassen (Sperling et al., 2011). Im darauf folgendem Stadium der leichten kognitiven Störung bestehen testobjektivierbare kognitive Defizite, die aber nicht mit einer Alltagsbeeinträchtigung einhergehen (Albert et al., 2011). Im letzten Stadium, dem der Demenz, sind kognitive Defizite deutlich beeinträchtigend und Unterstützung durch die Mitmenschen bei Alltagsaktivitäten ist notwendig (McKhann et al., 1984, 2011).

Bei der Diagnostik einer Alzheimer-Demenz wird zwischen einem frühen Erkrankungsbeginn (vor dem 65. Lebensjahr) und einem späten Erkrankungsbeginn (ab dem 65. Lebensjahr) unterschieden. Die seltenen monogenetisch vererbte Ursachen führen häufig zu einem frühen Erkrankungsbeginn (Jefferies and Agrawal, 2009). Zudem wirkt sich ein Erkrankungsbeginn in jüngeren Lebensjahren meist schwerwiegender aus, da die Patienten häufiger noch erwerbstätig sind oder wichtige soziale Rollen in ihrem jeweiligen Umfeld einnehmen (Jefferies and Agrawal, 2009). Bei späterem Erkrankungsbeginn findet sich vermehrt vaskuläre Co-Pathologie (Ortner et al., 2015) und die kognitiven Defizite werden relativ spät als alltagseinschränkend wahrgenommen (Jefferies and Agrawal, 2009).

## **1.2 Pathologie und Ursachen der Alzheimer-Krankheit**

Die charakteristische Histopathologie der Alzheimer-Krankheit (AK) ist durch senile Plaques und neurofibrilläre Bündel in der grauen Substanz sowie von degenerativ veränderten Neuronen mit zurückgebildeten Synapsen gekennzeichnet (Braak and Braak, 1991; Thal et al., 2002a). Die

neurofibrillären Bündel bestehen hauptsächlich aus hyperphosphorylierten, ursprünglich mikrotubuliassoziierten Tau-Protein. Der Hauptbestandteil der senilen Plaques ist das Peptid  $\beta$ -Amyloid ( $A\beta$ ) (Serrano-Pozo et al., 2011).

### **1.2.1 $\beta$ -Amyloid-Hypothese und neuronale Schädigung**

Die physiologische Funktion von  $A\beta$  ist weitgehend ungeklärt.  $A\beta$  wird durch die Beta-Sekretase (BACE) und die Gamma-Sekretase aus dem N-terminalen extrazellulären Amyloid-Precursor-Protein (APP) proteolytisch herausgeschnitten (Randall et al., 2010). APP vermittelt als großes Transmembranmolekül zahlreiche Signalwege in und außerhalb der Zelle (Reinhard et al., 2005). Der hauptsächliche Umsatz von APP erfolgt jedoch über einen nicht-amyloidergen Weg über die Alpha-Sekretase (90%) (Randall et al., 2010).

Für  $A\beta$  sind allosterische Effekte auf die Butyrylcholinesterase bekannt (Kumar et al., 2016) und antimikrobielle Effekte werden diskutiert (Kagan et al., 2012).  $A\beta$  vermittelt allerdings vor allem in seiner allgemein als toxisch geltenden oligomeren Form Effekte auf zelluläre Prozesse der Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression. Die Konzentration von  $A\beta$  korreliert positiv mit kognitiven Defiziten (Lesne, 2014).

Auch führt eine erhöhte  $A\beta$  Konzentration bei Mäusen mit transgenen APP auf Zellnetzwerkebene zu einer Hyperaktivität des Hippocampus und folglich auch zur Desynchronisation globaler Ruhe-Netzwerke (Busche et al., 2012). Desynchronisierte Netzwerke konnten auch beim Menschen in Abhängigkeit von der Menge und Lokalisation der Amyloidpathologie gezeigt werden (Pasquini et al., 2014).

### **1.2.2 Biomarker der Alzheimer-Krankheit**

Die etablierten Biomarker der Alzheimer-Krankheit lassen sich in drei Gruppen einteilen: Biomarker für Amyloidpathologie, Biomarker für pathologische Tauveränderungen und Biomarker für neuronale

Schädigung (Jack et al., 2018). Eine weitere Unterteilung kann in kumulierende Biomarker sowie in Biomarker für Krankheitsaktivität vorgenommen werden (Kang et al., 2015). Die Krankheitsaktivität kann durch die Amyloid- (CSF-A $\beta$ ) und die Taukonzentration im Liquor cerebrospinalis (CSF-Tau) dargestellt werden. Erniedrigte A $\beta$ -Spiegel stehen mit der Zunahme der Amyloidablagerungen im Gehirn in Zusammenhang. Die Taukonzentration im Extrazellulärraum bzw. in der Folge im Nervenwasser korreliert mit dem Grad der neuronalen Schädigung (Vos et al., 2013). Phosphoryliertes Tau-Protein hingegen ist eher spezifisch für die Alzheimer-Pathologie, da sich Hyperphosphorylierung an Epitopen nachweisen lassen, die physiologisch nicht stattfinden (Šimić et al., 2016).

Die Menge der zerebralen Amyloidablagerung kann durch die Positronenemissionstomografie (PET) mithilfe von Radiopharmaka wie [ $^{11}\text{C}$ ]PiB (Pittsburgh compound B) oder [ $^{18}\text{F}$ ] PET-Tracer wie Florbetaben, Flutemetamol und Florbetapir in vivo dargestellt werden (Grimmer et al., 2010; Morris et al., 2016; Villemagne et al., 2011). Amyloidablagerungen beginnen typischerweise im Neocortex, in der Folge in den Allocortices und finden sich schließlich auch in subkortikalen Arealen wie dem Striatum und dem basalen Vorderhirn (Thal et al., 2002a).

Die akkumulierte neuronale Schädigung lässt sich frühzeitig indirekt als verminderter zerebraler Glukosemetabolismus im PET mithilfe des Radiopharmakons [ $^{18}\text{F}$ ]FDG (Fluorodesoxyglukose) darstellen (Jagust et al., 2007a). Typische hypometabole Areale finden sich im posterioren Cingulum und in den lateralen und mesialen Temporalkortizes (Minoshima et al., 1997). Ein eher später positiv werdender Biomarker ist die Messung der typischen hippocampalen und hochparietalen Atrophie in der kranialen strukturellen Kernspintomographie (Jack, 2011). Heutzutage kann auch die zerebrale Taupathologie in vivo per PET-Radiopharmakon (z. B. [ $^{18}\text{F}$ ]AV-1451 oder [ $^{18}\text{F}$ ]MK-6240 (Saint-Aubert et al., 2017)) dargestellt werden (Weiner et al., 2017). *Tabelle 1* gibt einen Überblick der verschiedenen Biomarkerkategorien bei der Alzheimer-Krankheit.

	Amyloidpathologie	Taupathologie	Neuronaler Schaden
Kumulierend	Aβ PET	Tau PET	FDG PET cMRT
„Krankheitsaktivität“	Aβ CSF	p-Tau CSF	Tau CSF

1

*Tabelle 1:* Übersicht über die verschiedenen etablierten Biomarker der Alzheimer-Krankheit

Aβ-CSF: Amyloid-β-Protein-Konzentration im Liquor cerebrospinalis, Aβ-PET: Amyloid darstellende Positronenemissionstomografie, [<sup>18</sup>F]FDG-PET: Stoffwechsel darstellende Positronenemissionstomografie mit Fluorodesoxyglukose, pTau: phospho-Tau-Protein, CSF: cerebrospinal fluid [engl.: Liquor cerebrospinalis], cMRT: kraniale Kernspintomografie. Das Tau-PET ist dunkler dargestellt, da seine klinische Wertigkeit noch grundlegend geprüft werden muss.

### 1.2.3 Ursachen der β-Amyloid-Ablagerung

In den seltenen Formen der familiären Alzheimer-Krankheit führt eine Überproduktion von Aβ zur Bildung der kortikalen Alzheimer-Pathologie mit zumeist frühem Symptombeginn vor dem 65. Lebensjahr (Hardy and Selkoe, 2002). Die exakten Mechanismen bei der Entstehung der sporadischen Alzheimer-Krankheit mit spätem Beginn sind im Detail auch aus Gründen einer angenommen komplexen und multifaktoriellen Genese nicht vollkommen verstanden (Duyckaerts et al., 2009). Die Hypothese, dass ein System von verschiedenen anti-amyloidergen Mechanismen einer zerebralen Aβ-Akkumulation entgegen wirkt und bei der Alzheimer-Demenz dekompenziert ist, ist

mittlerweile durch ausreichend Evidenz untermauert (Tarasoff-Conway et al., 2015). Hierfür spricht auch, dass Patienten mit Alzheimer-Demenz im Vergleich zu kognitiv gesunden Vergleichspersonen keine erhöhte A $\beta$ -Produktionsrate haben (Mawuenyega et al., 2010).

#### **1.2.4 Abtransport und Abbaumechanismen von $\beta$ -Amyloid (Begriffsklärung " $\beta$ -Amyloid-Clearance")**

Aus Tierstudien ist bekannt, dass Moleküle wie das A $\beta$ , die sich im interstitiellen Raum befinden, über verschiedene Wege aus dem Gehirn entfernt werden (Tarasoff-Conway et al., 2015). Der oft verwendete Begriff "Clearance" steht in diesem Zusammenhang für die Klärungs- oder Entgiftungsleistung des Gehirns, also die Fähigkeit sich von spezifischen toxischen Substanzen zu befreien. Die A $\beta$ -Clearance bezieht sich somit auf die Eliminierung von A $\beta$  aus dem Gehirn.

A $\beta$  wird von Neuronen und Zellen der endovaskulären Einheit internalisiert (Kandimalla et al., 2009) oder über die Blut-Hirn-Schranke transportiert (Shibata et al., 2000). Die kürzliche Entdeckung eines meningealen Lymphsystems weist auf einen weiteren Clearance-Mechanismus hin (Louveau et al., 2015). Während es so scheint, dass Metaboliten der interstitiellen Flüssigkeit der weißen Substanz vorwiegend in den Liquor drainiert werden, so deutet einiges darauf hin, dass Metaboliten aus der kortikalen grauen Substanz über perivaskuläre Räume entlang zerebraler kleiner Arterien und Arteriolen abfließen und schließlich in das Lymphsystem münden (Carare et al., 2008; Szentistvanyi et al., 1984; Weller, 1998; Zhang et al., 1992). Periventrikuläre mikroangiopathische Veränderungen (gestaute interstitielle Flüssigkeit), die sich in der T2 FLAIR Sequenz im kranialen MRT als Hyperintensitäten in der weißen Substanz darstellen, führen zu einer Störung der perivaskulären Clearance und in der Folge zu einer erhöhten zerebralen Akkumulation von A $\beta$  (Grimmer et al., 2012; Pantoni, 2010). Des Weiteren wird A $\beta$  im Gehirn mithilfe von Proteasen wie Nepriylisin (NEP) (Iwata et al., 2000) oder Insulin-degrading enzyme (IDE) (Miners et al., 2008a) extra- und intrazellulär abgebaut.

### 1.2.5 ApoE - Modulator der A $\beta$ -Akkumulation

Das Apolipoprotein E (ApoE) ist am Lipidtransport im ganzen Körper beteiligt und bindet als Ligand an Rezeptoren der Low-Density-Lipoprotein-Familie (LDL-RF), zu der auch der Rezeptor Low-Density-Lipoprotein Related Protein 1 (LRP1) gehört. Im Gehirn ist ApoE hauptsächlich über den Cholesterintransport an der neuronalen Plastizität, der Langzeitpotenzierung, dem Wachstum von Neuriten und Axonen sowie an der Synaptogenese beteiligt (Hauser et al., 2011). ApoE wird im Gehirn eigenständig und vorwiegend von Astrozyten produziert, ein Austausch mit dem Blutplasma findet aufgrund der Blut-Hirn-Schranke kaum statt (Hauser et al., 2011). Das Apolipoprotein E Epsilon 4 Allel (APOE  $\epsilon$ 4) hat Einfluss auf die Bindungsaffinität von ApoE an die LDL-Rezeptorfamilie und beeinflusst dadurch den Cholesterintransport durch ApoE im Gehirn (Mahley, 2016). Das  $\epsilon$ 4-Allel steht zudem mit einer höheren Anfälligkeit für neurodegenerative Prozesse im Zusammenhang (Hauser et al., 2011). Die numerische Häufigkeit des  $\epsilon$ 4-Allels des Apolipoprotein E (APOE) hat auch Einfluss auf die Progression der A $\beta$ -Akkumulation im Gehirn bei Menschen mit Alzheimer-Krankheit (Grimmer et al., 2010). Beim ApoE  $\epsilon$ 4 Genotyp wird der Komplex aus A $\beta$  und ApoE vorwiegend über einen anderen, langsameren Clearance-Mechanismus des Very Low Density Lipoprotein Receptor (VLDLR) über die Blut-Hirn-Schranke transportiert und führt so eher zu A $\beta$ -Ablagerungen (Deane et al., 2008). Sich an der vaskulären Einheit ablagernde A $\beta$ -APOE-Komplexe können als Unterform einer zerebralen Amyloidangiopathie (CAA) bei  $\epsilon$ 4-Allel-Trägern mit der Alzheimer-Krankheit gefunden werden (Thal et al., 2010). Des Weiteren hat der ApoE-Genotyp Einfluss auf die Bindungsaffinität von A $\beta$  an die Butyrylcholinesterase und beschleunigt dadurch den Acetylcholinabbau im synaptischen Spalt, was eine Erklärung für das cholinerge Defizit bei der Alzheimer-Krankheit sein könnte (Kumar et al., 2016). Die wichtigsten acetylcholinergen Projektionen in den Cortex gehen vom Nucleus basalis Meynert des basalen Vorderhirns aus, der eine relevante Rolle bei der Gedächtnisbildung spielt und früh bei der Alzheimer-Krankheit in seiner Funktion gestört ist (Liu et al., 2015).

## **1.3 Beispiele von Clearance-Mechanismen bei der Alzheimer-Krankheit**

A $\beta$  wird über verschiedene Wege aus dem Gehirn entfernt. Diese Arbeit fokussiert sich auf zwei Clearance-Mechanismen: den Transport von A $\beta$  über die Blut-Hirn-Schranke mittels des LRP1-Transporters sowie die Degradation durch die Protease Neprilysin (NEP). Ziel dieser Arbeit ist es, mit verschiedenen methodischen Ansätzen weitere Evidenz für die Theorie zu liefern, dass eine verminderte Amyloid-Clearance über unterschiedliche Mechanismen ursächlich für die Alzheimer-Krankheit ist.

### **1.3.1 Abtransport über die Blut-Hirn-Schranke am Beispiel Low Density Lipoprotein-Related Protein 1 (LRP-1)**

#### ***1.3.1.1 Hintergrund zu LRP-1***

Das multifunktionale Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP-1) ist ein 600 kDa transmembranes Glykoprotein des Typs I und das größte Mitglied der Low Density Lipoprotein-Rezeptorfamilie (Herz and Strickland, 2001; Van Leuven et al., 1994). LRP-1 wird im Gehirn unter anderem von Neuronen, Gliazellen und fast allen Zellen der neurovaskulären Einheit exprimiert, die im Verbund vor allem durch Tight-Junctions der vaskulären Endothelzellen die Blut-Hirn-Schranke bilden (Kanekiyo and Bu, 2014; Ramanathan et al., 2015; Sagare et al., 2012; Zlokovic et al., 2010). LRP-1 ist als Bestandteil des Cholesteroltransportsystems in transmembrane und nukleäre Signalkaskaden eingebunden (Herz and Strickland, 2001; Jaeger and Pietrzik, 2008). LRP1 bindet über 40 verschiedene Liganden, wie das ApoE,  $\alpha$ 2-Makroglobulin und A $\beta$  (Kanekiyo and Bu, 2014). LRP-1 bildet mit A $\beta$ -ApoE sowie A $\beta$  allein Komplexe (Fuentealba et al., 2010; Jaeger and Pietrzik, 2008) und vermittelt die Endozytose und Transzytose (Deane et al., 2008; Gylys et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass LRP-1 A $\beta$  sowie von ApoE gebundenes A $\beta$  in Abhängigkeit der LRP1-Expression über die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden, und es bei LRP1-Inhibition zu A $\beta$ -Ablagerungen kommt

(Shibata et al., 2000; Williams et al., 1992; Zlokovic et al., 2010). Physiologisch wird A $\beta$  intrazellulär verstoffwechselt und nicht in perivaskulären Räumen deponiert. Bei Menschen mit der Alzheimer-Krankheit können in den perivaskulären Räumen (Bereich zwischen Glia limitans und Perizyten der Adventitia), nahe der Basalmembran (Thal, 2009) sowie um kleine Arterien und Arteriolen (Weller, 1998) A $\beta$ /ApoE-Komplexe gefunden werden. Ein Befund, der mit einer gestörten perivaskulären Drainage von A $\beta$  vereinbar ist (Deane and Zlokovic, 2007).

