

**Zusammenhang zwischen Liquormarkern des
Cholesterinmetabolismus und der
Alzheimerpathologie sowie dem kognitiven Abbau
über die Zeit**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Tabea Urte Jahn

aus Göttingen

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. rer. nat Dieter Lütjohann
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Klockgether

Tag der Mündlichen Prüfung: 17.01.2024

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. med. Gunther Hartmann

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	5
1.1	Einleitung	5
1.2	Material und Methoden	11
1.3	Ergebnisse	18
1.4	Diskussion	23
1.5	Zusammenfassung	29
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	30
2.	Veröffentlichung	36
	Abstract	36
	Introduction	37
	Materials and Methods	37
	Results	38
	Discussion	39
	References	42
3.	Danksagung	44

Abkürzungsverzeichnis

AD	Alzheimer Demenz
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Precursor Protein
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMI	Body Mass Index
CDR	Clinical Dementia Rate
CDRSoB	CDR Sum of Boxes
DSM-5	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - 5 th edition
GC-MSD	Gaschromatographie-Massenselektive Detektion
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems - 10 th edition
KE	Patientengruppe mit kognitiven Einschränkungen (kognitiv eingeschränkt)
KN	Kontrollgruppe ohne kognitive Einschränkungen (kognitiv normal)
MCI	mild cognitive impairment; leichte kognitive Beeinträchtigung
MMST	Mini Mental Status Test
SIM	Selected Ion Modus
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Alzheimer Erkrankungen generell

2010 wurde weltweit bei mehr als 35 Millionen Menschen eine Demenz diagnostiziert. Man erwartet, dass diese Zahl sich fast alle 20 Jahre verdoppelt und 2050 ungefähr 115 Millionen Menschen erkrankt sein könnten (Prince et al., 2013). Die Alzheimer Demenz (AD) ist mit 70 % der Fälle die häufigste Form der Demenz (Duron und Hanon, 2008) und zählt zu den größten medizinischen Herausforderungen des 21. Jahrhunderts (Scheltens et al., 2016). Gedächtnisveränderungen, Orientierungslosigkeit, Sprachverlust, verminderte Leistungsfähigkeit und Persönlichkeitsveränderungen zählen zu den klassischen Symptomen. Mit der Zeit vermindert sich die Lebensqualität der Patienten, endet in totaler Abhängigkeit und führt meist zu Klinik- oder Heimeinweisung.

Alzheimer Pathologien

Zu den neuropathologischen Anzeichen von AD gehören die Ansammlung und Ablagerung von β -Amyloid Peptidfragmenten (A β), sogenannten A β -Plaques und von durch Hyperphosphorylierung der Tau Proteine (p-Tau) entstandene Neurofibrillenbündel (Loera-Valencia et al., 2019). Die Prozesse, die zur Bildung der Plaques und Tau-Bündel führen, können schon einige Jahre bis Jahrzehnte bevor sich die AD klinisch manifestiert entstehen. Meist startet es mit dem Abbau der Neuronen im entorhinalen Cortex, der eine wichtige Rolle in der Gedächtnisbildung spielt. So lassen sich die frühen Symptome wie eine kognitive Beeinträchtigung erklären (Mathys et al., 2017). Das Entstehen von AD lässt sich allerdings nicht nur einer bestimmten Ursache zuordnen, sondern es werden vielmehr einige Faktoren wie Diabetes, Hypercholesterinämie, Hyperhomocysteinämie, mentale Inaktivität, Depression, Rauchen, Adipositas und geringe Bildung als Risikofaktoren für AD gesehen (Esiri und Chance, 2012).

Neuropsychologische Tests für kognitive Einschränkungen

Bisher wurden neurodegenerative Erkrankungen mittels der Kriterien des Klassifikationssystems „Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - 5th edition“ (DSM-5), der „International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems - 10th edition“ (ICD-10) und einer Reihe von kognitiven Tests diagnostiziert (Sachdev et al., 2014). Hierzu zählen unter anderem der Mini Mental Status Test (MMST) und die Clinical Dementia Rate (CDR) sowie die CDR Sum of Boxes (CDRSoB). Der MMST wurde 1975 entwickelt, um einen in der Routineuntersuchung verfügbaren Test zu haben, mit dem sich eine kognitive Einschränkung schnell und zuverlässig darstellen lässt (Folstein et al., 1975). Er überprüft Orientierung, Aufmerksamkeit und das Gedächtnis, sowie Benennung, Befolgen von Anweisungen, Abzeichnen und Schreiben. Die maximale Punktzahl liegt bei 30. Die CDR wurde im Jahre 1982 von Hughes etabliert (Hughes et al., 1982) und später von Morris modifiziert (Morris, 1993). Die CDR ordnet neben den kognitiven Einschränkungen auch die funktionellen Einschränkungen ein, indem diese in den sechs Bereichen Gedächtnis, Orientierung, Urteilsvermögen, soziales Leben, Hobbies und Körperpflege anhand eines Fragebogens erhoben werden. Über einen bestimmten Bewertungsalgorithmus werden am Ende globale Werte von 0 bis 3 erreicht, wobei eine $CDR < 0,5$ keine kognitiven Einschränkungen und eine $CDR = 3$ dagegen schwere dementielle Symptome darstellt. Ein CDR von 0.5 entspricht einer leichten kognitiven Störung (MCI). Die CDRSoB beschreibt die Summe der Ergebnisse in den einzelnen Bereichen und wird als detaillierter und einfacher anzuwenden beschrieben, da kein Algorithmus notwendig ist. Außerdem lässt sich eine Veränderung über die Zeit mittels des CDRSoB besser darstellen (O'Bryant et al., 2008).

