

Molekulare Medizin

Struktur-Biomarker zur Früherkennung von Morbus Alzheimer

JULIA STOCKMANN, KLAUS GERWERT
RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM

Alzheimer's disease cannot be cured today. In addition to a drug, a predictive blood biomarker is urgently needed to identify high-risk subjects in early cognitively less impaired stages. Here, a biomarker is presented that uses the secondary structure distribution of A β -peptides in blood measured by the immuno-infrared sensor. Using this structure-based biomarker clinical conversion of symptomless subjects at baseline were predicted in a follow-up study 14 years before manifestation.

DOI: 10.1007/s12268-020-1381-7
© Die Autoren 2020

■ Morbus Alzheimer (MA) ist die häufigste Form der Demenz und derzeit nicht heilbar. Hoffnung für Alzheimer-Erkrankte gibt jetzt der Antikörper Aducanumab von Biogen, dessen Zulassung zurzeit von der U. S. Food and Drug Administration geprüft wird [1]. Genauso dringend wie ein Medikament wird zusätzlich ein minimal-invasiver und breit einsetzbarer Früherkennungstest benötigt. Wir haben einen Bluttest entwickelt, der die spätere klinische Manifestation mit hoher Genauigkeit vorhersagen kann. Unsere Visi-

on ist, ähnlich wie bei HIV, bereits im symptomfreien Zustand mit der Therapie zu beginnen und damit das Fortschreiten der Erkrankung in einem kognitiv noch nicht stark beeinträchtigten Zustand aufzuhalten.

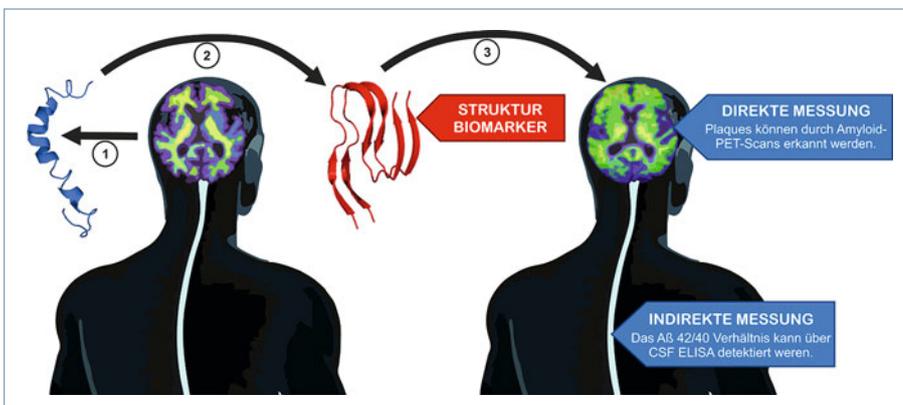
Entstehung von Morbus Alzheimer

Charakteristisch für MA ist die Umfaltung des Amyloid-beta (A β)-Peptids von α -helikalen und ungefalteten (Abb. 1, (1)) zu pathogenen, β -Faltblatt-angereicherten Sekundärstrukturen (Abb. 1, (2)). Ob diese Fehlfaltung

zu Beginn der Erkrankung ursächlich (Amyloid-Hypothese) oder nur symptomatisch ist, wird noch kontrovers diskutiert. Für die Diagnostik spielt das aber keine Rolle. Die fehlgefalteten A β -Peptide bilden Oligomere, die sich wiederum zu größeren Fibrillen anlagern und schließlich nach etwa 15 Jahren neurotoxische Amyloid-Plaques im Gehirn ausbilden (Abb. 1, (3)). Schließlich werden die Gehirnschädigungen so massiv, dass sich erste kognitive Beeinträchtigungen ergeben. Meist entwickelt sich innerhalb der darauffolgenden Jahre eine schwere Demenz, und am Ende verstirbt der Patient. Neben dem A β -Peptid falten um einige Jahre verzögert auch die Tau-Proteine in die β -Faltblatt-Form um und bilden ebenfalls charakteristische Ablagerungen im Gehirn. *Post mortem* zeigen die A β - und Tau-Ablagerungen in histopathologischen Dünnschnitten die Alzheimer-Erkrankung zuverlässig an.