Durch Proteasen von der Zellmembran abgetrenntes sLRP-1 (soluble LRP-1, *engl. löslich*) zirkuliert im Blutkreislauf und reduziert durch Komplexbildung zerebrales lösliches A $\beta$  im Fließgleichgewicht. Ebenso bewirkt LRP-1 in Leberzellen eine systemische A $\beta$ -Clearance (Deane et al., 2009; Pflanzner et al., 2011; Yamada et al., 2008; Zlokovic et al., 2010).

### **1.3.1.2 Der Polymorphismus C667T des LRP-1**

Studien, die den Zusammenhang zwischen der A $\beta$ -Pathologie und dem C667T Polymorphismus auf dem Exon 3 (rs1799986) des LRP-1-Gens auf dem Chromosom 12q13-q14 (welcher nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz des LRP-1-Proteins führt) untersuchten, ergaben widersprüchliche Ergebnisse (Beffert et al., 1999; Forero et al., 2006; Glaser et al., 2004; Hatanaka et al., 2000; Kamboh et al., 1998; Wang et al., 2017). In einer Kohortenstudie war das T-Allel des C667T-Polymorphismus C667T des LRP-1-Gens mit einem geringeren Risiko für das Entwickeln einer Alzheimer-Demenz verbunden, allerdings nur in ApoE  $\epsilon$ 4-Genträgern (Kamboh et al., 1998). Zudem hatten Patienten mit Alzheimer-Demenz mit dem T-Allel signifikant höhere LRP-1-Konzentrationen und ein späteres Erkrankungsalter (Kang et al., 2000).

### **1.3.1.3 Hypothesen zum Polymorphismus C667T des LRP-1**

Da LRP-1 in viele molekulare Mechanismen involviert ist, die die Pathogenese der Alzheimer-Krankheit durch Transzytose, Internalisierung, Prozessierung und Degradation von A $\beta$  beeinflussen könnten, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob der Polymorphismus C667T auf dem LRP-1-Gen das Ausmaß von zerebralen A $\beta$  in einer Kohorte von 72 Patienten mit klinisch diagnostizierter Alzheimer-Demenz beeinflusst. Da bekannt ist, dass der LRP-1-vermittelte Transport von A $\beta$  mit dem ApoE-Genotyp korreliert, wurde ebenso der Zusammenhang von LRP-1 und dem ApoE-Genotyp auf die zerebralen Amyloidablagerungen untersucht.

Ein signifikanter Zusammenhang würde auf den Einfluss des LRP1-Gens auf die Pathogenese der Alzheimer-Krankheit hindeuten. Da der Polymorphismus mit einer veränderten Konzentration des LRP-1-Proteins einhergeht, würde eine signifikante Korrelation zudem die Hypothese einer Amyloid-Clearance durch Transport von A $\beta$  durch LRP-1 stützen.

## **1.3.2 $\beta$ -Amyloid-Clearance durch Proteasen am Beispiel Nephilysin (NEP)**

### **1.3.2.1 Hintergrund zu NEP**

NEP ist ein integrales Membranprotein des Typs II, das vorwiegend an der Oberfläche von Neuronen an den präsynaptischen Endigungen der Fortsätze der Axone lokalisiert ist (Huang et al., 2006). NEP ist eine Zink-abhängige Endopeptidase, die vor allem monomere A $\beta$ -Peptide (Leissring et al., 2003) 1-40 (A $\beta$ 40) und 1-42 (A $\beta$ 42) in vivo schneidet (Howell et al., 1995; Nalivaeva et al., 2012; Shirotani et al., 2001). In transgenen Mäusen mit Überexpression von NEP und des APP kommt es im Vergleich zu hAPP/NEP-knock-out-Mäusen kaum zu einer Amyloidakkumulation (Leissring et al., 2003). Reduzierte Aktivität von NEP im Mäusegehirn steigert die Konzentration von oligomeren A $\beta$ -Komplexen an den

Synapsen und führt zu einer Störung der synaptischen Plastizität im Hippocampus, bevor es zur Bildung von A $\beta$ -Plaques kommt (Huang et al., 2006).

Die Konzentration von A $\beta$  und NEP im zerebralen Cortex des Menschen und der Maus sind invers korreliert (Akiyama et al., 2001; Eckman et al., 2006; Hellstrom-Lindahl et al., 2008; Maruyama et al., 2005; Wang et al., 2010). Die NEP-Konzentration und die NEP-Aktivität waren bei Menschen mit Alzheimer-Krankheit signifikant höher als bei kognitiv gesunden Kontrollpersonen und waren positiv signifikant mit den Braak-Stadien der Alzheimer-Krankheit korreliert, wenn man mit der Konzentration der Neuronenspezifischen Enolase (NSE) für das Ausmaß an Nervenzellschäden kontrollierte (Miners et al., 2009). Bei der Alzheimer-Krankheit konnte eine negative Korrelation von NEP mit dem Alter gefunden werden (Hellstrom-Lindahl et al., 2008; Miners et al., 2009). NEP kann auch im Liquor cerebrospinalis gemessen werden (Miners et al., 2008b). Es gelangt aus dem Gehirn in voller Länge in den Liquor (Maruyama et al., 2005). Versuche an Mäusen zeigten durch intrazerebrale Injektion mit neurotoxischer Kainsäure einen dosisabhängigen Anstieg der NEP- und Tau-Konzentration im Liquor, was den neuronalen Ursprung von NEP nachwies (Maruyama et al., 2005). Im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe war die NEP-Aktivität im Liquor bei Patienten im Stadium der leichten kognitiven Störung sowie im prodromalen Stadium der Alzheimer-Krankheit signifikant reduziert, aber in fortgeschrittenen Stadien erhöht und war indirekt proportional zu erreichten Punkten im Mini-Mental-Status-Test (MMST). Bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit im Stadium der Demenz wurde bisher kein signifikanter Zusammenhang zwischen der A $\beta$ -Konzentration und der NEP-Konzentration oder der NEP-Aktivität im Liquor gefunden (Maruyama et al., 2005; Sorensen et al., 2013). In einer gemischten Kohorte mit Menschen mit der Alzheimer-Krankheit im Stadium der Demenz und der leichten kognitiven Störung zeigte sich allerdings ein inverser Zusammenhang mit der NEP-Aktivität (Maruyama et al., 2005). In den zuvor genannten Studien war zudem die Konzentration an Tau-Protein positiv mit der von NEP im Liquor korreliert. Das liquorgängige Tau-Protein ist sowohl bei akutem neuronalen Zelluntergang (Avila et al., 2012) als

auch subakut nach zerebralen ischämischen Ereignissen oder traumatischen Hirnverletzungen erhöht (Ost et al., 2006). Ebenso finden sich erhöhte Tau-Spiegel bei langsamer kontinuierlich neuronaler Schädigung im Rahmen der Alzheimer-Krankheit (Bateman et al., 2012; Sperling and Johnson, 2013).

### **1.3.2.2 Hypothesen zu NEP**

Im folgenden Abschnitt der Arbeit wird sowohl der Zusammenhang zwischen der Aktivität von NEP im Liquor mit Biomarkern für Neurodegeneration als auch mit Biomarkern für die Amyloidpathologie, kontrolliert für Neurodegeneration, untersucht. Da davon ausgegangen wird, dass die NEP-Aktivität im Gehirn proportional zu der im Liquor ist, ist ein inverser Zusammenhang zwischen der NEP-Aktivität im Liquor und dem zerebralen Signal an A $\beta$ -Ablagerungen sowie der A $\beta$ -Konzentration im Liquor zu erwarten. Signifikante Korrelationen würden auf einen klinisch-bedeutsamen anti-amyloidergen Clearance-Mechanismus von Neprilysin hinweisen.

## **2 Patientenkollektiv und Methoden**

Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München und durch das Bundesamt für Strahlenschutz genehmigt. Alle Teilnehmer gaben schriftlich ihr informiertes Einverständnis.

### **2.1 Patientenkollektiv**

Die Patienten wurden in der Gedächtnisambulanz des Zentrums für kognitive Störungen an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München in München, Deutschland, rekrutiert (Grimmer et al., 2010). Sie wurden zur diagnostischen Beurteilung von kognitiven Defiziten durch allgemeinmedizinische, neurologische und

psychiatrische Fachärztinnen bzw. -ärzte sowie durch andere Einrichtungen an die Klinik überwiesen. Das diagnostische Vorgehen umfasste eine ausführliche Eigen- und Fremdanamnese, eine Medikamentenanamnese und eine neurologische und psychiatrische Untersuchung. Eine neuropsychologische Testung beinhaltete den Mini-Mental-Status Test (Folstein et al., 1975) und die neuropsychologische Testbatterie des Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's disease (CERAD-NAB) in deutscher Sprache. Ebenso wurden eine Routinelabor-Blutuntersuchung und die Bestimmung des ApoE-Genotyps durchgeführt. Der globale klinische Schweregrad wurde mit der Clinical Dementia Rating Scale (CDR) beurteilt (Morris et al., 1989) und die Summe der Unterkategorien (*engl.* sum of boxes, SOB) berechnet (CDR-SOB).

Es wurden nur Patienten mit leichter kognitiver Störung und leicht- bis mittelgradiger Demenz (CDR; globaler CDR-Wert von 0,5-2) eingeschlossen, die die Kriterien des National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease für die wahrscheinliche symptomatische Alzheimer-Krankheit erfüllten (Albert et al., 2011; McKhann et al., 2011). Um die Wahrscheinlichkeit für eine den kognitiven Defiziten zugrunde liegende Alzheimer-Pathologie zu erhöhen, wurden nur Patienten eingeschlossen, die einen Alzheimer-typischen Hypometabolismus im kranialen [<sup>18</sup>F]FDG-PET zeigten (Hoffman et al., 2000; Jagust et al., 2007b): in den temporo-parietalen Kortizes sowie im posterioren Cingulum mit relativer Aussparung des primär visuellen Cortex (Minoshima et al., 1995). Damit erfüllt die Kohorte ebenso die diagnostischen Kriterien der National Institute on Aging and the Alzheimer's Association (NIA-AA) für die wahrscheinliche Alzheimer-Demenz mit Evidenz für den pathophysiologischen Prozess (McKhann et al., 2011). Bei keinem der Patienten bestand die Verdachtsdiagnose oder eine bestätigte Diagnose für eine schwergradige lebenszeitlimitierende Erkrankung.

In einer Subgruppe wurde im diagnostischen Prozess eine Lumbalpunktion zum Ausschluss entzündlicher Erkrankungen und zur Bestimmung der Neurodegenerationsmarker durchgeführt. Von einer weiteren Subgruppe wurde Vollblut für genetische Untersuchungen gewonnen.

Die Subgruppen zur Bestimmung von NEP im Liquor und zur Genotypisierung des Polymorphismus C667T des LRP1-Gens überschneiden sich nur zum Teil. Grund hierfür ist die verschiedene Verfügbarkeit von Vollblut und Liquor in Abhängigkeit diagnostischer Prozeduren. Aus diesem Grund wurde auf einen direkten Vergleich beider Gruppen verzichtet. Die CSF-NEP-Aktivität und der untersuchte LRP1-Polymorphismus werden als unabhängig voneinander betrachtet.

## 2.2 Zerebrale Bildgebung

Im gesamten Patientenkollektiv wurde eine strukturelle Kernspintomografie, eine kraniale [<sup>18</sup>F]-Fluoro-Desoxy-Glukose Positronenemissionstomografie ([<sup>18</sup>F]FDG-PET) zur Messung des zerebralen Metabolismus und ein [<sup>11</sup>C]PiB-PET zur Erfassung der zerebralen Amyloidablagerungen nach Standardprotokollen durchgeführt (Grimmer et al., 2009a, 2009b, 2010). Mit Hilfe der kranialen Kernspintomografie (1,5 T Scanner, cMRT) wurden strukturelle Anomalien des zentralen Nervensystems (ZNS) ausgeschlossen. Die [<sup>11</sup>C]PiB-PET- und die [<sup>18</sup>F]FDG-PET-Bilddaten wurden mit hochaufgelösten cMRT-Aufnahmen koregistriert und auf den standardisierten Raumkoordinationen des Gehirns des Montreal Neurological Institute-Koordinatenraumes (MNI-Raum) mit den Verzerrungsparametern der individuellen cMRT-Daten normalisiert, um interindividuell vergleichbare Bilder zu erhalten. Als globales [<sup>11</sup>C]PiB-PET-Signal wurde bei jedem Patienten das Signal des Kortex durch das Signal des Kleinhirnvermis als globaler Cerebrum zu Vermis-Quotient (C/cv) aus den [<sup>11</sup>C]PiB-SUV 40-70 Minuten Aufnahmen berechnet, um für interindividuelle Unterschiede in der Aufnahme des [<sup>11</sup>C]PiB-Radiopharmakons zu kontrollieren (Grimmer et al., 2009a, 2009b, 2010). Das globale [<sup>18</sup>F]FDG-PET -Signal wurde durch den Quotienten von Cortex zu Thalamus (C/th-Quotient) aus [<sup>18</sup>F]FDG-SUV 30-50min-Aufnahmen berechnet (Ishii et al., 1998).

## 2.3 Zerebrale Amyloidangiopathie

Um die Wahrscheinlichkeit einer gleichzeitig bestehenden signifikanten zerebralen Amyloidangiopathie (CAA) zu reduzieren, wurden nur Patienten eingeschlossen, die keine Lakunen in der Fluid-attenuated inverse recovery (FLAIR)-Sequenz oder Mikroblutungen in der T2\*-Sequenz im kranialen MRT zeigten (Goos et al., 2010).

## 2.4 t-Tau und A $\beta$ 42 im Liquor cerebrospinalis

Die Verfahren zur Bestimmung von Markern der Neurodegeneration und Amyloidpathologie im Liquor (Tau und A $\beta$ ) entsprachen dem von Tsolakidou et al. (Tsolakidou et al., 2013) publizierten Vorgehen: Liquor wurde in sterilen Röhrchen aus Polypropylen (PP) mittels atraumatischer Punktionsnadeln gewonnen. Die Punktion wurde an den Wirbelkörperzwischenräumen 3/4 oder 4/5 durchgeführt. Der Liquor wurde unverzüglich nach Gewinnung bei 1800 g bei 4 °C für 10 Minuten zur Abtrennung von Zellbestandteilen zentrifugiert. Die Proben wurden anschließend bei -80 °C in PP-Eppendorfgefäßen bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Die Bestimmung der Konzentrationen von A $\beta$ 1-42 und Gesamt-Tau-Protein (tTau) (Innogenetics Ghent, Belgium) im Liquor wurde mittels kommerziell erhältlicher Enzyme Linked Immuno Sandwich Assays (ELISAs) nach Herstellerangaben durchgeführt. Verwendet für die ELISA-Reaktionsplattenbindung von A $\beta$ 1-42 wurde der monoklonale Antikörper 21F12 (Bindung an Aminosäure 33-42 C-terminal) und detektiert wurde n-terminal mittels biotinylierten Antikörper 3D6 (Johnson-Wood et al., 1997). Tau wurde mittels AT120 C-terminal ge-coated und mittels HT7 und BT2 N-terminal detektiert (Vandermeeren et al., 1993). In dieser Arbeit wurde Tau nur im Liquor cerebrospinalis bestimmt und alle folgenden Erwähnungen von Tau beziehen sich auf die Konzentration im Liquor cerebrospinalis.

## 2.5 Genetik ApoE

Die ApoE-Genotypisierung mit Bestimmung des APOE epsilon 4 Genotyp (APOE  $\epsilon$ 4) wurde bei allen Patienten durchgeführt (Zivelin et al., 1997).

## 2.6 LRP-1 C667T Polymorphismus-Bestimmung

Die Genotypen wurden mithilfe der TaqMan<sup>®</sup>-Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *eng. polymerase chain reaction*) mit einem Single-Nucleotid-Polymorphismus(SNP)-Analyse-Kit auf einem StepOne-Analysator mit der StepOne-Software v2.1 nach etablierten Methoden durchgeführt (Guo et al., 2012). Alle Analysekits, das Analysegerät und die Analysesoftware wurden von Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA hergestellt. Die Genotypisierung wurde in 96-well-Platten gemessen. Das endgültige Volumen betrug 20  $\mu$ l mit 20 ng genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNS), 10  $\mu$ l des TaqMan<sup>®</sup>-Mastermix und 1  $\mu$ l von 20xSNP Genotypisierungs-Analysemixtur. Das Ablesen der PCR-Platten erfolgte nach Erhitzung auf 95 °C für 10 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen mit Denaturierung bei 95 °C für je 15 Sekunden sowie Hybridisierung/Elongation bei 60 °C für jeweils eine Minute. Eine doppelte Bestimmung des Genotyps wurde für 12,5 % aller Proben (9 von 72) zur Qualitätskontrolle durchgeführt.