Biomarker der AD

Mittlerweile wird eine Alzheimer Erkrankung nicht mehr nur klinisch über neuropsychologische Tests diagnostiziert, sondern auch über die der AD zugeordneten Biomarker im Liquor cerebrospinalis (Liquor). Zu diesen Biomarkern gehören neben den Konzentrationen der β -Amyloid Peptidfragmente 1-42 ($A\beta_{1-42}$) und 1-40 ($A\beta_{1-40}$) auch die Konzentrationen von p-Tau und Gesamt-Tau (Tau) im Liquor. Die β -Amyloid Peptidfragmente entstehen als Spaltprodukte durch die Prozessierung des Amyloid Precursor Proteins (APP) über spezifische Sekretasen. Bei der Prozessierung gibt es

einen amyloidogenen Weg über β -Sekretasen bei denen sAPP β entsteht, das über γ -Sekretasen weiter in A β_{1-40} und das stärker neurotoxische A β_{1-42} gespalten wird. Auf dem nicht-amyloidogenen Weg hingegen entsteht über α -Sekretasen das sAPP α , das extrazellulär freigegeben wird (Popp et al., 2012). Die Assoziation zwischen Liquorkonzentrationen und Ablagerungen im Gehirn ist gegensätzlich, so dass eine geringe A β_{1-42} -Konzentration im Liquor eine erhöhte Aggregation im Gehirn widerspiegelt.

Tau-Proteine befinden sich im Inneren der Zelle und sind in physiologischer Weise für die Stabilität sowie für die Versorgung der Neuronen verantwortlich. Kommt es zur Zerstörung von Neuronen im Gehirn, werden die Tau-Proteine freigesetzt. Eine erhöhte Konzentration im Liquor spiegelt daher den Grad der Neurodegeneration wider. P-Tau entsteht durch Phosphorylierung der Tau Proteine und führt so zu einer Dysfunktion der Zelle. Erhöhte Werte an P-Tau im Liquor zeigen die Pathologien im Gehirn an und können mit AD in Verbindung gebracht werden.

Die Verhältnisse der Biomarker untereinander, Tau/A β_{1-42} und p-Tau/A β_{1-42} , sind als Marker für das kombinierte Auftreten von β -Amyloid-Ablagerungen und abnormalen Tau-Proteinen festgelegt. Anhand dieses Verhältnisses wurde in unserer Analyse das Vorliegen einer Demenz vom Alzheimer-Typ mit $p\text{-Tau}/A\beta_{1-42} > 0.0779$ definiert (Popp et al., 2017).

Cholesterinstoffwechsel

Cholesterin ist ein essentieller Bestandteil der Zellmembranen, des Myelins und Vorläufer der Oxysterine, der Gallensäuren und einiger Hormone. Zwei Drittel des im Körper benötigten Cholesterins wird endogen synthetisiert. Die Endprodukte der Cholesterinbiosynthese über den Mevalonsäurestoffwechselweg sind alle steroidal Natur. Cholesterin kann auf zwei unterschiedlichen Stoffwechselwegen aus Lanosterin synthetisiert werden. Im Bloch-Stoffwechselweg führt dieser über Desmosterin (linke Seite in Abb.1) und im Kandutsch-Russel-Stoffwechselweg über 24. 25-Dihydrolanosterin und Lathosterin (rechte Seite in Abb.1) zu Cholesterin. Im Bloch-Stoffwechselweg besitzen alle Sterine an Position C-24 eine Doppelbindung in der Seitenkette, wohingegen auf der gegenüberliegenden Seite des Stoffwechselweges die Doppelbindungen aller Sterine mittels der 24-Dehydrocholesterinreduktase (24DHCR), auch Seladin-1 genannt, hydriert sind. Cholesterin kann dann weiter über Cytochrome P450 (CYP450) Enzyme zu