Diagnose von Morbus Alzheimer

Derzeit basiert die *pre mortem* klinische Diagnose von MA häufig auf neuropsychologischen Tests, die die kognitive Leistungsfähigkeit eines Patienten bewerten. Diese können allerdings die frühen symptomlosen Stadien gar nicht und frühe symptomatische Stadien nicht präzise erfassen. Sehr viel genauer ist dagegen die Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-Untersuchung, die Amyloid-Plaques im Gehirn abbilden kann (Abb. 1). Deutlich kostengünstiger kann die charakteristische Amyloid-Plaque-Bildung anhand neurochemischer Biomarker in der Rückenmarksflüssigkeit (CSF, *cerebrospinal fluid*) nachgewiesen werden. Als Biomarker wird das konzentrationsunabhängige A β 42/A β 40-Verhältnis bestimmt. Jedoch muss dafür Rückenmarksflüssigkeit durch eine Lumbalpunktion gewonnen werden. Dies wird als Vorsorgeuntersuchung wenig Akzeptanz finden. Die beiden Amyloid-nachweisenden etablierten Tests sind zur Untersuchung von großen symptomfreien Bevölkerungsgruppen nicht geeignet. Dazu wird dringend ein Alzheimer-Bluttest benötigt.



▲ **Abb. 1:** Die Umfaltung des A β -Peptids von α -helikalen (1) zu β -Faltblatt-Sekundärstrukturen (2) führt zu neurotoxischen Amyloid-Ablagerungen im Gehirn (3). Diese Amyloid-Plaques können etwa vier Jahre vor dem Auftreten klinischer Symptome mittels PET-Scanning (direkt) oder durch die Bestimmung des A β 42/A β 40-Verhältnisses mittels ELISA (indirekt) nachgewiesen werden (CSF, Cerebrospinalflüssigkeit). Der Strukturbiomarker kann im Gegensatz dazu die bereits zehn Jahre frühere Veränderung der Sekundärstrukturverteilung des A β -Peptids im Blut nachweisen.

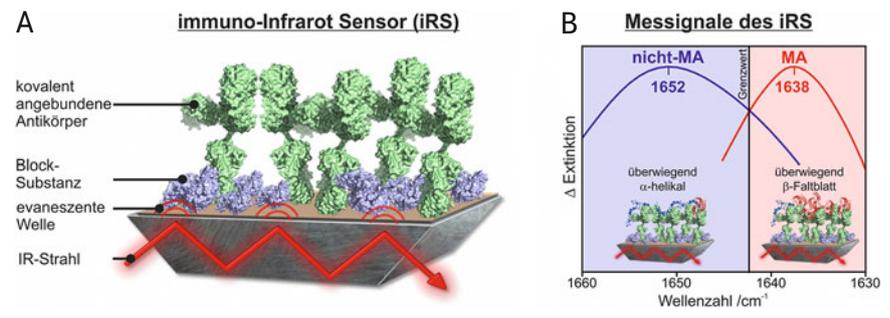
Ein Alzheimer-Bluttest zur Früherkennung

Es wurden Methoden entwickelt, die durch eine verbesserte Empfindlichkeit jetzt auch im Blut das A β 42/A β 40-Verhältnis analog zum CSF messen können. Dazu werden zum einen die SIMOA-Technologie, eine neue, ultrasensitive digitale ELISA-Methode [2], oder zum anderen aufwendige massenspektrometrische Verfahren eingesetzt [3, 4]. Im Prinzip können diese beiden Methoden mittlerweile auch im Blut die Bildung der Amyloid-Plaques indirekt nachweisen.

Im Gegensatz dazu haben wir einen neuen Weg beschritten. Mit dem *immuno*-Infrarotsensor (iRS) können wir die Fehlfaltung des A β -Peptids zu β -Faltblatt-angereicherten Strukturen in Körperflüssigkeiten nachweisen [5]. Da dieser Prozess bereits viele Jahre vor der Plaque-Entwicklung einsetzt, können wir die klinische Manifestation sehr viele Jahre früher als die Amyloid-nachweisenden Ansätze vorhersagen (**Abb. 1**).