## 2.7 Neprilysinaktivität im Liquor cerebrospinalis (CSF-NEP)

Die NEP-Aktivität wurde nach veröffentlichten Methoden gemessen (Miners et al., 2008b). Ziegen-Antikörper gegen humanes NEP (1,6  $\mu$ g/ml) in PBS gelöst (pH 7,4) wurden auf Nunc maxi-sorp 96-well Platten gecoatet (Fische Scientific, Lough). Unspezifisches Bindungsverhalten wurde durch Hinzufügen einer 1 % PBS-BSA-Lösung verhindert. Nach dem Waschen der Platten wurde 100  $\mu$ l Liquor cerebrospinalis (gelöst in PBS mit pH 7,4) mit rekombinanten humanen NEP (R&D Systems Europe) in mehreren Verdünnungsreihen bei Raumtemperatur für 2 Stunden unter kontinuierlichem

Schütteln inkubiert. Nach wiederholten Waschdurchläufen wurde der selektive NEP-Inhibitor Thiorphan (200 nmol/l) (Sigma Aldrich) gelöst in 100 mmol/l Tris-HCl pH 7,5, 50 mmol/l NaCl, 10 Kmol/l ZnCl<sub>2</sub> oder nur gelöst in Puffer hinzugegeben und die Proben wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das fluoreszierende Peptid Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH (10 Kmol/l) (R&D Systems Europe) wurde in 100 mmol/l von Tris-HCl pH 7,5, 50 mmol/l NaCl und 10 Kmol/l gemischt, jedem Gefäß hinzugefügt und dann bei 37 °C drei Stunden lang im Dunkeln inkubiert. Fluoreszenz wurde durch eine Anregungswellenlänge von 320 nm ausgelöst und das emittierte Licht bei 405 nm gemessen. Jede Probe wurde doppelt in Anwesenheit und Abwesenheit des NEP-Inhibitors Thiorphan bestimmt. Die einzelnen NEP-Aktivitätswerte wurden durch Subtraktion der Floreszenzintensität ohne Thiorphan und mit Thiorphan bestimmt. Die NEP-Aktivität wurde anhand einer Standardkurve mit verschiedenen Verdünnungen des rekombinanten NEP mit vollständiger Aminosäuresequenz interpoliert. In dieser Arbeit wurde die NEP-Aktivität im Liquor cerebrospinalis bestimmt. Folgend bezieht sich NEP in dieser Arbeit immer auf die Aktivität im Liquor cerebrospinalis, außer wenn explizit anders bezeichnet. Für Liquor cerebrospinalis wird die englische im Forschungsfeld etablierte Abkürzung CSF (*engl.*: cerebrospinal fluid) verwendet.

### **3 Statistische Analysen**

#### **3.1 LRP-1**

##### **3.1.1 C667T-Polymorphismus und globales [<sup>11</sup>C]PiB-PET-Signal**

Um zu bestimmen, ob der C667T-LRP-1-Genotyp mit den globalen Amyloidablagerungen korreliert ist, wurde eine Regressionsanalyse mit C/cv[<sup>11</sup>C]PiB-PET-Signal als abhängige Variable und der Häufigkeit der T-Allele des C667T-Polymorphismus als unabhängige Variable durchgeführt.

### **3.1.2 C667T-Polymorphismus und globales [<sup>11</sup>C]PiB-PET-Signal und weitere unabhängige Variablen**

Um mögliche Einflussgrößen auf den Zusammenhang zwischen der C667T LRP-1-T-Allelhäufigkeit und dem globalen [<sup>11</sup>C]PiB-PET-Signal zu finden, wurde zur linearen Regressionsanalyse mit dem C/cv[<sup>11</sup>C]PiB-PET-Signal als abhängige Variable und der C667T LRP-1-T-Allelhäufigkeit als unabhängige Variable stufenweise folgende unabhängige Variablen hinzugefügt: Alter bei [<sup>11</sup>C]PiB-PET, Geschlecht, ApoE-Genotyp und Ausbildungszeit. Variablen, die zu einem erhöhten korrigiertem R<sup>2</sup> des Modells führten, wurden in das Modell aufgenommen.

### **3.1.3 C667T-Polymorphismus und regionale Unterschiede im [<sup>11</sup>C]PiB-PET-Signal**

Um mögliche regional unterschiedliche Korrelationen des [<sup>11</sup>C]PiB-PET-Signals mit der C667-LRP-1-T-Allelhäufigkeit zu finden, wurde eine voxelbasierte Regressionsanalyse mit dem [<sup>11</sup>C]PiB-PET-Signal als abhängige Variable und der C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit als unabhängige Variable durchgeführt. In das Modell wurden wie bei 3.1.2 die gleichen unabhängigen Variablen aufgenommen. Für die Analyse wurde Statistical Parametric Mapping Version 8 (SPM8) verwendet (Friston et al., 1994). Zuvor wurden die räumlich normalisierten [<sup>11</sup>C]PiB-PET-Bilddatensätze quantitativ auf das Signal aus dem Kleinhirnvermis normalisiert und geglättet (Gauß-Kern von 10x10x10mm) (Grimmer et al., 2010). Für die voxelbasierte Regressionsanalyse wurde ein Signifikanzniveau für Punktwolken von 0,05 korrigiert für multiples Testen gewählt (family-wise error: FWE).

### **3.1.4 C667T-Polymorphismus und ApoE-Genotyp**

Um die Interaktion der C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit mit der ApoE- $\epsilon$ 4-Allelhäufigkeit zu testen, wurde zunächst eine Korrelationsanalyse zwischen beiden Variablen durchgeführt. Zudem wurde der Interaktionsterm C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit x ApoE- $\epsilon$ 4-Allelhäufigkeit in die bei 3.1.2 erwähnte Regressionsanalyse mit aufgenommen. Folgend wurden zwei lineare Regressionsanalysen nach dem Modell 3.1.2, stratifiziert nach ApoE- $\epsilon$ 4-Allelträgern und  $\epsilon$ 4-Nicht-Allelträgern, durchgeführt.

### **3.1.5 C667T-Polymorphismus und zusätzliche Analysen**

Um auszuschließen, dass die vorausgegangenen Analysen durch eine Stichprobenverzerrung beeinflusst sind, beispielsweise dadurch, dass sich Patienten mit einem T-Allel des C667T-LRP-1-Polymorphismus in einem fortgeschrittenem dementiellen Stadium der Alzheimer-Krankheit befinden, wurde eine Korrelationsanalyse zwischen der C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit mit dem klinischen Schweregrad (CDR-SOB) sowie mit dem Alter bei [ $^{11}$ C]PiB-PET durchgeführt.

## **3.2 CSF-NEP**

Um zu bestimmen, ob die CSF-NEP-Aktivität mit Biomarkern der Alzheimer-Krankheit korreliert ist, wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Dabei wurden Biomarker aus zwei Biomarkergruppen als unabhängige Kontrollvariablen eingesetzt. Dazu gehören zum einen Biomarker für die Amyloidpathologie (das globale und regionale [ $^{11}$ C]PiB-PET-Signal und die Konzentration von Amyloid 1-42 im Liquor) sowie Biomarker für die Neurodegeneration (CSF-Tau und das globale und regionale Signal im [ $^{18}$ F]FDG-PET). Um mögliche Einflüsse dieser Variablen auf den Zusammenhang

zwischen CSF-NEP und den Biomarkern der Alzheimer-Krankheit festzustellen, wurden jeder Regressionsanalyse die Parameter Alter, Geschlecht, Häufigkeit des ApoE  $\epsilon$ 4 Allels, CDR-SOB und MMST stufenweise hinzugefügt und Variablen, die die Effektstärke des Modells verbesserten, in die finale Analyse aufgenommen. In Analysen mit der abhängigen Variable Amyloidkonzentration im Liquor oder  $[^{11}\text{C}]\text{PiB-PET}$ -Signal wurden CSF-Tau bzw. der  $\text{C/th}[^{18}\text{F}]\text{FDG-PET}$ -Quotient als unabhängige Variablen aufgenommen, um den Effekt der Neurodegeneration auf CSF-NEP zu kontrollieren. Zudem wurde die Interaktion zwischen der Aktivität von CSF-NEP und dem Biomarker für Neurodegeneration (Tau-Protein oder  $[^{18}\text{F}]\text{FDG-PET}$ -Signal) mit einem Interaktionsterm kontrolliert, da frühere Studien bereits eine positive Korrelation zwischen CSF-NEP und diesen Neurodegenerationsparametern gezeigt hatten (Maruyama et al., 2005). Regionale voxelbasierte Regressionsanalysen wurden mit der Software Statistical Parametric Mapping der Version 8 (SPM8) durchgeführt (Friston et al., 1994). Vor Durchführung der Analysen wurden alle  $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ -Bildaten individuell auf den zerebellären Vermis ( $\text{C/v}[^{11}\text{C}]\text{PiB-PET}$ ) und alle  $[^{18}\text{F}]\text{FDG-PET}$ -Bildaten auf den Thalamus ( $\text{C/th}[^{18}\text{F}]\text{FDG-PET}$ ) normalisiert und dann iterativ nach Gaußverteilung geglättet (Gaussian kernel of  $10 \times 10 \times 10 \text{mm}$ ) (Grimmer et al., 2009b, 2009a, 2010; Waxman, 2009). Für die voxelbasierten Analysen wurde ein Gruppensignifikanzniveau von 0,05 festgesetzt, kontrolliert für multiple Vergleiche (FWE).

### **3.2.1 CSF-NEP und $[^{11}\text{C}]\text{PiB-PET}$ -Signal**

Um zu bestimmen, ob die CSF-NEP-Aktivität mit der globalen Amyloidmenge im Gehirn korreliert ist, wurde eine Regressionsanalyse mit  $\text{C/v}[^{11}\text{C}]\text{PiB-PET}$ -Signal als abhängige Variable und die CSF-NEP-Aktivität als unabhängige Variable durchgeführt.

### **3.2.2 CSF-NEP-Aktivität und die Amyloid-Konzentrationen im Liquor**

Um zu bestimmen, ob die NEP-Aktivität im CSF mit der Amyloid-Konzentration im CSF korreliert ist, wurde eine Regressionsanalyse mit der Amyloid-Konzentration als abhängiger Variable und mit der NEP-Aktivität als unabhängiger Variable durchgeführt.

### **3.2.3 CSF-NEP-Aktivität und [<sup>18</sup>F]FDG-PET-Signal**

Um zu bestimmen, ob die CSF-NEP-Aktivität mit dem globalen Glukosemetabolismus im Gehirn korreliert ist, wurde eine Regressionsanalyse mit dem C/th[<sup>18</sup>F]FDG-PET-Signal als abhängiger Variable und der CSF-NEP-Aktivität als unabhängiger Variable durchgeführt.

### **3.2.4 CSF-NEP-Aktivität und die Tau-Konzentrationen im Liquor**

Um zu bestimmen, ob die CSF-NEP-Aktivität mit CSF-Tau korreliert ist, wurde eine Regressionsanalyse mit CSF-Tau als abhängige Variable und der CSF-NEP-Aktivität als unabhängiger Variable durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patientenkollektiv und Ergebnisse zur C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit

Die klinischen Parameter, die C667T-Allelhäufigkeit und die C/cv<sup>[11C]</sup>PiB-PET-Signal-Quotienten der Patientenkohorte sind in Tabelle 1 einzusehen.

Tabelle 1: Patientencharakteristika der C667T-LRP-1-Genotyp-Stichprobe

<b>Demografische und klinische Daten</b>	
Anzahl	72
Männer : Frauen	42 : 30
C667T-LRP-1-Genotyp CC : CT : TT	57 : 14 : 1
ApoE-ε4-Allelhäufigkeit: 0 : 1 : 2	29 / 28 / 15
Alter bei PET in Jahren: Mittelwert ± SD (Spannweite)	69,2 ± 7,86 (50-84)
MMST: Mittelwert ± SD (Spannweite)	24,7 ± 3,77 (11-30)
CDR-SOB: Mittelwert ± SD (Spannweite)	3,34 ± 2,126 (0,5-10,0)
C/cv <sup>[11C]</sup> PiB-PET-Signal: Mittelwert ± SD (Spannweite)	1,77 ± 0,347 (1,0-2,4)

Legende zu Tabelle 1: ApoE-ε4: Apolipoprotein E epsilon 4; CDR-SOB: Clinical Dementia Rating Sum of Boxes; C/cv: Zerebrum im Verhältnis zum Vermiswurm; LRP-1: Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1; MMST: Mini-Mental Status Test; <sup>[11C]</sup>PiB: Pittsburgh Compound B; SD: Standardabweichung.

#### 4.1.1 Globales <sup>[11C]</sup>PiB-PET-Signal und C667T-Polymorphismus

Die Regressionsanalyse mit dem globalen C/cv<sup>[11C]</sup>PiB-PET-Signal als abhängige Variable und der C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit als unabhängiger Variable ergab ein statistisch signifikantes Modell

( $p=0,046$ ). Das korrigierte  $R^2$  betrug  $0,042$  und der standardisierte Koeffizient  $\beta$  der C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit betrug  $0,236$ . Dies bedeutet, dass die C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit signifikant und positiv mit erhöhten zerebralen Amyloidablagerungen in Patienten mit Alzheimer-Demenz korreliert war.

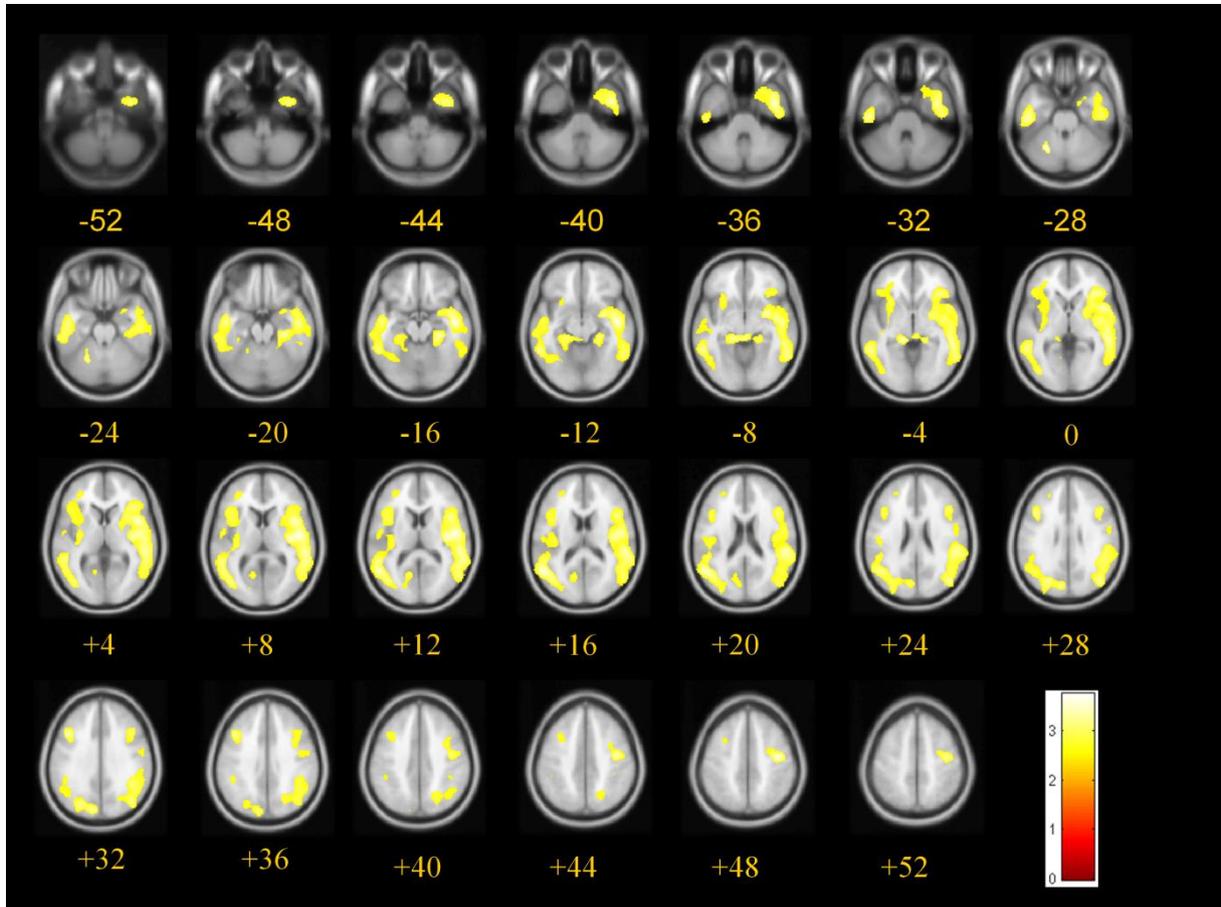
#### **4.1.2 Globales [ $^{11}\text{C}$ ]PiB-PET-Signal und C667T-Polymorphismus und weitere unabhängige Variablen**

In der Regressionsanalyse mit dem globalen C/cv[ $^{11}\text{C}$ ]PiB-PET-Signal als abhängiger Variable und der C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit als unabhängiger Variable wurden die Variablen ApoE- $\epsilon 4$ -Allelhäufigkeit und Geschlecht als weitere unabhängige Variablen aufgenommen. In diesem Modell war das korrigierte  $R^2=0,140$  mit einer statistischen Signifikanz von  $p=0,004$ . Der standardisierte Koeffizient  $\beta$  für die C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit war  $0,215$  ( $p=0,057$ ). Dies bedeutet, dass das Modell, kontrolliert für ApoE- $\epsilon 4$ -Allelhäufigkeit und Geschlecht,  $14,0\%$  der Variabilität eines erhöhten C/cv[ $^{11}\text{C}$ ]PiB-PET-Signals erklärte, und dass die C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit positiv, wenn auch nicht signifikant, mit zerebralen Amyloidablagerungen bei Patienten mit der Alzheimer-Krankheit korrelierte.