den Oxysterinen 24S-Hydroxycholesterin (24S-OHC) und 27-Hydroxycholesterin (27-OHC) oder aber mittels Oxidoreduktasen zu 5α -Cholestanol abgebaut werden. Die Cholesterin-24S-Hydroxylase Cyp46A1, welche für die Synthese von stereospezifischem 24S-OHC verantwortlich ist, wird beim Menschen ausschließlich in den Neuronen im Zentralen Nervensystem (ZNS) gebildet (Lund et al., 1999). Das 27-OHC kann mittels der Sterin-27-Hydroxylase CYP27A1 ubiquitär in den Mitochondrien fast aller Zellen gebildet werden. Die Oxysterine werden im Weiteren zu Gallensäuren abgebaut.

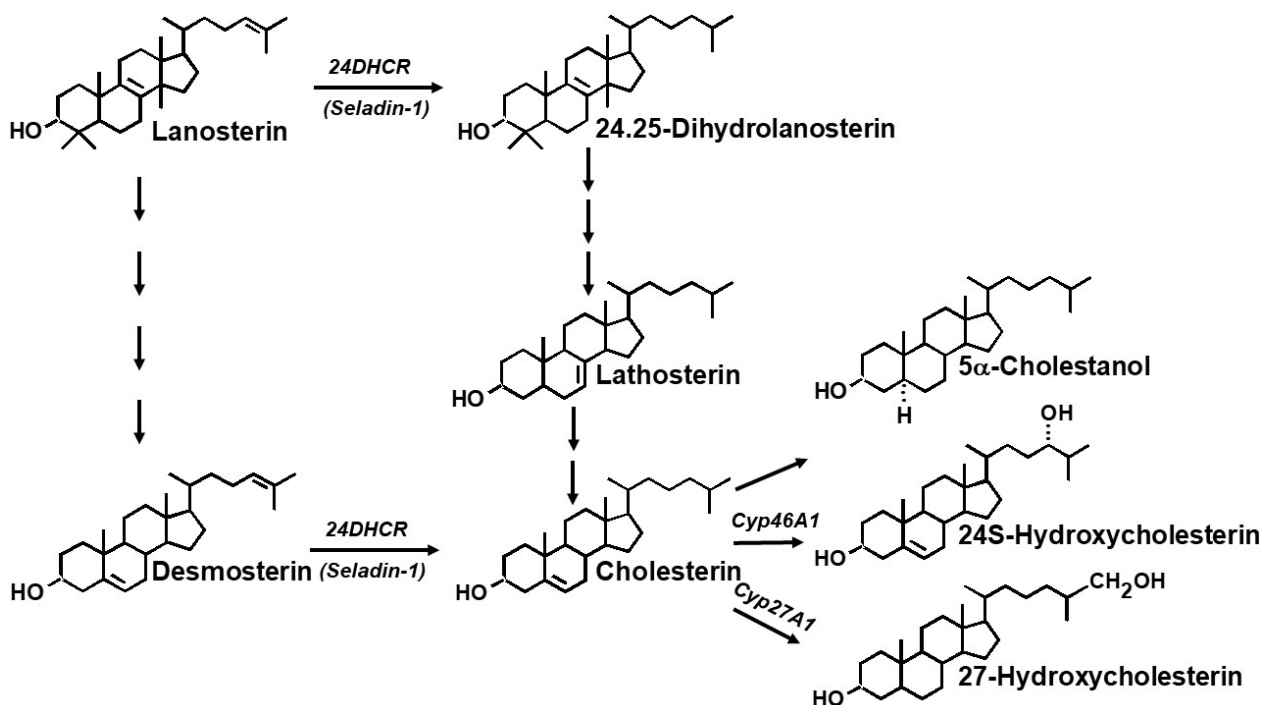


Abb. 1: Cholesterinbiosynthese (steroidaler Anteil), Abbau zu 5α -Cholestanol sowie zu den Oxysterinen 24S-Hydroxycholesterin und 27-Hydroxycholesterin. 24DHCR, 24-Dehydrocholesterinreduktase; CYP27A1, Sterol-27-Hydroxylase; CYP46A1, Cholesterin-24S-Hydroxylase.

Zerebraler Cholesterinstoffwechsel

Das Besondere in Bezug auf den zerebralen Cholesterinstoffwechsel ist die Tatsache, dass sowohl peripheres als auch Cholesterin aus dem ZNS die Blut-Hirn-Schranke (BHS) nicht überwinden kann und das im Gehirn benötigte Cholesterin ausschließlich intrazerebral oder in situ synthetisiert wird.