Der *immuno*-Infrarotsensor (iRS)

Im infraroten Spektralbereich absorbieren α -helikale und ungefaltete Proteine in einem Bereich zwischen 1655 und 1640 cm^{-1} , während β -Faltblatt-haltige Proteine um 1622 cm^{-1} absorbieren. Diese Amid-I-Absorptionsbanden reflektieren die struktursensitive C=O-Peptidgerüstschwingung des A β -Peptids. Damit können α -helikale/ungefaltete von β -Faltblatt-reichen Sekundärstrukturen mithilfe von Infrarotabsorptionsmessungen unterschieden werden. Um aber die im Blut sehr niedrig konzentrierten A β -Peptide selektiv messen zu können, müssen diese mithilfe eines Antikörpers aus dem Blut „herausgefischt“ werden (**Abb. 2A**). Die Fänger-Antikörper sind kovalent an der Oberfläche des Infrarotsensors gebunden (**Abb. 2A**). Dieser beruht auf der ATR(*attenuated total reflection*)-Technik: Der absorbierende Infrarotstrahl wird mithilfe von Totalreflexionen an der Oberfläche durch einen Kristall geleitet. An der Oberfläche dringt eine evaneszierende Welle einige Hundert Nanometer in das umgebende Medium ein. Dadurch wird nur die Absorption einer dünnen Schicht gemessen. Auf diese Weise kann die große Hintergrundabsorption der Gesamtprobe auf der Oberfläche hinreichend klein gehalten werden und so die schwierige Messung von wässrigen Körperflüssigkeiten im infraroten Spektralbereich ermöglichen. Zur Subtraktion der Hintergrundabsorption wird eine Differenzmessung vor und nach der A β -Anbindung durchge-



▲ **Abb. 2:** Das Messprinzip des *immuno*-Infrarotsensors (iRS). **A**, Schematische Darstellung des *immuno*-Infrarotsensors (iRS). Auf der Sensoroberfläche werden kovalent A β -spezifische Antikörper (grün) gebunden. Eine unspezifische Anbindung wird durch eine blockierende Substanz verhindert (blau). Der Infrarotstrahl misst die Absorption der angelagerten Probe vor und nach der Probenanbindung. Durch Differenzbildung erhält man nur die struktursensitive Amid-I-Bande der aus dem Blut extrahierten A β -Isoformen. **B**, Das Maximum der Amid-I-Bande reflektiert als Strukturbiomarker die mittlere Sekundärstrukturverteilung des A β -Peptids. Bei Alzheimer-Erkrankten (AD) dominieren die β -Faltblatt-haltigen Isoformen und verschieben das Messsignal unterhalb des festen Schwellenwertes von 1642 cm^{-1} .

führt. Durch die Differenzbildung werden die um mehrere Größenordnungen kleineren Absorptionsbanden der A β -Peptide aus der Hintergrundabsorption selektiert. Die Empfindlichkeit dieser Differenztechnik haben wir über sehr viele Jahre vorangetrieben und konnten insbesondere mit der zeitaufgelösten Step-Scan-FTIR-Differenz-Spektroskopie sehr kleine Absorptionsänderungen weniger funktioneller Gruppen mit einer Nanosekunden-Zeitauflösung aus der Hintergrundabsorption des Gesamtproteins selektieren [6].