#### **4.1.3 C667T-Polymorphismus und regionale Unterschiede im [ $^{11}\text{C}$ ]PiB-PET-Signal**

Die voxelbasierte Regressionsanalyse mit dem [ $^{11}\text{C}$ ]PiB-PET-Signal als abhängige Variable und der C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit als unabhängiger Variable, kontrolliert für die ApoE- $\epsilon 4$ -Allelhäufigkeit und das Geschlecht, ist in Grafik 1 zu sehen. Positive Korrelationen fanden sich vorwiegend in temporo-parietalen kortikalen Arealen und in Regionen mit Nähe zur Hirnoberfläche. Ein Streudiagramm der stärksten lokalen Korrelation im rechten mittleren Gyrus temporalis kann in Grafik 2 eingesehen werden.

#### 4.1.3.1 Grafik 1: Regionale Korrelationen des C667T-Polymorphismus mit dem [<sup>11</sup>C]PiB-PET-Signal

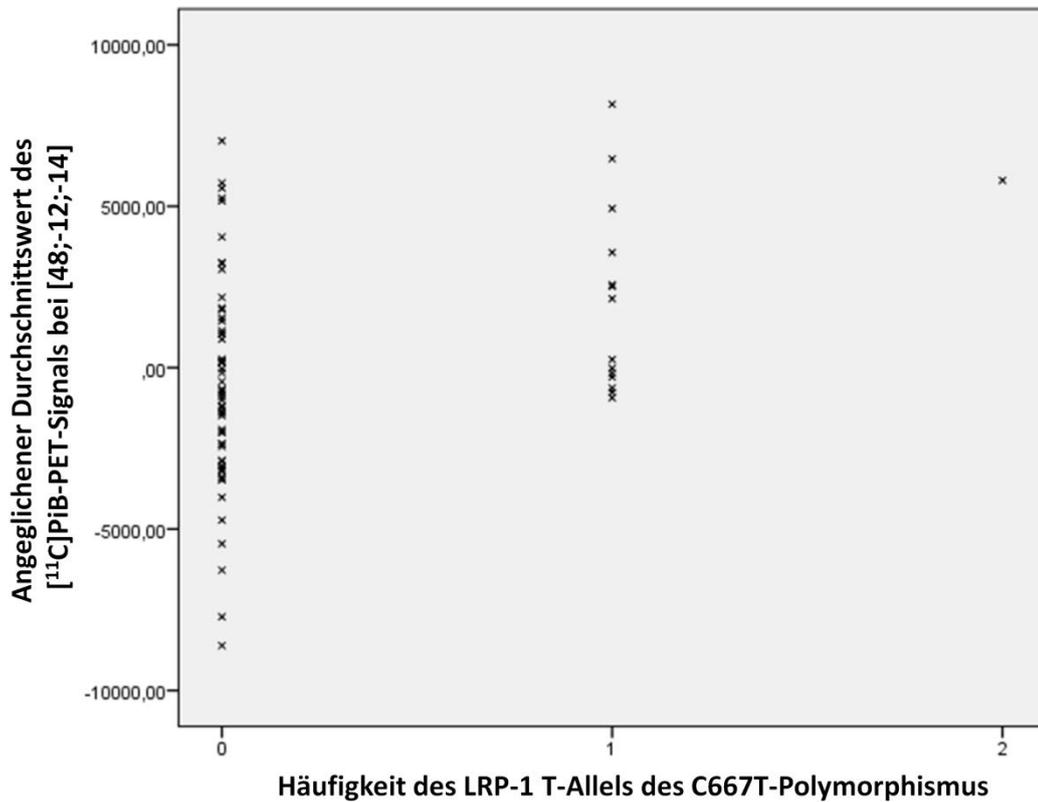


Legende zu Grafik 1: Voxelbasierte Regressionsanalyse zwischen dem C/cv[<sup>11</sup>C]PiB-PET-Signal und der C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit, kontrolliert für die ApoE-ε4-Allelhäufigkeit und Geschlecht.

Signifikante positive Zusammenhänge, korrigiert für multiple Vergleiche mithilfe des Family-wise-Fehlers, sind in gelb dargestellt und auf einen axialen T1-MRT-Bildatensatz anhand des Montreal Neurological Institute-Koordinatenraumes (MNI-Raum) projiziert (152 axiale Schnittebenen, durchgeführt mit SPM8). Die Zahlen stehen für Z-Koordinaten der Schnittbilder im MNI-

Koordinatensystem in mm. C667T-LRP-1: Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein C667T Polymorphismus; [<sup>11</sup>C]PiB: Pittsburgh compound B.

**4.1.3.2 Grafik 2: Streudiagramm zur voxelbasierten linearen Regressionsanalyse zwischen dem [<sup>11</sup>C]PiB-PET-Signal und den Variablen C667T-Polymorphismus, ApoE-Genotyp und Geschlecht**



Legende zu Grafik 2: Streudiagramm der voxelbasierten linearen Regressionsanalyse mit dem C/cv[<sup>11</sup>C]PiB-PET-Signal als abhängiger Variable und der C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit als unabhängiger Variable, kontrolliert für die ApoE-ε4-Allelhäufigkeit und Geschlecht, engste Korrelation bei x= 48, y= -12, z= -14 (Koordinaten im Talairach-Koordinatensystem). C667T-LRP-1: Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein C667T Polymorphismus; [<sup>11</sup>C]PiB: Pittsburgh compound B.

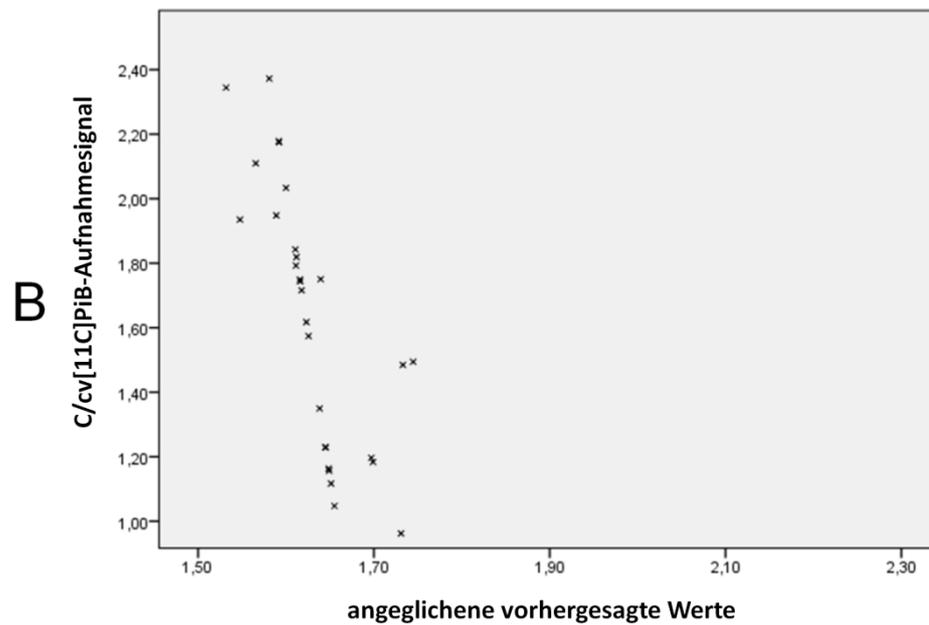
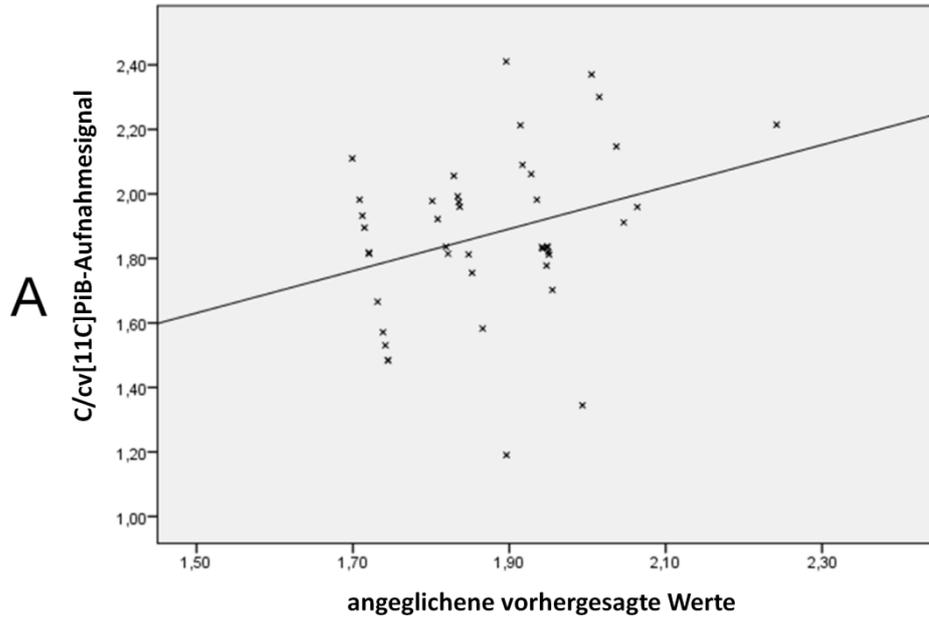
#### **4.1.4 C667T-Polymorphismus und ApoE-Genotyp**

Die Korrelationsanalyse zwischen der ApoE-ε4-Allelhäufigkeit und der C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit war statistisch nicht signifikant ( $p=0,470$ ). Ebenso erreichte der Koeffizient  $\beta$  der unabhängigen Variable C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit x ApoE-ε4-Allelhäufigkeit in der linearen Regressionsanalyse keine Signifikanz. Beide Ergebnisse zeigten gleichsinnig an, dass es keinen bedeutsamen Zusammenhang zwischen ApoE und dem LRP-1-Genotyp in dieser Kohorte gibt. In den Subgruppenanalysen von ApoE-ε4-Allelträgern und ApoE-ε4-Nicht-Allelträgern war das Regressionsmodell mit dem C/cv[<sup>11</sup>C]PiB-PET-Signal als abhängiger Variable und der C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit als unabhängiger Variable nur in der Subgruppe der ApoE-ε4-Allelträger signifikant ( $p=0,018$ , korrigiertes  $R^2=0,141$ , standardisierter Koeffizient  $\beta$  für die C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit =  $0,378$ ,  $p=0,013$ ), aber nicht in der Gruppe der ApoE-ε4-Nicht-Allelträger ( $p=0,794$ ). Streudiagramme der beiden Analysen sind in [Grafik 3](#) gezeigt.

#### **4.1.5 C667-Polymorphismus und zusätzliche Analysen**

Die Korrelationsanalysen des LRP-1-Genotyps mit der CDR-SOB oder mit dem Alter bei [<sup>11</sup>C]PiB-PET waren nicht signifikant ( $p=0,145$  und  $p=0,318$ ).

4.1.5.1 **Grafik 3: Streudiagramme der linearen Regressionsanalysen mit dem  $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ -PET-Signal mit dem C667T-Polymorphismus stratifiziert nach ApoE-Genotyp**



Legende zu Grafik 3: Streudiagramme der Subgruppenanalysen stratifiziert nach ApoE- $\epsilon$ 4-Allelträgern

und ApoE-ε4-Nicht-Allelträgern mit dem C/cv[<sup>11</sup>C]PiB-PET-Signal als abhängiger Variable und der C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit als unabhängiger Variable, kontrolliert für die ApoE-ε4-Allelhäufigkeit und Geschlecht. **A**) innerhalb der Gruppe von ApoE-ε4-Allelträgern: signifikantes Modell (p= 0,018), korrigiertes R<sup>2</sup>= 0,141, standardisierter Koeffizient β der C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit= 0,378 (p=0,013). **B**) innerhalb der Gruppe von ApoE-ε4-Nicht-Allelträgern: nicht-signifikantes Modell (p= 0,794), korrigiertes R<sup>2</sup>= -0,034.

## 4.2 Patientenkollektiv und Ergebnisse zur CSF-NEP-Aktivität

23 Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 65,5 Jahren bei Durchführung des Amyloid-PETs und durchschnittlich erreichten 24,0 Punkten im MMST wurden in die Analyse aufgenommen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Patientenkollektiv : CSF-NEP-Aktivität

<b>Demografische und klinische Daten</b>	
Anzahl	23
Männer : Frauen	12 : 11
ApoE-ε4-Allelhäufigkeit: 0 : 1 : 2	10 / 8 / 5
Alter bei PET: Mittelwert ± SD (Spannweite)	65,5 ± 8,10 (51-82)
MMST: Mittelwert ± SD (Spannweite)	24,0 ± 3,75 (14-30)
CDR SOB: Mittelwert ± SD (Spannweite)	3,65 ± 2,409 (0,5-11,0)
Nepriylsinaktivität im Liquor ng/ml ± SD (Spannweite)	17,9 ± 7,44 (4,8-34,7)
C/cv [ <sup>11</sup> C]PiB-PET-Signal: Mittelwert ± SD (Spannweite)	1,78 ± 0,285 (1,35-2,34)
C/th[ <sup>18</sup> F]FDG-PET -Signal: Mittelwert ± SD (Spannweite)	0,98 ± 0,109 (0,77-1,19)
Tau-Konzentration im Liquor ng/l ± SD (Spannweite)	648 ± 304,0 (229-1723)

Amyloid-Konzentration im Liquor ng/l $\pm$ SD (Spannweite)	517 $\pm$ 123,8 (346-850)
---	---------------------------

Legende zu Tabelle 2: ApoE  $\epsilon$ 4: Apolipoprotein E Epsilon 4, CDR-SOB: clinical dementia rating sum of boxes; C/cv: Cerebrum zu zerebellärer Vermis; C/th: Cerebrum zu Thalamus; MMST: Mini-Mental-Status-Test; [ $^{11}\text{C}$ ]PiB: Pittsburgh compound B; [ $^{18}\text{F}$ ]FDG: 2-desoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluoro-D-Glukose, SD: Standardabweichung.

#### 4.2.1 CSF-NEP-Aktivität und Amyloid-PET

Die lineare Regressionsanalyse mit dem C/cv[ $^{11}\text{C}$ ]PiB-Signal als abhängiger Variable und der CSF-NEP-Aktivität als unabhängiger Variable war statistisch nicht signifikant ( $p=0,916$ , korrigiertes R-Quadrat=  $-0,047$ ) und war ebenso nicht signifikant nach Aufnahme der Kontrollvariablen ApoE 4 Allelhäufigkeit, Geschlecht, Alter und der Variablen C/th[ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET-Signalaufnahme (korrigiertes  $R^2= -0,075$ ,  $p_{\text{Modell}}= 0,656$ ), als auch zusätzlich mit dem Interaktionsterm CSF-NEP-Aktivität x C/th[ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET-Signalaufnahme (korrigiertes  $R^2= -0,257$ ,  $p_{\text{Modell}}= 0,917$ ), bzw. CSF-Tau mit dem Interaktionsterm CSF-NEP-Aktivität x CSF-Tau (korrigiertes  $R^2= 0,018$ ,  $p_{\text{Modell}}= 0,420$ ). Somit war die CSF-NEP-Aktivität nicht mit dem globalen zerebralen Amyloid bei Menschen mit Alzheimer-Demenz korreliert.

In den voxelbasierten Analysen mit dem C/cv[ $^{11}\text{C}$ ]PiB-Signalaufnahme als abhängiger Variable und der CSF-NEP-Aktivität als unabhängiger Variable fand sich kein signifikanter Zusammenhang, auch nicht nach Kontrolle aller Einflussvariablen, die bereits in der globalen Analyse verwendet wurden.