Die Oxysterine spielen dabei eine besondere Rolle. Das 24S-OHC ist das Eliminierungsprodukt des Cholesterins. Es tritt über die BHS in die peripheren Gefäße und in geringem Maße (ca. 1-2 %) über die Hirn-Liquorschranke in den Liquor (Lütjohann et al., 1996; Lütjohann und von Bergmann, 2003) Das neurotoxische 27-OHC, ein peripheres Abbauprodukt des Cholesterins, kann dahingegen aus der Peripherie über die BHS ins Gehirn gelangen. Dort wird es zu 7α -Hydroxy-3-oxo-4-cholestensäure umgewandelt, welches dann wiederum in die Peripherie zurückgelangt (Meaney et al., 2007). Das Verhältnis von 24S-OHC/ 27-OHC im Liquor kann daher genutzt werden, um den Cholesterinstoffwechsel im Gehirn mit dem Cholesterinstoffwechsel in der Peripherie in Verbindung zu bringen (Hughes et al., 2013).

Die Phytosterine Campesterin und Sitosterin sind in der Natur vorkommende Cholesterinanaloga (Abb. 2). Sie werden ausschließlich mit der Nahrung dem Körper zugeführt und gelangen über die Lymphe zur Leber und somit ins Blut. Pflanzliche Sterine können im Gegensatz zu Cholesterin die BHS überwinden und auch über die Blut-Liquorschranke in den Liquor gelangen (Burg et al., 2013).

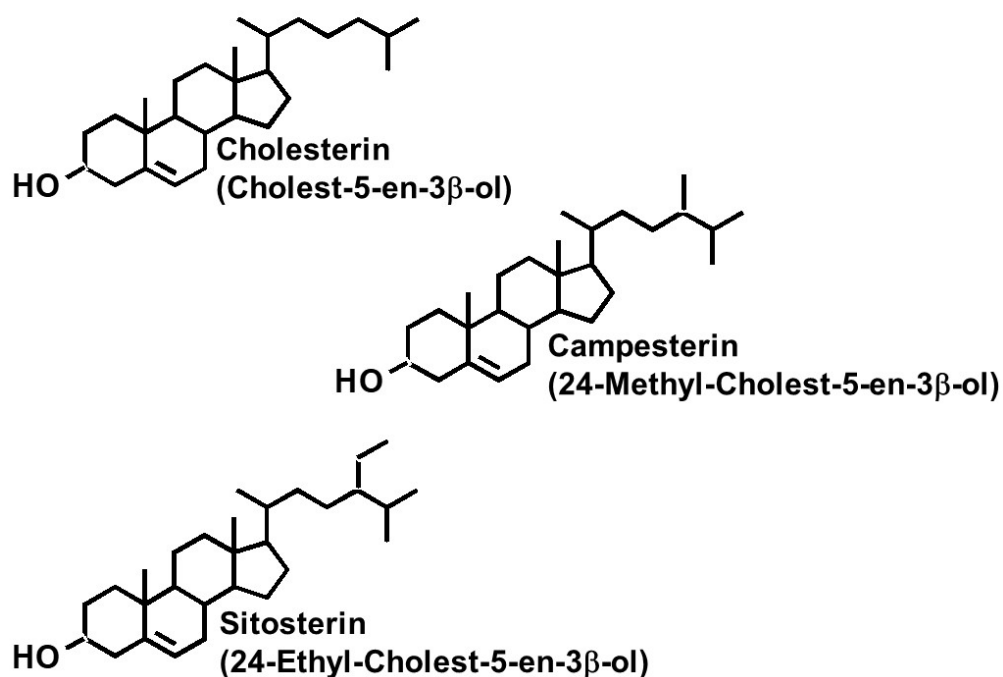


Abb. 2: Cholesterin und seine Strukturanaloga aus der Pflanzenwelt: Campesterin und Sitosterin

Das Verhältnis des Albumingehaltes im Liquor zum Albumingehalt im Serum bestimmt die Permeabilität der BHS (Bowman et al., 2018). Erhöhte Gehalte an pflanzlichen Sterinen

im Liquor weisen auf eine erhöhte Permeabilität der pflanzlichen Sterine bei defekter Blut-Hirn- oder Blut-Liquor-Schranke hin oder auf iatrogene Kontamination des Liquors durch Blutzellen.