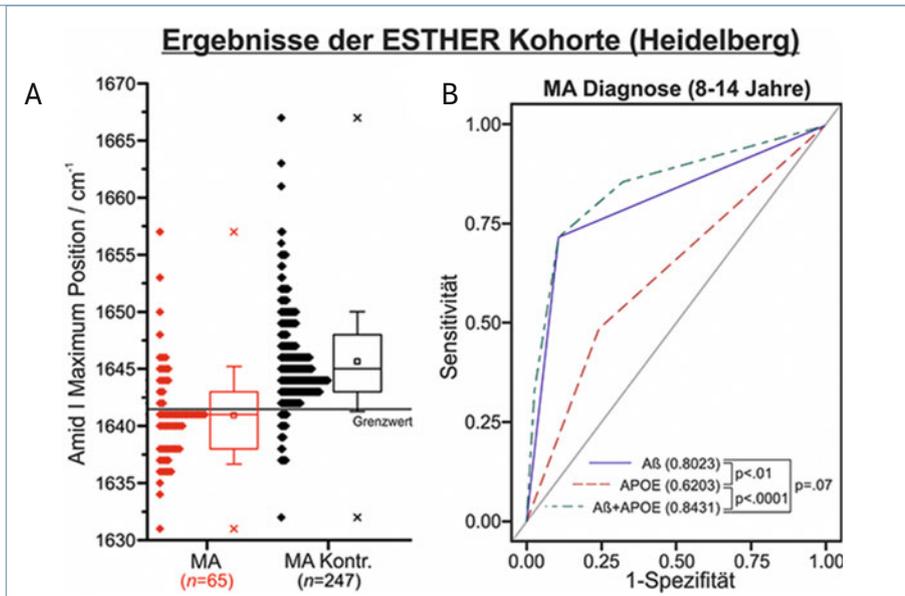
Das Maximum der struktursensitiven Amid-I-Bande der A β -Peptide reflektiert die mittlere Sekundärstrukturverteilung aller aus dem Blut extrahierten A β -Isoformen (**Abb. 2B**). Wir haben experimentell einen Schwellenwert gefunden, der Alzheimer-Erkrankte und Nicht-Erkrankte voneinander trennen kann (**Abb. 2B**, [7]). Dieser Schwellenwert hat für alle untersuchten Kohorten eine bereits vorher festgelegte feste Größe und ist damit prädiktiv im Gegensatz zu den variierenden Schwellenwerten der ELISA-Konzentrationsmessungen [8].

In einer ersten *discovery*-Studie haben wir Alzheimer-Patienten und Kontroll-Probanden aus Essen (Jens Wiltfang) mittels iRS untersucht [7]. In der Rückenmarksflüssigkeit wurde eine Sensitivität von 94 Prozent bzw. eine Spezifität von 88 Prozent erzielt. Damit haben wir gezeigt, dass wir mit dem iRS die Alzheimer-Erkrankung nachweisen können. Im nächsten Schritt konnten wir zeigen, dass der Test auch empfindlich genug für einen Bluttest ist. In Plasmaproben derselben Patienten konnten wir MA mit einer Sensitivität von 75 Prozent und einer Spezifität von 88 Prozent nachweisen [7]. In einer darauffolgenden Validierungsstudie mit einer verbesserten und automatisierten Apparatur

und durch zusätzliche Messung der Fehlfaltung des Tau-Proteins konnten wir die Sensitivität auf 87 Prozent und die Spezifität auf 97 Prozent verbessern [9].

Von besonderem Interesse ist allerdings die Identifikation sehr früher Stadien. Im frühen Prodromalstadium liegen bereits Amyloid-Plaques vor, jedoch sind die Probanden kognitiv noch nicht eingeschränkt. Dazu haben wir die schwedische BioFINDER-Kohorte (Oskar Hansson) vermessen. Das Prodromalstadium wurde mit PET-Scan und CSF-A β 42/A β 40-Messungen diagnostiziert. Wir konnten in dieser Studie zeigen, dass die Fehlfaltung des A β -Peptids im Blut überraschenderweise mit der Belastung des Gehirns durch Amyloid-Plaques korreliert [10]. Diese Korrelation war ein wichtiges Ergebnis, weil zu diesem Zeitpunkt Bluttests noch sehr umstritten waren. Ebenfalls konnte auch für das A β 42/A β 40-Verhältnis im Blut die Korrelation zum PET-Scan nachgewiesen werden [3, 4]. Nach Jahren der Kontroverse ist es jetzt zweifelsfrei, dass man die Alzheimer-Erkrankung mithilfe von Amyloid- β als Biomarker im Blut zuverlässig nachweisen kann.