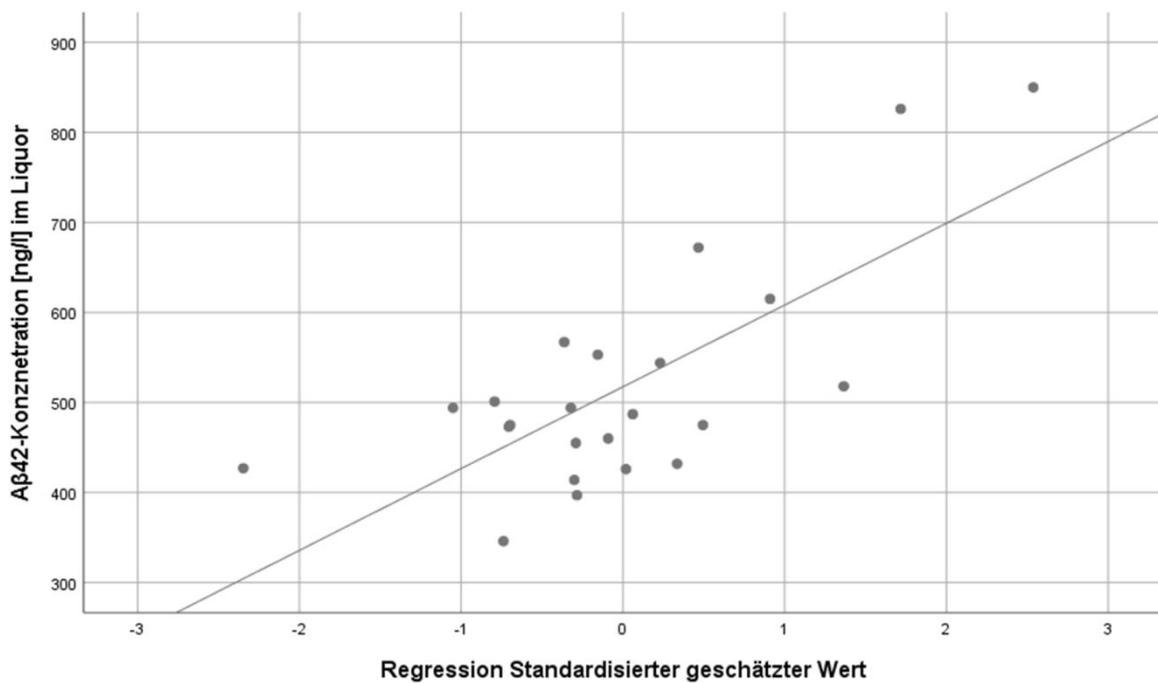
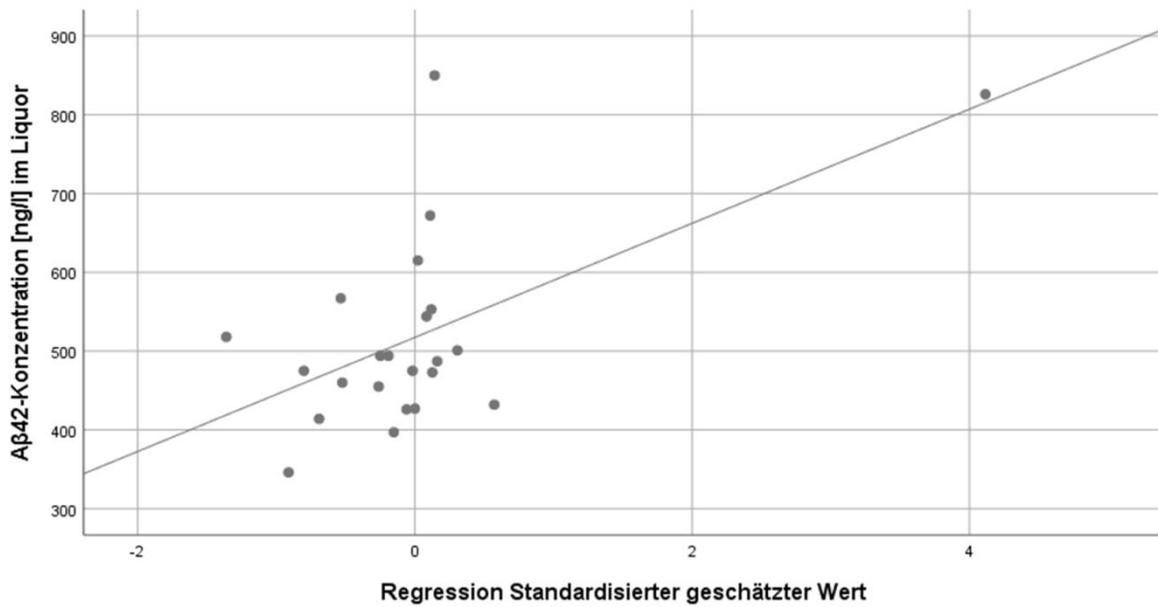
#### 4.2.2 CSF-NEP-Aktivität und A $\beta$ 42 im Liquor

Die lineare Regressionsanalyse mit A $\beta$ 42 im Liquor als abhängiger Variable und der CSF-NEP-Aktivität als unabhängiger Variable war nicht signifikant (korrigiertes R-Quadrat=  $-0,029$ ,  $p_{\text{Modell}}= 0,539$ ). Das

finale Modell beinhaltete die Kontrollvariablen Häufigkeit des ApoE  $\epsilon$ 4 Allel, Alter bei Lumbalpunktion, das C/th<sup>[18F]</sup>FDG-PET-Signal und den Interaktionsterm aus der Nephilysinaktivität mit dem C/th<sup>[18F]</sup>FDG-PET-Signal. Das Modell war statistisch signifikant (korrigiertes R-Quadrat= 0,403, p= 0,014). Die standardisierten Koeffizienten Beta ( $\beta$ ) für die Kontrollvariablen werden folgend mit dem jeweiligen p-Wert in Klammern angegeben: CSF-NEP-Aktivität ( $\beta$ = 7,289, p= 0,001), Häufigkeit des ApoE  $\epsilon$ 4 Allels ( $\beta$ = 0,225, p= 0,264), Alter ( $\beta$ = -0,247, p= 0,217), C/th<sup>[18F]</sup>FDG-PET-Aufnahmesignal ( $\beta$ = 2,181, p= 0,001) und der Interaktionsterm C/th<sup>[18F]</sup>FDG -PET-Aufnahmesignal x CSF-NEP-Aktivität ( $\beta$ = 6,684, p= 0,002). Die nicht-standardisierten Koeffizienten B waren 1,212, 34,990, -3,780, 2477,567 und -1,266 und die B-Konstante war -1613,922 (Grafik 4A). Die Analyse zeigte einen inversen Zusammenhang von CSF-A $\beta$ 42 mit der CSF-NEP-Aktivität bei Menschen mit Alzheimer-Demenz. Das Modell erklärte 40,3 % der Variabilität von CSF-A $\beta$ 42.

Mit dem gleichen methodischen Ansatz für die Kontrolle der Neurodegeneration wurden in der folgenden Analyse, statt der Variablen C/th<sup>[18F]</sup>FDG-PET-Signalaufnahme und des Interaktionsterms C/th<sup>[18F]</sup>FDG-PET-Signalaufnahme x CSF-NEP-Aktivität, die Variablen CSF-Tau und der Interaktionsterm der CSF-Tau x CSF-NEP-Aktivität eingesetzt. Das finale Modell enthielt die Kontrollvariablen ApoE  $\epsilon$ 4-Häufigkeit, CSF-NEP-Aktivität, CSF-Tau und den Interaktionsterm CSF-NEP-Aktivität x CSF-Tau. Auch dieses Modell war statistisch signifikant (p= 0,040, korrigiertes R<sup>2</sup>= 0,281). Die standardisierten Koeffizienten  $\beta$  waren für die ApoE  $\epsilon$ 4 Allelhäufigkeit ( $\beta$ = -0,270, p= 0,0162), die Nephilysinaktivität ( $\beta$  = -1,001, p= 0,032), für CSF-Tau ( $\beta$ = -0,528, p= 0,336) und für den Interaktionsterm der CSF-Tau x CSF-NEP-Aktivität ( $\beta$ = 1,678, p= 0,044). Die nichtstandardisierten B-Koeffizienten waren -42,080, -0,166, -0,215 und 0,000 und die Konstante des Koeffizient  $\beta$  war 769,377 (Grafik 4 B). Dies zeigt, dass die CSF-NEP-Aktivität bei Menschen mit Alzheimer-Demenz negativ mit der A $\beta$ 42-Konzentration im Liquor korreliert war und dass das Modell 28,1 % der Variabilität von A $\beta$ 42 im Liquor erklärte.

#### 4.2.2.1 Grafik 4



Legende zu Grafik 4: Streudiagramm der globalen Regressionsanalyse mit der Amyloidkonzentration im Liquor in ng/l als abhängiger Variable und (A) den unabhängigen Variablen Nephylisinaktivität im Liquor in ng/l, Signal der C/th<sup>18</sup>F]FDG -PET-Aufnahme, Interaktionsterm CSF-NEP-Aktivität x

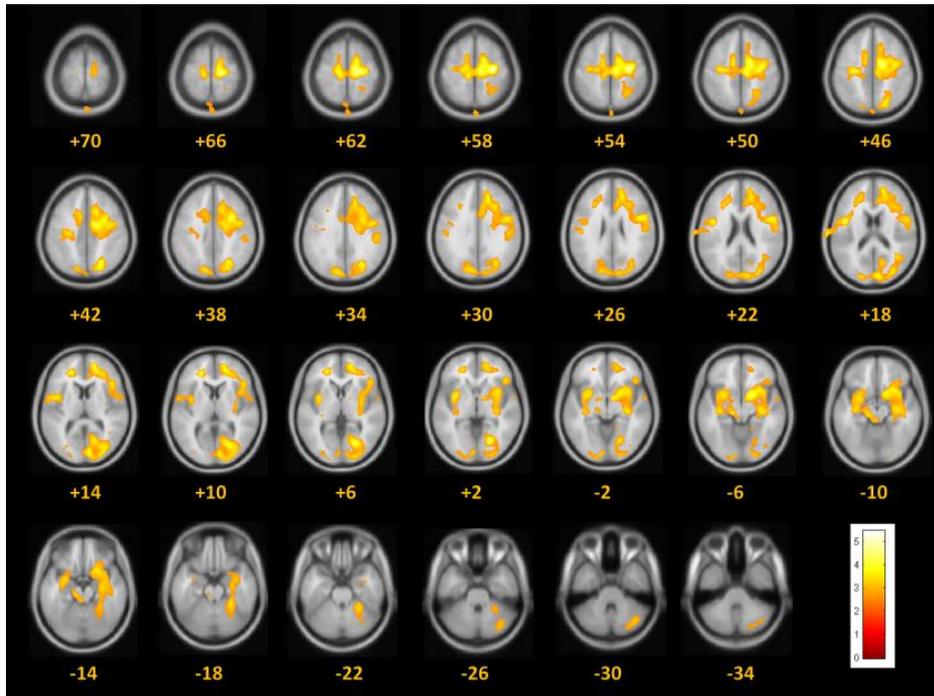
C/th<sup>[18F]</sup>FDG -PET-Aufnahme, ApoE ε4-Allelhäufigkeit und Alter. Das Modell ist signifikant (p= 0,014), angepasstes R-Quadrat= 0,403, standardisierter Koeffizient β für die CSF-NEP-Aktivität= 7,289 (p= 0,001). (B) den unabhängige Variablen CSF-NEP-Aktivität in ng/l, CSF-Tau in ng/l, Interaktionsterm Neprilysinaktivität x CSF-Tau und Häufigkeit des ApoE ε4-Allels. Das Modell ist signifikant (p= 0,040), angepasstes R-Quadrat= 0,281, standardisierter Koeffizient β für die CSF-NEP-Aktivität= -1,001 (p= 0,032). ApoE: Apolipoprotein E, Aβ42: beta-Amyloid 1-42, C/th<sup>[18F]</sup>FDG -PET: Quotient aus Cerebrum zu Thalamus des Signals aus der <sup>[18F]</sup>Fluorodesoxyglukose-Positronenemissionstomografie.

#### **4.2.3 CSF-NEP-Aktivität und das <sup>[18F]</sup>FDG-PET**

Die lineare Regressionsanalyse mit dem globalem <sup>[18F]</sup>FDG-PET-Signal als abhängiger Variable und der Neprilysinaktivität im Liquor als unabhängiger Variable mit den Kontrollvariablen ApoE ε4 Häufigkeit, Alter und Geschlecht ergab ein statistisch signifikantes Modell (p= 0,010, angepasstes R-Quadrat= 0,392). Der standardisierte Koeffizient β für die Neprilysinaktivität war -0,403 (p= 0,031). Dieses Modell erklärte 39,2 % der Variabilität des C/th<sup>[18F]</sup>FDG-PET-Signals und zeigte, dass die Neprilysinaktivität im Liquor negativ mit dem C/th<sup>[18F]</sup>FDG-PET-Signal korreliert war. Es kam zu keiner Verbesserung des Modells, wenn man CSF-Tau und den Interaktionsterm mit CSF-Tau x Neprilysinaktivität einschloss.

Die voxelbasierte Regressionsanalyse mit dem C/th<sup>[18F]</sup>FDG -PET-Signal als abhängiger Variable und der Neprilysinaktivität im Liquor als unabhängiger Variable, kontrolliert für die ApoE ε4 Häufigkeit, Alter, Geschlecht und dem Interaktionsterm C/th<sup>[18F]</sup>FDG-PET-Signal x Neprilysinaktivität, ist in Grafik 5 zu sehen. Regionale Zusammenhänge zwischen der Neprilysinaktivität und dem C/th<sup>[18F]</sup>FDG-PET-Signal fanden sich vorwiegend bilateral im frontalen Cortex, im linken okzipitalen Lobus und bilateral in den hippocampalen Arealen. Lokale Maxima fanden sich bei 32/-18/56 und bei 24/-72/0 (x/y/z Talairach-Raum).

#### 4.2.3.1 Grafik 5:



Legende zu Grafik 5: Voxelbasierte Regressionsanalyse zwischen dem C/th<sup>[18F]</sup>FDG -PET-Aufnahmesignal und der CSF-NEP-Aktivität, kontrolliert für die ApoE ε4-Allel-Häufigkeit, Alter und Geschlecht. Signifikante positive Zusammenhänge, korrigiert für multiple Vergleiche mithilfe des Family-wise-Fehlers (Bonferroni-Korrektur  $p^* = 0,05/n$ ), sind in Gelb dargestellt und auf einen axialen T1-MRT-Bilddatensatz anhand des Montreal Neurological Institute-Koordinatenraumes (MNI-Raum) projiziert (152 axiale Schnittebenen, durchgeführt mit SPM8). Die Zahlen stehen für z-Koordinaten der Schnittbilder im MNI-Koordinatensystem in mm. NEP: Neprilysin, C/th<sup>[18F]</sup>FDG-PET: Quotient von Cerebrum zu Thalamus <sup>[18F]</sup>Fluorodesoxyglukose-Positronenemissionstomografie, CSF: engl. cerebral spinal fluid (*dt.* Liquor cerebrospinalis).

#### **4.2.4 CSF-NEP-Aktivität und die Konzentration des Tau-Proteins im Liquor**

Die lineare Regressionsanalyse mit CSF-Tau als abhängiger Variable und der CSF-NEP-Aktivität als unabhängiger Variable ergab ein signifikantes Modell ( $p=0,004$ , angepasstes R-Quadrat= 0,288) und der standardisierte Koeffizient  $\beta$  für die CSF-NEP-Aktivität war 0,565 ( $p=0,004$ ).

Die lineare Regressionsanalyse mit CSF-Tau als abhängiger Variable und der CSF-NEP-Aktivität als unabhängiger Variable, kontrolliert für Geschlecht, ergab ein signifikantes Modell ( $p=0,007$ , angepasstes R-Quadrat= 0,377). Der standardisierte Koeffizient  $\beta$  für die CSF-NEP-Aktivität war 0,538 ( $p=0,005$ ). Das Modell erklärte 37,7 % der Variabilität von CSF-Tau. Die Nephilysinaktivität steht mit CSF-Tau signifikant und positiv im Zusammenhang.

## **5 Diskussion**

Diese Arbeit konnte weitere Evidenz für verschiedene anti-amyloiderge Mechanismen zeigen, die entweder mit der globalen zerebralen Amyloidmenge oder mit der A $\beta$ 42-Konzentration im Liquor cerebrospinalis in Zusammenhang stehen.

### **5.1 Diskussion zum LRP1 C667T-Polymorphismus**

LRP1 transportiert Amyloid vom Hirn über die Blut-Hirn-Schranke ins Blut. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der C667T-Polymorphismus des LRP1-Gens die zerebrale Amyloidmenge, gemessen mit [11C]PiB-PET, signifikant beeinflusst, vor allem bei Trägern des ApoE- $\epsilon$ 4-Allels. Der Effekt war in temporo-parietalen kortikalen Arealen und in Regionen mit Nähe zur Hirnoberfläche am stärksten und unabhängig vom klinischen Schweregrad.