Alzheimer und Cholesterin

Ein Zusammenhang zwischen AD und Lipiden wurde bereits in mehreren Studien gezeigt (Cermenati et al., 2015; Mielke und Lyketsos, 2006). Insbesondere der Zusammenhang zwischen Veränderungen im Cholesterinstoffwechsel und AD war Gegenstand früherer Studien (Anstey et al., 2008). In Tierstudien wurde ein Einfluss von erhöhten Cholesterinwerten, induziert durch erhöhte Cholesterinzufuhr, auf die Phosphorylierung von Tau beobachtet (Ullrich et al., 2010). Zudem sollen bei AD erhöhte Liquorkonzentrationen von Cholesterin, 24S-OHC und 27-OHC in Verbindung mit einer erhöhten Produktion von sAPP stehen (Brown et al., 2004; Popp et al., 2012).

Es wurden auch schon Korrelationen zwischen veränderten Konzentrationen der Oxysterine, 24S-OHC und 27-OHC, und der A β -Produktion im Gehirn gefunden (Famer et al., 2007; Marwarha et al., 2013; Popp et al., 2012; Prasanthi et al., 2009)

Erhöhte Liquorkonzentrationen an 24S-OHC konnten zudem mit dem Auftreten von AD (Björkhem et al., 2006) sowie mit Tau Pathologien und Neurodegeneration in Verbindung gebracht werden (Popp et al., 2013)

Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist, die Verbindung bzw. den Einfluss des Cholesterinstoffwechsels sowie der, dem Cholesterin sehr ähnlichen, pflanzlichen Sterine auf AD und seine einzelnen Biomarker und den klinischen Verlauf der Erkrankung über die Zeit zu untersuchen. Diese Arbeit wurde unter den Hypothesen erstellt, dass Metabolite des zerebralen Cholesterinstoffwechsels und pflanzliche Sterine mit dem Auftreten von AD, mit den im Liquor gefundenen Biomarkern sowie dem Abbau kognitiver Fähigkeiten über die Zeit korrelieren.

1.2 Material und Methoden

Studiendesign

In dieser Studie wurden Patientinnen und Patienten der Abteilung für Psychiatrie und klinische Neurowissenschaften des Universitätsklinikums Lausanne, Schweiz, untersucht.

Zur Bestimmung des CDR sowie der CDRSoB und des MMST unterzogen sich 142 Teilnehmer einer kompletten klinisch-neuropsychologischen Untersuchung (Morris, 1993). Es handelt sich hier um validierte und routinemäßig genutzte Untersuchungen zur genauen Charakterisierung des neuropsychologischen Status. Diese Untersuchungen wurden durch erfahrene Neuropsychologen und Psychiater in der Abteilung für Psychiatrie und klinische Neurowissenschaften des Universitätsklinikums Lausanne, Schweiz durchgeführt. Außerdem wurden die Aktivitäten des täglichen Lebens dokumentiert (Lawton und Brody, 1969). Ursprünglich wurden die Patienten untersucht, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Body Mass Index und Liquor-Markern der Alzheimer Demenz zu beurteilen (Mathys et al., 2017). Anhand des CDR Wertes einerseits und der Höhe des p-Tau/ A β ₁₋₄₂ Quotienten andererseits wurde die Untersuchungskohorte in zwei Subgruppen unterteilt. Zunächst in die Gruppe der Patienten mit kognitiven Einschränkungen (KE), festgelegt durch eine CDR > 0,5 sowie in die Gruppe der kognitiv normalen Personen (KN), die weder jemals zuvor (anamnestisch) noch zu dem Zeitpunkt der Tests eine kognitive Einschränkung besaßen (CDR = 0) (Mathys et al., 2017). In der Gruppe der KE wurden Patienten mit leichten kognitiven Gedächtnisstörungen (MCI) und Patienten mit Alzheimer Demenz (AD) zusammengefasst (Mathys et al., 2017). Die Teilnehmer der KN-Gruppe wurden durch Aufrufe in Zeitungen sowie durch Mundpropaganda rekrutiert. Ausgeschlossen wurden alle Teilnehmer mit Komorbiditäten, die eine kognitive Beeinträchtigung hervorrufen könnten.

Probenentnahmen

Jedem dieser Patienten wurde Liquor zur Analyse der Biomarker $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-40}$, Tau und p-Tau entnommen. Die Liquorpunktion wurde morgens nach nächtlichem Fasten - für mindestens 10 Stunden - durchgeführt. Etwa 10 - 12 ml des Liquors wurden entnommen, bei 4 °C zentrifugiert, aliquotiert und bei -80 °C bis zur Analyse eingefroren (Popp et al., 2017).

Zusätzlich wurde den Patienten bei jeder Visite im Nüchternzustand eine Serumprobe für die klinisch-chemische Routine sowie zur Bestimmung des Albumins im klinisch-chemischen Labor des Universitätsspitals in Lausanne, Schweiz, entnommen. Ferner wurde zur ApoE-Genotypisierung eine Vollblutprobe entnommen.