Im nächsten Schritt haben wir untersucht, ob wir bei Gesunden die klinische Manifestation vorhersagen können. Mithilfe von Blutproben aus der Heidelberger ESTHER-Kohorte (Hermann Brenner) wurden Personen aus der symptomfreien Normalbevölkerung untersucht [10]. Dort wurden in den Jahren 2000 bis 2002 Blutplasma-Proben von rund 10.000 Teilnehmern gesammelt (*baseline*). Bei diesen Teilnehmern hatte ihr jeweiliger Hausarzt keine Auffälligkeiten beobachtet. In dieser Kohorte wurden im Laufe der longitudinalen Untersuchung (15 Jahre *follow-up*-Studie) 65 Probanden zum Zeitpunkt unserer Analyse identifiziert, die an Alzhei-



▲ Abb. 3: Ergebnisse der ESTHER-Kohorte (Heidelberg). **A**, *Baseline*-Analyse der Plasmaproben aus der ESTHER-Kohorte [10]. In Rot sind die Messsignale der später erkrankten Alzheimer-Patienten (AD), in Schwarz die der Kontrollgruppe (AD-Kontrolle) gezeigt. Die Bandenlage oberhalb (gesund) oder unterhalb (krank) des Schwellenwertes kann die spätere klinische Manifestation gut vorhersagen. **B**, ROC (*receiver operating characteristic*)-Kurve des Strukturbiomarkers, des APOE und des Panels für Personen, bei denen sich 8–14 Jahre nach Beginn der Studie die Erkrankung manifestiert hat [11]. Mit einem AUC (*area under the curve*)-Wert von 0,84 kann das Panel die Manifestation der Alzheimer-Erkrankung bis zu 8–14 Jahre vor der klinischen Konversion mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhersagen.

mer-Demenz verstorben waren. Von diesen haben wir die *baseline*-Blutplasmaproben analysiert und mit den *baseline*-Plasmaproben von entsprechenden Kontroll-Teilnehmern verglichen, die genau nach Alter, Geschlecht und Bildungsgrad ausgewählt wurden (**Abb. 3A**). Insgesamt wurden 874 Probanden verblindet gemessen. Wir konnten die verstorbenen Alzheimer-Patienten in dieser Studie mit einer Genauigkeit von 87 Prozent von Nicht-Erkrankten unterscheiden. Durch die Hinzunahme des genetischen Risikofaktors Apolipoprotein E-ε4 (APOE-ε4) konnte die klinische Alzheimer-Erkrankung bis zu 14 Jahre vor der klinischen Manifestation mit einer *area under the curve* (AUC) von 0,84 vorhersagen (**Abb. 3B**, [11]). Das ist ein vielversprechendes Ergebnis, das wir derzeit an großen Kollektiven weiter validieren.

Ein vordringliches Ziel unserer derzeitigen Arbeiten ist es zusätzlich, diese Techniken soweit zu standardisieren und alltagstauglich zu machen, dass in naher Zukunft auch andere Forscher den iRS in ihren Studien einsetzen können [12].

Zusammenfassend kann man sagen, dass wir einen neuen Alzheimer-Biomarker entwickelt haben, der als Strukturmarker in einem Biomarker-Panel die klinische Manifestation von Alzheimer in einem Bluttest präzise in symptomlosen Personen vorhersagen kann. Damit können wir ein mächtiges Werkzeug im Kampf gegen die Alzheimer-

Erkrankung zur Verfügung stellen. Für klinische Studien können wir heute bereits Hochrisikopersonen mit einem einfachen und kostengünstigen Bluttest identifizieren.

Ebenfalls können wir mit dem iRS die Wirkung potenzieller Medikamente in der Rückenmarksflüssigkeit oder im Blut testen (*companion diagnostics*) [13].