Eine Metaanalyse mit 4668 Alzheimer-Demenz-Patienten und 4473 kognitiv gesunden Kontrollprobanden konnte keinen Unterschied in der Häufigkeit von T-Allelträgern des C667T-LRP-1-Polymorphismus zwischen beiden Gruppen finden (Pritchard et al., 2005). Dieses Ergebnis könnte

allein dadurch erklärt werden, dass die Kontrollgruppe dieser Studie durch asymptotische Menschen mit Alzheimer-Krankheit verfälscht wurde. So wurde in den meisten Studien nicht für die für die Alzheimer-Krankheit typischen Biomarkerveränderungen im CSF oder im PET kontrolliert. Eine alternative Erklärung ist auch, dass der untersuchte LRP-1-Polymorphismus nicht das Krankheitsrisiko, sondern nur den Krankheitsverlauf bedeutsam beeinflusst. Somit wären andere Faktoren zur Krankheitsentstehung entscheidend, die z. B. zu einer gesteigerten Amyloidproduktion führen, die folglich die Transportmechanismen überlasten.

Der ApoE-Genotyp erklärte selbst die Variabilität der [<sup>11</sup>C]PiB-Aufnahme ( $p=0,003$ ), was mit den Ergebnissen anderer Studien im Einklang steht (Drzezga et al., 2009; Grimmer et al., 2010). ApoE und LRP-1 sind beide in Clearancemechanismen von A $\beta$  involviert (Castellano et al., 2011). Das ApoE- $\epsilon 4$ -Allel sowie das T-Allel des LRP-1-C667T-Polymorphismus sind potentielle Risikofaktoren für die Entstehung der Alzheimer-Demenz über ihren Einfluss auf die zugrunde liegende zerebrale A $\beta$ -Pathologie (Bahia et al., 2008).

Bereits in früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass eine eingeschränkte Amyloid-Clearance zur Entwicklung zerebraler Amyloidablagerungen führt (Thal et al., 2002b). Die mikrovaskuläre Pathologie in der weißen Substanz als Indikator für beeinträchtigte perivaskuläre Drainagewege korreliert positiv mit einer erhöhten Rate an Amyloidablagerungen in Patienten mit Alzheimer-Demenz (Grimmer et al., 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen ebenfalls darauf hin, dass weitere Amyloid-Clearance-Mechanismen für die Entwicklung einer zerebralen Amyloidpathologie bei der Alzheimer-Demenz bedeutsam sind.

Der Transportumsatz von A $\beta$  mittels LRP1 bei Menschen mit Alzheimer-Demenz kann auch durch pharmakologische Substanzen erhöht werden. Beispielweise steigert Rifampicin den Transport von A $\beta$  aus dem Gehirn über die BBB durch Induktion von LRP-1 (Qosa et al., 2012). Ob ein solcher

Mechanismus klinisch beim Menschen relevant ist, müsste allerdings erst noch in Studien gezeigt werden.

In den Subgruppenanalysen bleibt der Zusammenhang zwischen der T-Allel-Häufigkeit des LRP1-C667T-Polymorphismus und der Amyloidpathologie nur innerhalb der ApoE- $\epsilon$ 4-Allelträgern signifikant, während der Interaktionsterm von T-Allel-Häufigkeit x ApoE- $\epsilon$ 4-Allelhäufigkeit in der Regressionsanalyse in der gesamten Kohorte nicht signifikant war. Dieser Unterschied zwischen ApoE- $\epsilon$ 4-Allelträgern und ApoE- $\epsilon$ 4-Nicht-Allelträgern ist im Hinblick auf LRP-1-vermittelten Transport von A $\beta$  mit präklinischen Erkenntnissen vereinbar: A $\beta$  kann mittels LRP-1 auch als ApoE-A $\beta$ -Komplex in die perivaskulären Drainagewege transportiert werden (Castellano et al., 2011). ApoE- $\epsilon$ 2 und ApoE- $\epsilon$ 3 können, sowohl isoliert als auch im Komplex mit A $\beta$ , substantiell schneller über die Blut-Hirn-Schranke mittels LRP1 transportiert werden als ApoE- $\epsilon$ 4 oder der Komplex aus A $\beta$  mit ApoE- $\epsilon$ 4 (Deane et al., 2008). Der Einfluss der ApoE  $\epsilon$ 4-Allelhäufigkeit auf die Amyloid-Clearance mittels LRP1-Transporter spräche dafür, dass in Zukunft neben einer ApoE-Genotypisierung eine Bestimmung des LRP1-C667T-Polymorphismus interessant wäre, um dessen additive Wirkung abzuschätzen. Dennoch könnte bei höherer Fallzahl eventuell ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem LRP1-Genotyp und dem zerebralen Amyloid unabhängig vom ApoE-Genotyp gefunden werden. Eine signifikante Interaktion zwischen dem C667T LRP1 Polymorphismus und der ApoE  $\epsilon$ 4 Häufigkeit fand sich in dieser Arbeit nicht.

### **5.1.1 Regionale Variabilität**

Die voxelbasierte Korrelationsanalyse zwischen LRP-1-T-Allelhäufigkeit und zerebralen Amyloid zeigte, dass der Zusammenhang in den temporo-parietalen Kortexregionen am stärksten war. In diesem Bereichen wird eine perivaskuläre Clearance von Molekülen wie A $\beta$  entlang kleiner arterieller Gefäße (glymphatisches System) in das venöse System vermutet (Tarasoff-Conway et al., 2015).

Subkortikale Hirnregionen werden hingegen durch andere Wege drainiert, beispielsweise durch Diffusion von A $\beta$  in den Liquor cerebrospinalis (Szentistvanyi et al., 1984). Dies würde erklären, weshalb sich kein Zusammenhang zwischen der A $\beta$ -Konzentration im Liquor und der LRP-1-T-Allelhäufigkeit finden lässt.

### **5.1.2 Limitation der Studienergebnisse**

Die Ergebnisse aus beiden Studien müssen aufgrund der kleinen Fallzahl dennoch mit Vorsicht interpretiert werden. Die p-Werte der Korrelationsanalyse zwischen der C667T-LRP-1-T-Allelhäufigkeit und der zerebralen Amyloidablagerungen waren nah an der Signifikanzgrenze. In einer Post-hoc-Analyse ohne die Homozygoten für das C667T-LRP-1-T-Allel erreichte die Analyse keine Signifikanz ( $p=0,110$ ). Die Subanalyse mit ApoE- $\epsilon 4$ -Allelträgern blieb hingegen signifikant ( $p=0,048$ ). Der Zusammenhang mag sich folglich bei ApoE- $\epsilon 4$ -Allelträgern stärker auswirken, und könnte aufgrund geringerer Effektstärke bei den Nicht-Allelträgern nicht statistisch signifikant sein. Aus diesem Grund wäre es wichtig, die Ergebnisse in einer größeren Kohorte zu replizieren.

Die Diagnose der Alzheimer-Demenz wurde nach den Standardforschungskriterien für die wahrscheinliche Alzheimer-Demenz vergeben (McKhann et al., 1984, 2011). Ein Kritikpunkt mancher vorherigen Arbeiten ist, dass die klinischen Diagnosen nicht auf das Vorliegen einer Alzheimer-Pathologie bestätigt wurden. In dieser Arbeit wurden stets mittels PET zerebrale Amyloidablagerungen bei allen eingeschlossenen Patienten mit Alzheimer-Demenz nachgewiesen. Fehlklassifikationen sind hierdurch unwahrscheinlich.

## 5.2 Diskussion zu CSF-NEP

Die NEP-Aktivität im Liquor war signifikant negativ mit Liquor-Biomarkern für die Alzheimer-Krankheit (A $\beta$ 42) und positiv für neuronalen Zelluntergang (CSF-Tau) korreliert sowie mit dem [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET-Signal, nicht aber mit dem globalen Amyloid-Signal gemessen im [ $\text{C}^{11}$ ]PiB-PET.

Niedrigere A $\beta$ 42-Spiegel im Liquor bei Menschen mit Alzheimer-Demenz gingen mit einer höheren Neprilysinaktivität im Liquor einher, allerdings bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen Neprilysinaktivität im Liquor und dem zerebralen Amyloid gemessen mit Amyloid-PET.

Für NEP und A $\beta$  wurde auf der Grundlage der Arbeit von Huang et al. ein gegensinniger linearer Zusammenhang angenommen, bedingt durch die anti-amyloiderge proteolytische Aktivität von NEP (Huang et al., 2006). Der Abbau von A $\beta$  durch NEP kann im Gehirnparenchym (vor allem axonal an der Präsynapse) (Huang et al., 2006) oder nach Lösung von NEP von der Zellmembran im interstitiellen Raum im Gehirn oder im Liquor stattfinden. Unklar blieb, in welchen Maßen lösliches NEP seine proteolytische Aktivität behält. Es wurde deshalb kein Konzentrations-, sondern ein Aktivitätsassay verwendet, um das tatsächliche anti-amyloiderge proteolytische Potential von NEP zu erfassen. Zudem wurden die Ergebnisse interpretiert, ohne die Möglichkeit zu berücksichtigen, dass die Menge von NEP von der produzierten Amyloidmenge im Gehirn beeinflusst werden könnte (Grimm et al., 2015).

### 5.2.1 Neprilysin und Amyloid im Liquor

Es wurde ein gegensinnig linearer Einfluss der NEP-Aktivität auf die A $\beta$ -Konzentrationen im Liquor gefunden. Der Zusammenhang war allerdings erst signifikant, als für Biomarker für neuronale Schädigung kontrolliert wurde. Sowohl die Kontrolle der Neurodegeneration mittels [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET-Signal als auch mit CSF-Tau lieferten ein übereinstimmendes signifikantes Ergebnis mit einem

gegenseitigen linearen Zusammenhang zwischen A $\beta$  und NEP. Da NEP ein Transmembranprotein ist, tritt NEP genauso wie Tau bei Zelltod in das Interstitium über und wird in den Liquor drainiert. NEP ist daher primär ein Marker für Neurodegeneration; durch proteolytische Aktivität kann NEP die A $\beta$ 42-Konzentration weiter reduzieren. Bisher konnten andere Arbeiten im Liquor keine Korrelation zwischen der Neprilysin-Aktivität und A $\beta$ 42-Konzentration herstellen, allerdings wurde in diesen nicht für neuronalen Zelluntergang kontrolliert (Maruyama et al., 2005; Sorensen et al., 2013). Der Einfluss von Neprilysin könnte insbesondere bei diagnostischen Bestimmungen der Liquorbiomarker für Amyloidpathologie zu berücksichtigen sein. Zum Beispiel könnte der A $\beta$ 42-Spiegel im Liquor durch hohe NEP-Konzentrationen fälschlich erniedrigt sein. Dies wäre der Fall, wenn NEP durch andere, nicht durch die Alzheimer-Krankheit verursachte Zellschädigung freigesetzt wird, z. B. durch eine cerebrale Ischämie oder durch pharmakologische Einflüsse (Yamamoto et al., 2016). Bei einer Korrektur um den Einfluss von NEP würden fälschlich niedrige A $\beta$ 42-Werte eventuell vermieden werden.

Studien an transgenen Mäusen zeigten, dass lokal erhöhte zerebrale Amyloidspiegel mit einem lokalen Anstieg der Neprilysinkonzentration einhergehen (Mohajeri et al., 2002). Die Messung der Produktionsrate von NEP und A $\beta$  konnte in dieser Studie aufgrund der methodischen Schwierigkeiten einer in-vivo Erfassung nicht erfolgen. Sollte sich eine A $\beta$ -bedingte gesteigerte Transkriptionsrate von NEP auf die NEP-Aktivität im Liquor auswirken, so wurde hierfür nicht kontrolliert. Im Liquor cerebrospinalis findet sich bei Menschen im leichtgradigen dementiellen Stadium einer Alzheimer-Demenz (MMST>17) allerdings eher eine geringere Neprilysinaktivität, bei Menschen im Stadium der mittel- bis schwergradigen Demenz hingegen eine erhöhte Aktivität. In der Kohorte der vorliegenden Arbeit fanden sich allerdings keine signifikanten Korrelationen zwischen der NEP-Aktivität und dem klinischen Schweregrad (MMST Pearson 0,122, p= 0,580, CDR SOB Pearson -0,185, p= 0,397) oder dem Alter (Pearson 0,049, p= 0,825).

## 5.2.2 Neprilysin und zerebrale Amyloidablagerung

Soweit bei Fertigstellung dieser Arbeit bekannt, wurde der Zusammenhang zwischen zerebraler Amyloidablagerungen (gemessen im [ $C^{11}$ ]PiB -PET) und der Neprilysinaktivität im Liquor bisher nicht untersucht. Das [ $C^{11}$ ]PiB -PET-Signal ist ein Biomarker für die globalen zerebralen Amyloidablagerungen, während die Konzentration von A $\beta$ 42 einen Marker der Amyloid-Clearance darstellt (Grimmer et al., 2009b). Eine signifikante Korrelation zwischen der Neprilysinaktivität und dem [ $C^{11}$ ]PiB -PET-Signal wurde in dieser Arbeit nicht gefunden. Andere Clearance-Mechanismen wie Abflusswege oder Abtransport über die Blut-Hirn-Schranke mögen also relevanter die globale Amyloidmenge beeinflussen (Grimmer et al., 2009b, 2012, 2014) als die lokale Degradation durch NEP, zumindest im Stadium der Demenz. Eine alternative Erklärung kann sein, dass die NEP-Aktivität im Liquor nicht mit der Aktivität im zerebralen Parenchym korreliert und damit auch nicht mit den zerebralen Amyloidablagerungen. Zum Beispiel wird Neprilysin auch am Plexus choroideus exprimiert (Bourne and Kenny, 1990; Gaudoux et al., 1993) und könnte Einfluss auf die NEP-Aktivität im Liquor, unabhängig vom sonst in den Liquor aus dem Hirnparenchym drainierten Ursprung haben. Eine weitere Erklärung für einen fehlenden Zusammenhang mit der zerebralen Amyloidmenge wäre, dass sich die NEP-Aktivität im Krankheitsverlauf verändert. In frühen klinischen Stadien könnte die NEP-Aktivität erhöht, in den späteren erniedrigt sein (Maruyama et al., 2005). In dieser Arbeit fand sich allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen früheren und späteren Krankheitsstadien. Eine Korrelation zwischen kumulativen Biomarkern der Alzheimer-Krankheit wie den globalen Amyloidablagerungen und der gemessenen NEP-Aktivität wurde in der Querschnittsuntersuchung nicht gesehen.

### **5.2.3 Neprilysin und neuronaler Zelluntergang**

Der Hauptanteil des sich im Liquor befindlichen NEP entspringt höchstwahrscheinlich aus Zellmembranen untergegangener Neuronen (Iwata et al., 2004) und wird in den Liquor cerebrospinalis drainiert. Damit vereinbar war NEP positiv mit Biomarker für Neurodegeneration korreliert (CSF-Tau, [<sup>18</sup>F]FDG -PET-Signal).

### **5.2.4 Neprilysin und das Tau-Protein**

In der untersuchten Kohorte war NEP signifikant mit CSF-Tau korreliert. Dies ist damit vereinbar, dass der größte Anteil der NEP-Konzentration im Liquor auf neuronalen Zelluntergang zurückzuführen ist. Auch andere Arbeiten fanden einen positiv signifikanten Zusammenhang im Liquor zwischen CSF-Tau und NEP (Maruyama et al., 2005; Sorensen et al., 2013). Geht NEP nach dem Zelltod eines Neurons in die interstitielle Flüssigkeit über (Tapiola et al., 2009), so hat es ähnliches diagnostisches Potential als Biomarker für Neurodegeneration wie CSF-Tau, auch ein Indikator für die Geschwindigkeit des neuronalen Zelluntergangs.

### **5.2.5 Neprilysin und das [<sup>18</sup>F]FDG -PET**

Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass die NEP-Aktivität invers mit dem globalen und regionalen [<sup>18</sup>F]FDG-PET-Signal korreliert ist. Der globale Schweregrad der neuronalen Zellschädigung gemessen mittels des zerebralen Glukosemetabolismus geht mit erhöhten NEP-Spiegeln und damit erhöhter NEP-Aktivität einher. Ein Anstieg der NEP-Aktivität bei höheren klinischen Schweregraden der Alzheimer-Demenz wurde auch von Maruyama et al. gesehen (Maruyama et al., 2005). Jedoch fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem klinischen Schweregrad anhand von

neuropsychologischen Testverfahren (MMST, CDR-SOB) und der NEP-Konzentration im Liquor in dieser Arbeit.

### **5.2.6 Limitation der Studienergebnisse**

Obwohl die Altersverteilung in der Kohorte einen relativ großen Bereich abdeckt (51-82 Jahre), sind die Ergebnisse nicht für die ältesten Patienten (> 85 Jahre) repräsentativ. Ebenso verhält es sich mit der Verteilung des klinischen Schweregrades (CDR-SOB 0,5-11,0). Patienten mit schwergradigem dementiellem Syndrom bei Alzheimer-Krankheit wurden nicht untersucht.

## **6 Zusammenfassung**

Zum einen fand sich ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der T-Allele des LRP-1-C667T-Polymorphismus auf Chromosom 12 und globaler Amyloidablagerungen in einer Querschnittskohorte von 72 Patienten mit Alzheimer-Demenz. Die Stärke der Korrelation zeigt regionale Variabilität mit Signifikanz vorwiegend in den temporo-parietalen kortikalen Arealen und in Hirnregionen mit kortikaler Nähe auf. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieser Zusammenhang stärker in Trägern des ApoE- $\epsilon$ 4-Allels ist. Dies ist ein Indiz dafür, dass eine Störung der zerebralen Clearancemechanismen ursächlich für A $\beta$ -Akkumulation im Gehirn und möglicherweise eine Ursache für die Entwicklung einer Alzheimer-Krankheit ist.