Analyse der AD Biomarker

Die Analyse der o.g. Biomarker erfolgte in der Abteilung für Labormedizin des Universitätsspitals in Lausanne, Schweiz (Folstein et al., 1975). Die Konzentrationen der β -Amyloid Peptidfragmente $A\beta_{1-42}$ und $A\beta_{1-40}$, Tau und p-Tau wurden mittels spezifischer Immunoassays (ELISAs) gemessen. Hierzu wurden Assays der Firmen Fujirebio, Gent, Belgien und IBL International, Hamburg, verwendet.

Das Verhältnis von p-Tau/ $A\beta_{1-42}$ bestimmte dann die Differenzierung in die Gruppe der Patienten mit Alzheimer Demenz, mit einem p-Tau/ $A\beta_{1-42} > 0,0779$, und in die Kontrollgruppe (p-Tau/ $A\beta_{1-42} < 0,0779$) (Popp et al., 2017).

Die Analysen oben genannter Parameter aus Liquorproben sowie die klinischen und neuropsychologischen Tests wurden nach etwa 18 und 36 Monaten im Rahmen der Nachuntersuchung wiederholt.

ApoE-Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte ebenfalls im Zentrallabor des Universitätsspitals in Lausanne, Schweiz (Folstein et al., 1975).

Analyse der Liquorkonzentrationen der Sterine

Die Liquorkonzentrationen von Cholesterin, seines 5α -gesättigten Metaboliten 5α -Cholestanol, der Oxysterine 24S- und 27-Hydroxycholesterin (24S- und 27-OHC), seiner Vorstufen Lanosterin, Dihydranosterin, Desmosterin und Lathosterin, sowie der pflanzlichen Sterine Campesterin und Sitosterin wurden mittels Gaschromatographie-Massenselektiver Detektion (GC-MSD) im Selected Ion Modus (SIM) im Labor für Spezielle Lipiddiagnostik des Instituts für klinische Chemie und klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Bonn bestimmt.

Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung erfolgte nach dem in Abb. 3 zusammengefassten Schema.