Zurzeit arbeiten wir weiterhin daran, den Ansatz auch auf andere neurodegenerative Erkrankungen zu erweitern; z. B. beobachtet man bei der Parkinson-Erkrankung die Fehlfaltung des α -Synukleins. Damit könnten möglicherweise Parkinson-Patienten besser stratifiziert werden. ■

Literatur

- [1] Sevigny J, Chiao P, Bussière T et al. (2016) The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature* 537:50–56
- [2] Verberk IMW, Slot RE, Verfaillie SCJ et al. (2018) Plasma amyloid as prescreeper for the earliest Alzheimer pathological changes. *Ann Neurol* 84:648–658
- [3] Schindler SE, Bollinger JG, Ovod V et al. (2019) High-precision plasma β -amyloid 42/40 predicts current and future brain amyloidosis. *Neurology* 93:e1647–e1659
- [4] Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL et al. (2018) High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature* 554:249–254
- [5] Nabers A, Ollesch J, Schartner J et al. (2016) An infrared sensor analysing label-free the secondary structure of the A β peptide in presence of complex fluids. *J Biophotonics* 9:224–234
- [6] Garczarek F, Gerwert K (2006) Functional waters in intraprotein proton transfer monitored by FTIR difference spectroscopy. *Nature* 439:109–112
- [7] Nabers A, Ollesch J, Schartner J et al. (2016) Amyloid- β secondary structure distribution in cerebrospinal fluid and blood measured by an immuno-infrared-sensor: a biomarker candidate for Alzheimer's disease. *Anal Chem* 88:2755–2762
- [8] Mattsson N, Andreasson U, Persson S et al. (2011) The Alzheimer's Association external quality control program for cerebrospinal fluid biomarkers. *Alzheimers Dement* 7:386–395.e6
- [9] Nabers A, Hafermann H, Wiltfang J et al. (2019) A β and tau structure-based biomarkers for a blood- and CSF-based two-step recruitment strategy to identify patients with dementia due to Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)* 11:257–263
- [10] Nabers A, Perna L, Lange J et al. (2018) Amyloid blood biomarker detects Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 10:e8763
- [11] Stocker H, Nabers A, Perna L et al. (2020) Prediction of Alzheimer's disease diagnosis within 14 years through A β misfolding in blood plasma compared to APOE4 status, and other risk factors. *Alzheimer's Dement* 16:283–291.
- [12] Budde B, Schartner J, Tönges L et al. (2019) Reversible immuno-infrared-sensor for the detection of Alzheimer's disease related biomarkers. *ACS Sens* 4:1851–1856
- [13] Schartner J et al. (2017) An ATR-FTIR sensor unraveling the drug intervention of methylene blue, Congo red, and berberine on human Tau and A β . *ACS Med Chem Lett* 8:710–714

Funding: Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Klaus Gerwert
Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstraße 150
D-44801 Bochum
gerwert@bph.ruhr-uni-bochum.de

AUTOREN



Klaus Gerwert

1975–1980 Physikstudium (Diplom), Universität Münster. 1981–1985 Promotion in biophysikalischer Chemie, Universität Freiburg. 1986–1989 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut (MPI) für molekulare Physiologie, Dortmund. 1990 *Visiting Investigator* am Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA. 1991–1993 Heisenberg-Stipendiat, MPI und Scripps. 1993 Habilitation in Physikalischer Chemie, Universität Bielefeld. Seit 1993 Professor und Leiter des Lehrstuhls für Biophysik, Ruhr-Universität Bochum. 2004–2016 Sprecher des SFB 642. 2009–2014 externer Direktor am Max-Planck-Partnerinstitut, PICB, Shanghai, China. 2008–2017 Fellow der Max-Planck-Gesellschaft. Seit 2014 Gründungsdirektor des Zentrums für Protein-Diagnostik (PRODI), Ruhr-Universität Bochum.



Julia Stockmann

2011–2014 Bachelorstudium Biowissenschaften, Universität Münster. 2014–2016 Masterstudium Biologie, Ruhr-Universität Bochum. Seit 2016 Promotionsstudentin in der Biophysik und am Zentrum für Protein-Diagnostik (PRODI), Fakultät für Biologie und Biotechnologie, Ruhr-Universität Bochum.