Zum anderen konnte in einer Kohorte von 23 Menschen mit Alzheimer-Demenz gezeigt werden, dass die CSF-NEP-Aktivität mit Biomarkern der Alzheimer-Krankheit in Zusammenhang steht. Nach Kontrolle für Neurodegeneration war die CSF-NEP-Aktivität negativ signifikant mit der CSF-A $\beta$ 42-Konzentration korreliert, aber nicht mit der zerebralen Gesamtamyloidmenge gemessen im Amyloid-

PET. NEP war ebenso mit Biomarkern für Neurodegeneration korreliert: mit dem kumulativen Maß des [<sup>18</sup>F]FDG -PET und CSF-Tau als Maß für die Geschwindigkeit des neuronalen Untergangs.

## **7 Finanzieller Interessenkonflikt**

Die Ergebnisse wurden ohne einen biomedizinischen, finanziellen oder persönlichen Interessenkonflikt gewonnen. Die Durchführung der Arbeit wurde zum Teil von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und von der Kommission für Klinische Forschung (KKF) der Technischen Universität München gefördert.

## **8 Vorveröffentlichungen**

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits während des Dissertationsverfahrens in wissenschaftlichen Fachjournalen publiziert und die Veröffentlichungen wurden bei dem Dekanat der Technischen Universität München angezeigt. Im Februar 2014 erschien „LRP-1 polymorphism is associated with global and regional amyloid load in Alzheimer's disease in humans in-vivo“ in *Neuroimage: Clinical* (Grimmer et al., 2014). „Associations of Neprilysin Activity in CSF with Biomarkers for Alzheimer's Disease“ erschien im Juli 2019 in *Neurodegenerative Diseases* (Grimmer et al., 2019).

## 9 Bibliografie

- Akiyama, H., Kondo, H., Ikeda, K., Kato, M., and McGeer, P.L. (2001). Immunohistochemical localization of neprilysin in the human cerebral cortex: inverse association with vulnerability to amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ) deposition. *Brain Res.* 902, 277–281.
- Albert, M.S., DeKosky, S.T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H.H., Fox, N.C., Gamst, A., Holtzman, D.M., Jagust, W.J., Petersen, R.C., Snyder, P.J., Carrillo, M. C., Thies, B., and Phelps, C. (2011). The diagnosis of mild cognitive impairment 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. J. Alzheimers Assoc.* 7, 270–279.
- Avila, J., de Barreda, E.G., Fuster-Matanzo, A., Simon, D., Llorens-Martin, M., Engel, T., Lucas, J.J., Diaz-Hernandez, M., and Hernandez, F. (2012). Looking for novel functions of tau. *Biochem Soc Trans* 40, 653–655.
- Bahia, V.S., Kok, F., Marie, S.N., Shinjo, S.O., Caramelli, P., and Nitrini, R. (2008). Polymorphisms of APOE and LRP genes in Brazilian individuals with Alzheimer disease. *Alzheimer Assoc Disord* 22, 61–65.
- Bateman, R.J., Xiong, C., Benzinger, T.L.S., Fagan, A.M., Goate, A., Fox, N.C., Marcus, D.S., Cairns, N.J., Xie, X., Blazey, T.M., Holtzman, D., Sanatcruz, A., Buckles, V., Oliver, A., Moulder, K., Aisen, P.S., Ghetti, B., Klunk, W.E., MCDade, E., Martins, R.N., Masters, C.L., Mayeux, R., Ringman, J., Rossor, M.N., Schofield, P., Sperling, R.A., Salloway, S., Morris, J.C., and Dominantly Inherited Alzheimer Network (2012). Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer’s Disease. *N. Engl. J. Med.* 367, 795–804.
- Beffert, U., Arguin, C., and Poirier, J. (1999). The polymorphism in exon 3 of the low density lipoprotein receptor-related protein gene is weakly associated with Alzheimer’s disease. *Neurosci Lett* 259, 29–32.
- Bickel, H. (2018). Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen. *Dtsch. Alzheimer Ges. EV 2018*.
- Bourne, A., and Kenny, A.J. (1990). The hydrolysis of brain and atrial natriuretic peptides by porcine choroid plexus is attributable to endopeptidase-24.11. *Biochem J* 271, 381–385.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239–259.
- Busche, M.A., Chen, X., Henning, H.A., Reichwald, J., Staufenbiel, M., Sakmann, B., and Konnerth, A. (2012). Critical role of soluble amyloid- $\beta$  for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 8740–8745.
- Carare, R.O., Bernardes-Silva, M., Newman, T.A., Page, A.M., Nicoll, J.A., Perry, V.H., and Weller, R.O. (2008). Solutes, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries: significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34, 131–144.

Castellano, J.M., Kim, J., Stewart, F.R., Jiang, H., DeMattos, R.B., Patterson, B.W., Fagan, A.M., Morris, J.C., Mawuenyega, K.G., Cruchaga, C., Goate, A.M., Bales, K.R., Paul, S.M., Bateman, R.J., and Holtzman D.M. (2011). Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance. *Sci Transl Med* 3, 89ra57.

Deane, R., and Zlokovic, B.V. (2007). Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 4, 191–197.

Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M.B., Holtzman, D.M., and Zlokovic, B.V. (2008). apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest* 118, 4002–4013.

Deane, R., Bell, R.D., Sagare, A., and Zlokovic, B.V. (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.

Drzezga, A., Grimmer, T., Henriksen, G., Muhlau, M., Perneczky, R., Miederer, I., Praus, C., Sorg, C., Wohlschlagel, A., Riemenschneider, M., Wester, H.J., Foerstl, H., Schwaiger, M., and Kurz, A. (2009). Effect of APOE genotype on amyloid plaque load and gray matter volume in Alzheimer disease. *Neurology* 72, 1487–1494.

Duyckaerts, C., Delatour, B., and Potier, M.C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 118, 5–36.

Eckman, E.A., Adams, S.K., Troendle, F.J., Stodola, B.A., Kahn, M.A., Fauq, A.H., Xiao, H.D., Bernstein, K.E., and Eckman, C.B. (2006). Regulation of Steady-state  $\beta$ -Amyloid Levels in the Brain by Neprilysin and Endothelin-converting Enzyme but Not Angiotensin-converting Enzyme. *J. Biol. Chem.* 281, 30471–30478.

Folstein, M.F., Folstein, S.E., and McHugh, P.R. (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12, 189–198.

Forero, D.A., Arboleda, G., Yunis, J.J., Pardo, R., and Arboleda, H. (2006). Association study of polymorphisms in LRP1, tau and 5-HTT genes and Alzheimer's disease in a sample of Colombian patients. *J Neural Transm* 113, 1253–1262.

Friston, K.J., Tononi, G., Reeke, G.N., Jr., Sporns, O., and Edelman, G.M. (1994). Value-dependent selection in the brain: simulation in a synthetic neural model. *Neuroscience* 59, 229–243.

Fuentealba, R.A., Liu, Q., Zhang, J., Kanekiyo, T., Hu, X., Lee, J.M., LaDu, M.J., and Bu, G. (2010). Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates neuronal A $\beta$ 42 uptake and lysosomal trafficking. *PLoS One* 5, e11884.

Gaudoux, F., Boileau, G., and Crine, P. (1993). Localization of neprilysin (EC 3.4.24.11) mRNA in rat brain by in situ hybridization. *J Neurosci Res* 34, 426–433.

Glaser, C., Schulz, S., Handschug, K., Huse, K., and Birkenmeier, G. (2004). Genetic and functional characteristics of the human in vivo LRP1/A2MR receptor suggested as a risk marker for Alzheimer's disease and other complex (degenerative) diseases. *Neurosci Res* 50, 85–101.

- Goos, J.D., Henneman, W.J., Sluimer, J.D., Vrenken, H., Sluimer, I.C., Barkhof, F., Blankenstein, M.A., Scheltens, P.H., and van der Flier, W.M. (2010). Incidence of cerebral microbleeds: a longitudinal study in a memory clinic population. *Neurology* 74, 1954–1960.
- Grimm, M.O.W., Mett, J., Stahlmann, C.P., Grösgen, S., Haupenthal, V.J., Blümel, T., Hundsdörfer, B., Zimmer, V.C., Mylonas, N.T., Tanila, H., Müller, U., Grimm, H.S., and Hartmann, T. (2015). APP intracellular domain derived from amyloidogenic  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Front. Aging Neurosci.* 7.
- Grimmer, T., Henriksen, G., Wester, H.J., Forstl, H., Klunk, W.E., Mathis, C.A., Kurz, A., and Drzezga, A. (2009a). Clinical severity of Alzheimer's disease is associated with PIB uptake in PET. *Neurobiol Aging* 30, 1902–1909.
- Grimmer, T., Riemenschneider, M., Forstl, H., Henriksen, G., Klunk, W.E., Mathis, C.A., Shiga, T., Wester, H.J., Kurz, A., and Drzezga, A. (2009b). Beta amyloid in Alzheimer's disease: increased deposition in brain is reflected in reduced concentration in cerebrospinal fluid. *Biol Psychiatry* 65, 927–934.
- Grimmer, T., Tholen, S., Yousefi, B.H., Alexopoulos, P., Forschler, A., Forstl, H., Henriksen, G., Klunk, W.E., Mathis, C.A., Perneczky, R., Sorg, C., Kuz, A., and Drzezga, A. (2010). Progression of cerebral amyloid load is associated with the apolipoprotein E epsilon4 genotype in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 68, 879–884.
- Grimmer, T., Faust, M., Auer, F., Alexopoulos, P., Forstl, H., Henriksen, G., Perneczky, R., Sorg, C., Yousefi, B.H., Drzezga, A., and Kurz, A. (2012). White matter hyperintensities predict amyloid increase in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33(12), 2766-2773.
- Grimmer, T., Goldhardt, O., Guo, L.-H., Yousefi, B.H., Förster, S., Drzezga, A., Sorg, C., Alexopoulos, P., Förstl, H., Kurz, A., and Perneczky, R. (2014). LRP-1 polymorphism is associated with global and regional amyloid load in Alzheimer's disease in humans in-vivo. *NeuroImage Clin.* 4, 411–416.
- Grimmer, T., Goldhardt, O., Yakushev, I., Ortner, M., Sorg, C., Diehl-Schmid, J., Förstl, H., Kurz, A., Perneczky, R., and Miners, S. (2019). Associations of Neprilysin Activity in CSF with Biomarkers for Alzheimer's Disease. *Neurodegener. Dis.* 1–8.
- Guo, L.H., Westerteicher, C., Wang, X.H., Kratzer, M., Tsolakidou, A., Jiang, M., Grimmer, T., Laws, S.M., Alexopoulos, P., Bujo, H., Kurz, A., and Perneczky, R. (2012). SORL1 genetic variants and cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 262(2), 529–34.
- Gylys, K.H., Fein, J.A., Tan, A.M., and Cole, G.M. (2003). Apolipoprotein E enhances uptake of soluble but not aggregated amyloid-beta protein into synaptic terminals. *J. Neurochem.* 84, 1442–1451.
- Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.
- Hatanaka, Y., Kamino, K., Fukuo, K., Mitsuda, N., Nishiwaki-Ueda, Y., Sato, N., Satoh, T., Yamamoto, H., Yoneda, H., Imagawa, M., Miki, T., Ohta, T., and Ogihara, T. (2000). Low density lipoprotein receptor-related protein gene polymorphisms and risk for late-onset Alzheimer's disease in a Japanese population. *Clin Genet* 58, 319–323.

- Hauser, P.S., Narayanaswami, V., and Ryan, R.O. (2011). Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology. *Prog. Lipid Res.* 50, 62–74.
- Hellstrom-Lindahl, E., Ravid, R., and Nordberg, A. (2008). Age-dependent decline of neprilysin in Alzheimer's disease and normal brain: inverse correlation with A beta levels. *Neurobiol Aging* 29, 210–221.
- Herz, J., and Strickland, D.K. (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* 108, 779–784.
- Hoffman, J.M., Welsh-Bohmer, K.A., Hanson, M., Crain, B., Hulette, C., Earl, N., and Coleman, R.E. (2000). FDG PET imaging in patients with pathologically verified dementia. *J Nucl Med* 41, 1920–1928.
- Howell, S., Nalbantoglu, J., and Crine, P. (1995). Neutral endopeptidase can hydrolyze beta-amyloid(1-40) but shows no effect on beta-amyloid precursor protein metabolism. *Peptides* 16, 647–652.
- Huang, S.-M., Mouri, A., Kokubo, H., Nakajima, R., Suemoto, T., Higuchi, M., Staufenbiel, M., Noda, Y., Yamaguchi, H., Nabeshima, T., Saido, T.C., and Iwata, N. (2006). Neprilysin-sensitive Synapse-associated Amyloid- $\beta$  Peptide Oligomers Impair Neuronal Plasticity and Cognitive Function. *J. Biol. Chem.* 281, 17941–17951.
- Ishii, K., Imamura, T., Sasaki, M., Yamaji, S., Sakamoto, S., Kitagaki, H., Hashimoto, M., Hirono, N., Shimomura, T., and Mori, E. (1998). Regional cerebral glucose metabolism in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Neurology* 51, 125–130.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H.J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., and Saido, T.C. (2000). Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* 6, 143–150.
- Iwata, N., Mizukami, H., Shirotani, K., Takaki, Y., Muramatsu, S., Lu, B., Gerard, N.P., Gerard, C., Ozawa, K., and Saido, T.C. (2004). Presynaptic Localization of Neprilysin Contributes to Efficient Clearance of Amyloid- $\beta$  Peptide in Mouse Brain. *J. Neurosci.* 24, 991–998.
- Jack, C.R., Jr. (2011). Alliance for aging research AD biomarkers work group: structural MRI. *Neurobiol Aging* 32 Suppl 1, S48-57.
- Jack, C.R., Bennett, D.A., Blennow, K., Carrillo, M.C., Dunn, B., Haeberlein, S.B., Holtzman, D.M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K., Rowe, C., SCheltens, P., Siemers, E., Snyder, H., and Sperling, R. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 14, 535–562.
- Jaeger, S., and Pietrzik, C.U. (2008). Functional role of lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 5, 15–25.
- Jagust, W., Reed, B., Mungas, D., Ellis, W., and Decarli, C. (2007a). What does fluorodeoxyglucose PET imaging add to a clinical diagnosis of dementia? *Neurology* 69, 871–877.
- Jagust, W., Reed, B., Mungas, D., Ellis, W., and Decarli, C. (2007b). What does fluorodeoxyglucose PET imaging add to a clinical diagnosis of dementia? *Neurology* 69, 871–877.

- Jefferies, K., and Agrawal, N. (2009). Early-onset dementia. *Adv. Psychiatr. Treat.* *15*, 380–388.
- Johnson-Wood, K., Lee, M., Motter, R., Hu, K., Gordon, G., Barbour, R., Khan, K., Gordon, M., Tan, H., Games, D., Lieberburg, I., Schenk, D., Seubert, P., and McConlogue, L. (1997). Amyloid precursor protein processing and A $\beta$ 42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 1550–1555.
- Kagan, B.L., Jang, H., Capone, R., Arce, F.T., Ramachandran, S., Lal, R., and Nussinov, R. (2012). Antimicrobial Properties of Amyloid Peptides. *Mol. Pharm.* *9*, 708–717.
- Kamboh, M.I., Ferrell, R.E., and DeKosky, S.T. (1998). Genetic association studies between Alzheimer's disease and two polymorphisms in the low density lipoprotein receptor-related protein gene. *Neurosci Lett* *244*, 65–68.
- Kandimalla, K.K., Scott, O.G., Fulzele, S., Davidson, M.W., and Poduslo, J.F. (2009). Mechanism of neuronal versus endothelial cell uptake of Alzheimer's disease amyloid beta protein. *PLoS One* *4*, e4627.
- Kanekiyo, T., and Bu, G. (2014). The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid- $\beta$  clearance in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* *6*, 93.
- Kang, D.E., Pietrzik, C.U., Baum, L., Chevallier, N., Merriam, D.E., Kounnas, M.Z., Wagner, S.L., Troncoso, J.C., Kawas, C.H., Katzman, R., and Koo, E.H. (2000). Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J Clin Invest* *106*, 1159–1166.
- Kang, J.-H., Korecka, M., Figurski, M.J., Toledo, J.B., Blennow, K., Zetterberg, H., Waligorska, T., Brylska, M., Fields, L., Shah, N., Soares, H., Dean, R.A., Vanderstichele, H., Petersen, R.C., Aisen, P.S., Saykin, A.J., Weiner, M.W., Tojanowski, J.Q., and Shaw, L.M., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2015). The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative 2 Biomarker Core: A review of progress and plans. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* *11*, 772–791.
- Kumar, R., Nordberg, A., and Darreh-Shori, T. (2016). Amyloid- $\beta$  peptides act as allosteric modulators of cholinergic signalling through formation of soluble BA $\beta$ ACs. *Brain* *139*, 174–192.
- Leicht, H., Heinrich, S., Heider, D., Bachmann, C., Bickel, H., van den Bussche, H., Fuchs, A., Lippa, M., Maier, W., Mösch, E., Pentzek, M., Rieder-Heller, S.G., Tebarth F., Werle, J., Weverer, S., Wiese, B., Zimmermann, T., König, H.H., and AgeCoDe study group. (2011). Net costs of dementia by disease stage. *Acta Psychiatr. Scand.* *124*, 384–395.
- Leissring, M.A., Farris, W., Chang, A.Y., Walsh, D.M., Wu, X., Sun, X., Frosch, M.P., and Selkoe, D.J. (2003). Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* *40*, 1087–1093.
- Lesne, S.E. (2014). Toxic oligomer species of amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease, a timing issue. *Swiss Med. Wkly.* *144*, w14021.
- Liu, A.K.L., Chang, R.C.-C., Pearce, R.K.B., and Gentleman, S.M. (2015). Nucleus basalis of Meynert revisited: anatomy, history and differential involvement in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *129*, 527–540.

- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T.J., Eccles, J.D., Rouhani, S.J., Peske, J.D., Derecki, N.C., Castle, D., Mandell, J.W., Lee, K.S., Harris, T.H., and Kipnis, J. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 523, 337–341.
- Mahley, R.W. (2016). Central Nervous System Lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 1305–1315.
- Maruyama, M., Higuchi, M., Takaki, Y., Matsuba, Y., Tanji, H., Nemoto, M., Tomita, N., Matsui, T., Iwata, N., Mizukami, H., Muramatsu, S., Ozawa, K., Saldo, T.C., Arai, H., and Sasaki, H. (2005). Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 57, 832–842.
- Mawuenyega, K.G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J.C., Yarasheski, K.E., and Bateman, R.J. (2010). Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 330, 1774.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., and Stadlan, E.M. (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, G.M., Knopman, D.S., Chertkow, H., Hyman, B.T., Jack, C.R., Jr., Kawas, C.H., Klunk, W.E., Koroshetz, W.J., Manly, J.J., Mayeux, R., Mohs, R.C., Morris, J.C., Rossor, M.N., Scheltens, P., Carrillo, M.C., Thies, B., Weingraub, S., and Phelps, C.H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 263–269.
- Miners, J.S., Kehoe, P.G., and Love, S. (2008a). Immunocapture-based fluorometric assay for the measurement of insulin-degrading enzyme activity in brain tissue homogenates. *J Neurosci Methods* 169, 177–181.
- Miners, J.S., Verbeek, M.M., Rikkert, M.O., Kehoe, P.G., and Love, S. (2008b). Immunocapture-based fluorometric assay for the measurement of neprilysin-specific enzyme activity in brain tissue homogenates and cerebrospinal fluid. *J. Neurosci. Methods* 167, 229–236.
- Miners, J.S., Baig, S., Tayler, H., Kehoe, P.G., and Love, S. (2009). Neprilysin and insulin-degrading enzyme levels are increased in Alzheimer disease in relation to disease severity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 902–914.
- Minoshima, S., Frey, K.A., Koeppe, R.A., Foster, N.L., and Kuhl, D.E. (1995). A diagnostic approach in Alzheimer's disease using three-dimensional stereotactic surface projections of fluorine-18-FDG PET. *J Nucl Med* 36, 1238–1248.
- Minoshima, S., Giordani, B., Berent, S., Frey, K.A., Foster, N.L., and Kuhl, D.E. (1997). Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 42, 85–94.
- Mohajeri, M.H., Wollmer, M.A., and Nitsch, R.M. (2002). A $\beta$ 42-induced Increase in Neprilysin Is Associated with Prevention of Amyloid Plaque Formation in Vivo. *J. Biol. Chem.* 277, 35460–35465.
- Morris, E., Chalkidou, A., Hammers, A., Peacock, J., Summers, J., and Keevil, S. (2016). Diagnostic accuracy of 18F amyloid PET tracers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 43, 374–385.

Morris, J.C., Heyman, A., Mohs, R.C., Hughes, J.P., van Belle, G., Fillenbaum, G., Mellits, E.D., and Clark, C. (1989). The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part I. Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 39, 1159–1165.

Nalivaeva, N.N., Belyaev, N.D., Zhuravin, I.A., and Turner, A.J. (2012). The Alzheimer's Amyloid-Degrading Peptidase, Nephilysin: Can We Control It? *Int. J. Alzheimers Dis.* 2012, 12.

Ortner, M., Kurz, A., Alexopoulos, P., Auer, F., Diehl-Schmid, J., Drzezga, A., Förster, S., Förstl, H., Perneczky, R., Sorg, C., Yousefi, B.H., and Grimmer, T. (2015). Small vessel disease, but neither amyloid load nor metabolic deficit, is dependent on age at onset in Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 77, 704–710.

Ost, M., Nylén, K., Csajbok, L., Ohrfelt, A.O., Tullberg, M., Wikkelso, C., Nellgård, P., Rosengren, L., Blennow, K., and Nellgård, B. (2006). Initial CSF total tau correlates with 1-year outcome in patients with traumatic brain injury. *Neurology* 67, 1600–1604.

Pantoni, L. (2010). Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurol.* 9, 689–701.

Pasquini, L., Tonch, A., Plant, C., Zherdin, A., Ortner, M., Kurz, A., Förstl, H., Zimmer, C., Grimmer, T., Wohlschäger, A., Riedl, V., and Sorg, C. (2014). Intrinsic Brain Activity of Cognitively Normal Older Persons Resembles More That of Patients Both with and at Risk for Alzheimer's Disease Than That of Healthy Younger Persons. *Brain Connect.* 4, 323–336.

Pflanzner, T., Janko, M.C., Andre-Dohmen, B., Reuss, S., Weggen, S., Roebroek, A.J., Kuhlmann, C.R., and Pietrzik, C.U. (2011). LRP1 mediates bidirectional transcytosis of amyloid-beta across the blood-brain barrier. *Neurobiol Aging* 32, 2323 e1-11.

Pritchard, A., Harris, J., Pritchard, C.W., St Clair, D., Lemmon, H., Lambert, J.C., Chartier-Harlin, M.C., Hayes, A., Thaker, U., Iwatsubo, T., Mann, D.M.A., and Lendon, C. (2005). Association study and meta-analysis of low-density lipoprotein receptor related protein in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 382, 221–226.

Qiu, C., De Ronchi, D., and Fratiglioni, L. (2007). The epidemiology of the dementias: an update. *Curr. Opin. Psychiatry* 20, 380–385.

Qosa, H., Abuznait, A.H., Hill, R.A., and Kaddoumi, A. (2012). Enhanced Brain Amyloid-beta Clearance by Rifampicin and Caffeine as a Possible Protective Mechanism against Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 31(1), 151-165.

Ramanathan, A., Nelson, A.R., Sagare, A.P., and Zlokovic, B.V. (2015). Impaired vascular-mediated clearance of brain amyloid beta in Alzheimer's disease: the role, regulation and restoration of LRP1. *Front. Aging Neurosci.* 7, 136.

Randall, A.D., Witton, J., Booth, C., Hynes-Allen, A., and Brown, J.T. (2010). The functional neurophysiology of the amyloid precursor protein (APP) processing pathway. *Neuropharmacology* 59, 243–267.

Reinhard, C., Hébert, S.S., and De Strooper, B. (2005). The amyloid- $\beta$  precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J.* 24, 3996–4006.

- Sagare, A.P., Bell, R.D., and Zlokovic, B.V. (2012). Neurovascular Dysfunction and Faulty Amyloid  $\beta$ -Peptide Clearance in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2.
- Saint-Aubert, L., Lemoine, L., Chiotis, K., Leuzy, A., Rodriguez-Vieitez, E., and Nordberg, A. (2017). Tau PET imaging: present and future directions. *Mol. Neurodegener.* 12, 19.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., and Hyman, B.T. (2011). Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1.
- Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S.R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D.M., Miller, C.A., Strickland, D.K., Ghiso, J., and Zlokovic, B.V. (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 106, 1489–1499.
- Shirotani, K., Tsubuki, S., Iwata, N., Takaki, Y., Harigaya, W., Maruyama, K., Kiryu-Seo, S., Kiyama, H., Iwata, H., Tomita, T., Iwatsubo, T., and Saido, T.C. (2001). Neprilysin Degrades Both Amyloid  $\beta$  Peptides 1–40 and 1–42 Most Rapidly and Efficiently among Thiorphan- and Phosphoramidon-sensitive Endopeptidases. *J. Biol. Chem.* 276, 21895–21901.
- Šimić, G., Babić Leko, M., Wray, S., Harrington, C., Delalle, I., Jovanov-Milošević, N., Bažadona, D., Buée, L., de Silva, R., Di Giovanni, G., Wischik, C., and Hof, P.R. (2016). Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules* 6(1), 6.
- Sorensen, K.C., Simonsen, A.H., Holmetoft, U.B., Hasselbalch, S.G., and Heegaard, N.H. (2013). Neprilysin-like activity correlates with CSF-Tau and phospho-tau in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 37, 379–387.
- Sperling, R., and Johnson, K. (2013). Biomarkers of Alzheimer disease: current and future applications to diagnostic criteria. *Contin. Minneap. Minn* 19, 325–338.
- Sperling, R.A., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Bennett, D.A., Craft, S., Fagan, A.M., Iwatsubo, T., Jack, C.R., Kaye, J., Montine, T.J., Park, D.C., Reiman, E.M., Row, C.C., Siemers, E., Stren, Y., Yaffe, K., Carillo, M.C., Thies, B., Morrison-Bogorad, M., Wagster, M.V., and Phelps, C.H. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 7, 280–292.
- Szentistvanyi, I., Patlak, C.S., Ellis, R.A., and Cserr, H.F. (1984). Drainage of interstitial fluid from different regions of rat brain. *Am J Physiol* 246, F835-44.
- Tapiola, T., Alafuzoff, I., Herukka, S.K., Parkkinen, L., Hartikainen, P., Soininen, H., and Pirttila, T. (2009). Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch Neurol* 66, 382–389.
- Tarasoff-Conway, J.M., Carare, R.O., Osorio, R.S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., Axel, L., Rusinek, H., Nicholson, C., Zlokovic, B.V., Frangione, B., Blennow, K., Ménard, J., Zetterberg, H., Wisniewski, T., and de Leon, M.J. (2015). Clearance systems in the brain—implications for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 457–470.
- Thal, D.R. (2009). The pre-capillary segment of the blood-brain barrier and its relation to perivascular drainage in Alzheimer's disease and small vessel disease. *ScientificWorldJournal* 9, 557–563.

- Thal, D.R., Rub, U., Orantes, M., and Braak, H. (2002a). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* *58*, 1791–1800.
- Thal, D.R., Rüb, U., Orantes, M., and Braak, H. (2002b). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* *58*, 1791–1800.
- Thal, D.R., Papassotiropoulos, A., Saido, T.C., Griffin, W.S., Mrak, R.E., Kolsch, H., Del Tredici, K., Attems, J., and Ghebremedhin, E. (2010). Capillary cerebral amyloid angiopathy identifies a distinct APOE epsilon4-associated subtype of sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* *120*, 169–183.
- Tsolakidou, A., Alexopoulos, P., Guo, L.H., Grimmer, T., Westerteicher, C., Kratzer, M., Jiang, M., Bujo, H., Roselli, F., Leante, M.R., Livrea, P., Kurz, A., and Perneczky, R. (2013). Beta-Site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 activity is related to cerebrospinal fluid concentrations of sortilin-related receptor with A-type repeats, soluble amyloid precursor protein, and tau. *Alzheimers Dement* *9*, 386–391.
- Van Leuven, F., Stas, L., Hilliker, C., Lorent, K., Umans, L., Serneels, L., Overbergh, L., Torrekens, S., Moechars, D., De Strooper, B., and Van den Berghe, H. (1994). Structure of the gene (LRP1) coding for the human alpha 2-macroglobulin receptor lipoprotein receptor-related protein. *Genomics* *24*, 78–89.
- Vandermeeren, M., Mercken, M., Vanmechelen, E., Six, J., van de Voorde, A., Martin, J.J., and Cras, P. (1993). Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Neurochem.* *61*, 1828–1834.
- Villemagne, V.L., Pike, K.E., Chetelat, G., Ellis, K.A., Mulligan, R.S., Bourgeat, P., Ackermann, U., Jones, G., Szoek, C., Salvado, O., Martins, R., O'Keefe, G., Mathis, C.A., Klunk, W.E., Ames, D., Masters, C.L., and Rowe, C.C. (2011). Longitudinal assessment of Abeta and cognition in aging and Alzheimer disease. *Ann Neurol* *69*, 181–192.
- Vos, S.J.B., van Rossum, I.A., Verhey, F., Knol, D.L., Soininen, H., Wahlund, L.-O., Hampel, H., Tsolaki, M., Minthon, L., Frisoni, G.B., Froelich, L., Nobili, F., van der Flier, W., Blennow, K., Wolz, R., Scheltens, P., and Visser, P.J. (2013). Prediction of Alzheimer disease in subjects with amnesic and nonamnesic MCI. *Neurology* *80*, 1124–1132.
- Wang, S., Wang, R., Chen, L., Bennett, D.A., Dickson, D.W., and Wang, D.S. (2010). Expression and functional profiling of neprilysin, insulin-degrading enzyme, and endothelin-converting enzyme in prospectively studied elderly and Alzheimer's brain. *J Neurochem* *115*, 47–57.
- Wang, Y., Liu, S., Wang, J., Zhang, J., Hua, Y., Li, H., Tan, H., Kuai, B., Wang, B., and Sheng, S. (2017). Association between LRP1 C766T polymorphism and Alzheimer's disease susceptibility: a meta-analysis. *Sci. Rep.* *7*, 8435.
- Waxman, A.D., H., K., Lewis, D.H., Herscovitch, P., Minoshima, S., Ichise, M., Drzezga, A.E., Devous, M.D., and Mountz, J.M. (2009). Society of Nuclear Medicine Procedure Guideline for FDG PET Brain Imaging. *Proced. Guid. FDG-PET Brain Imaging* *1.0*, 1–12.
- Weiner, M.W., Veitch, D.P., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Cairns, N.J., Green, R.C., Harvey, D., Jack, C.R., Jagust, W., Morris, J.C., Petersen, R.C., Salazar, J., Saykin, A.J., Shaw, L.M., Toga, A.W., Trojanowski, J.Q., and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2017). The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative 3: continued innovation for clinical trial improvement. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* *13*, 561–571.

Weller, R.O. (1998). Pathology of cerebrospinal fluid and interstitial fluid of the CNS: significance for Alzheimer disease, prion disorders and multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 57, 885–894.

Williams, S.E., Ashcom, J.D., Argraves, W.S., and Strickland, D.K. (1992). A novel mechanism for controlling the activity of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. Multiple regulatory sites for 39-kDa receptor-associated protein. *J Biol Chem* 267, 9035–9040.

Yamada, K., Hashimoto, T., Yabuki, C., Nagae, Y., Tachikawa, M., Strickland, D.K., Liu, Q., Bu, G., Basak, J.M., Holtzman, D.M. Ohtsuki, S., Terasaki, T., and Iwatsubo, T. (2008). The low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates uptake of amyloid beta peptides in an in vitro model of the blood-brain barrier cells. *J Biol Chem* 283, 34554–34562.

Yamamoto, N., Fujii, Y., Kasahara, R., Tanida, M., Ohora, K., Ono, Y., Suzuki, K., and Sobue, K. (2016). Simvastatin and atorvastatin facilitates amyloid  $\beta$ -protein degradation in extracellular spaces by increasing neprilysin secretion from astrocytes through activation of MAPK/Erk1/2 pathways. *Glia* 64, 952–962.

Zhang, E.T., Richards, H.K., Kida, S., and Weller, R.O. (1992). Directional and compartmentalised drainage of interstitial fluid and cerebrospinal fluid from the rat brain. *Acta Neuropathol* 83, 233–239.

Ziegler, U., and Doblhammer, G. (2009). [Prevalence and incidence of dementia in Germany--a study based on data from the public sick funds in 2002]. *Gesundheitswesen Bundesverb. Ärzte Öffentl. Gesundheitsdienstes Ger.* 71, 281–290.

Zivelin, A., Rosenberg, N., Peretz, H., Amit, Y., Kornbrot, N., and Seligsohn, U. (1997). Improved method for genotyping apolipoprotein E polymorphisms by a PCR-based assay simultaneously utilizing two distinct restriction enzymes. *Clin Chem* 43, 1657–1659.

Zlokovic, B.V., Deane, R., Sagare, A.P., Bell, R.D., and Winkler, E.A. (2010). Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid beta-peptide elimination from the brain. *J Neurochem* 115, 1077–1089.