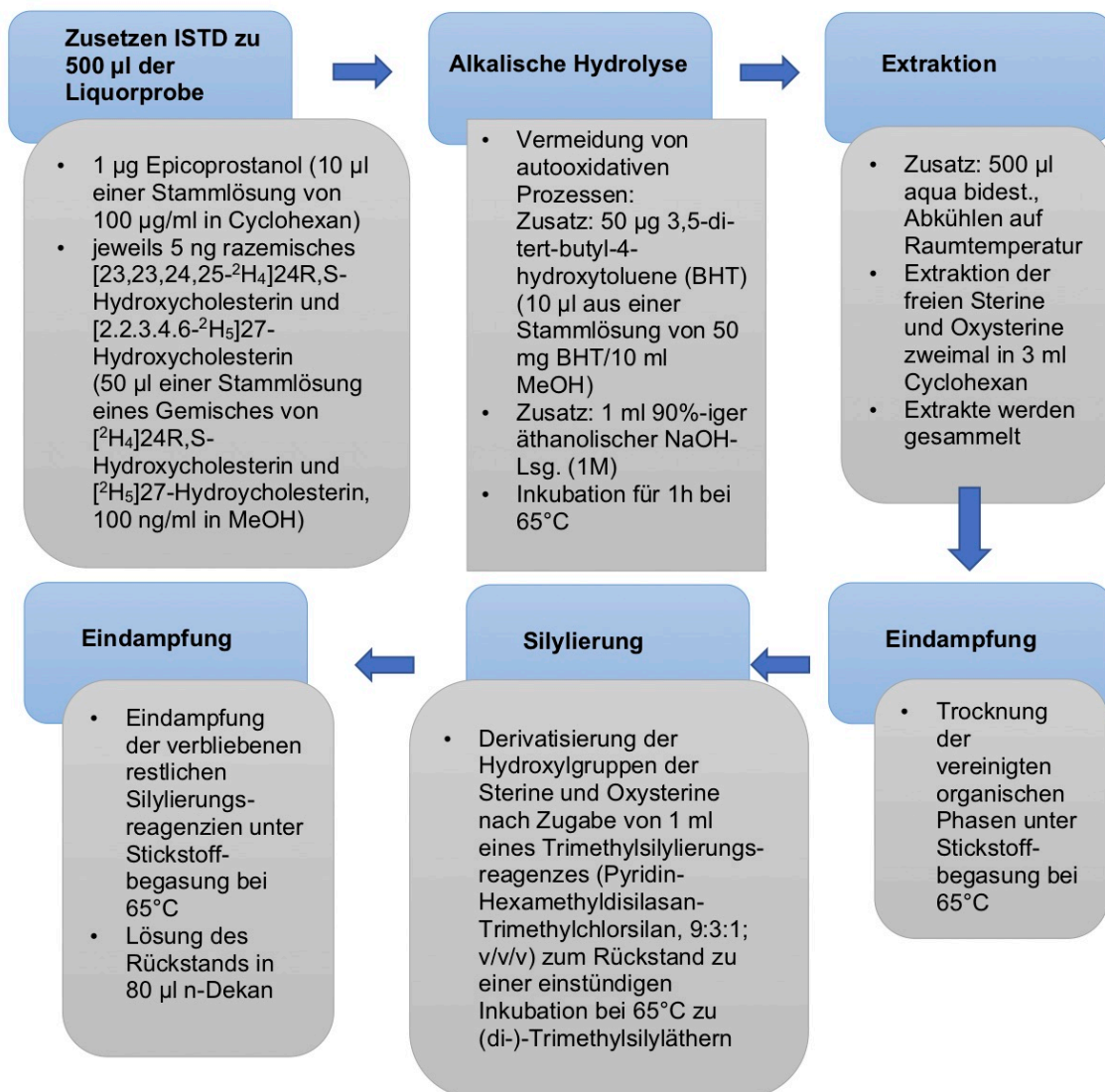


Abb. 3: Probenaufarbeitung

Analyseverfahren

Nach Silylierung der freien Hydroxygruppen der Sterine, des Stanols und der Oxysterine in (di-)Trimethylsilylether erfolgt die Trennung der (di-)OTMSí-Ether auf einer Chromatographiesäule [DB-5 Optima ((5 %-Phenyl)-methylpolysiloxane) (30 m x 0.25 mm Innendurchmesser x 0,25 µm Filmschichtdicke, Agilent Technologies, Waldbronn] mittels eines vorgegebenen Temperaturprogrammes (Start bei 150°C für 3min, dann Aufheizen mit 30°C/min auf 280°C und 23min Laufzeit bei 280°C, insgesamt Dauer: 30.33min) im Ofen des Gaschromatographen [Hewlett Packard Gaschromatograph (HP 7890), Agilent Technologies, Waldbronn]. Danach erreichen die silylierten Sterin-/Stanoether den MSD (HP 5977). Hier werden die einzelnen Moleküle auf spezifischen Massenfragmenten detektiert. Dies erhöht die Sensitivität und Spezifität gegenüber anderen Detektionsverfahren wie z.B. der Flammenionisationsdetektion.

In Tabelle 1 sind die gewählten Massen zur Detektion der Sterine und der Stanole und die jeweiligen Retentionszeiten dargestellt.

Zur Quantifizierung wurden Eichkurven erstellt, wobei Epicoprostanol sowie die mit stabilen Isotopen markierten Oxysterine als interne Standards verwendet wurden. Die Detektion und die Berechnungen erfolgen mittels Agilent MassHunter Software und eines im Labor entwickelten Quantifizierungsmakros. Die genaue Vorschrift zur o.g. Analytik ist in einem validierten Standardoperationsprotokoll hinterlegt und publiziert (Lütjohann et al., 2018).

Tab. 1: GC-MSD-spezifische Charakteristika der verschiedenen Analyseparameter

Substanz	Kategorie	Masse (m/z) ^a	Retentionszeit (min) ^b
Epicoprostanol	ISTD ^c	370	15,33
Cholesterin	Sterin	458	16,69
5 α -Cholestanol	Stanol	306	16,82
Desmosterin	Sterin	441	17,32
Lathosterin	Sterin	458	17,82
Campesterin	Sterin	382	18,78
22.23-Dihydrolanosterin	Sterin	395	19,87
Sitosterin	Sterin	486	21,00
Lanosterin	Sterin	393	21,01
[22.23.24.25- ² H ₄] 24S-OHC	ISTD	416	22,50
24S-OHC	Oxysterin	413	22,65
[2,2,3,4,6- ² H ₅] 27-OHC	ISTD	461	25,42
27-OHC	Oxysterin	456	25,58

^am/z = Masse pro Ladung, ^bRetentionszeiten in Minuten, ^cISTD= Interner Standard

Ethikvotum

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den aktuell geltenden Gesetzen und Vorschriften, einschließlich der Internationalen Leitlinie zur Harmonisierung und guten klinischen Praxis, die auf der Erklärung von Helsinki beruht, durchgeführt (Carlson et al., 2004). Das lokale Ethikkomitee in Lausanne genehmigte diese Studie (Nr.171/2013) und alle Teilnehmer oder ihre gesetzlichen Vertreter gaben eine schriftliche Einverständniserklärung ab.

Klinische Endpunkte

Um Zusammenhänge zwischen dem zerebralen Cholesterinstoffwechsel und der Alzheimer Demenz, bzw. seiner Biomarker und dem kognitiven Status, bzw. seinem Verlauf, zu beurteilen, wurden klinische Ereignisse wie z.B. Vorliegen einer AD als Endpunkte definiert. AD wurde durch $p\text{-Tau/ A}\beta_{1-42} > 0,0779$ definiert und die kognitiven Einschränkungen wurden anhand der Ergebnisse des CDR festgelegt, wobei ein $\text{CDR} > 0.5$ für unsere Untersuchung als eine kognitive Einschränkung definiert wurde.

Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit IBM SPSS Statistics in der Version 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, U.S.A.), entsprechend den Empfehlungen zum experimentellen Design und zur Analyse von Daten in der Pharmakologie, durchgeführt (Curtis et al., 2015). Ziel war die verschiedenen Hypothesen des Zusammenhanges zwischen dem Cholesterinstoffwechsel und (i) dem Auftreten von AD bzw. (ii) den Veränderungen der AD Pathologien wie der Ablagerung vom β -Amyloidfragmenten, dem Entstehen von Tafibrillen und dem Untergang der Neurone und (iii) den Veränderungen der kognitiven Fähigkeiten über die Zeit, zu untersuchen.

Die Studienkohorte wurde, wie bereits beschrieben, in unterschiedliche Subgruppen unterteilt und die folgenden statistischen Analysen entweder in der gesamten Studiengruppe oder in den einzelnen Subgruppen durchgeführt.

Gruppenanalysen

Zur genaueren Beschreibung der Subgruppen wurden der zweiseitige, ungepaarte T-Test für kontinuierliche Variablen (z.B. Alter, MMST, BMI, Konzentrationen der Sterine) und der Chi-Quadrat-Test für kategoriale Variablen (z.B. Geschlecht) genutzt. Die Ergebnisse wurden als Median (Interquartilabstand) dargestellt.

Korrelationsanalysen

In der Subgruppe der KN und KE wurden die Liquorkonzentrationen der Sterine und Oxysterine mittels Spearman's Rho-Test mit den klinischen Testergebnissen des MMST und CDRSoB korreliert.

In der gesamten Kohorte wurden mit dem zweiseitigen Pearson's Test die Korrelation zwischen den Konzentrationen einzelner Cholesterinmetabolite und den einzelnen Liquor AD Biomarkern, $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$, Tau und p-Tau verglichen.

Regressionsanalysen

In den Subgruppen der KN und KE wurden zur Beurteilung von möglichen Assoziationen zwischen den Liquorkonzentrationen der Cholesterinmetaboliten und der Höhe der kognitiven Einschränkung zu Beginn der Studie eine lineare Regressionsanalyse mit CDRSoB und MMST als abhängige Variablen und einzelnen Cholesterinmetaboliten als unabhängige Variablen durchgeführt. Um eine Beeinflussung der Höhe der Testergebnisse durch das Alter, die Schulbildung, das Geschlecht, den ApoE-Status und eine Dysfunktion der BHS auszuschließen, wurden diese Faktoren als Störfaktoren in der Analyse betrachtet.

Zusätzlich wurde eine binäre logistische Regression angewandt, um einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer kognitiven Beeinträchtigung und den Konzentrationen der einzelnen Cholesterinmetaboliten zu Beginn der Studie zu überprüfen. Es wurden dieselben Störfaktoren wie bei der linearen Regression in die Analyse eingeschlossen.

In der Subgruppe der AD und nicht-AD Patienten wurde eine binäre logistische Regressionsanalyse durchgeführt, um einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Alzheimer Pathologien und den Konzentrationen einzelner Cholesterinstoffwechselmetaboliten zu untersuchen.

In der gesamten Patientengruppe wurde, mit Hilfe von linearen Regressionen, Assoziationen der individuellen AD Biomarker, als abhängige Variablen, mit speziell ausgewählten Cholesterinmetaboliten als unabhängige Variablen, untersucht. Die

Analyse wurde für die Störfaktoren Geschlecht, Alter, APOE Status und Permeabilität der BHS (AlbuminLiquor/ AlbuminSerum) korrigiert.

Den Einfluss der einzelnen Cholesterinmetaboliten auf die Veränderung des kognitiven Status über die Zeit, haben wir mittels linearer Regression beschrieben. In den Nachuntersuchungen wurde der kognitive Status jedes Teilnehmers erneut überprüft, und ein kognitiver Abbau über die Abweichung der MMST, CDR und CDRSoB Ergebnisse in Relation zu der individuellen Zeitspanne zwischen den Follow Ups gesetzt, so dass für eine eventuelle systematische Über- oder Unterschätzung einer nicht erwartungstreuen Schätzfunktion, dem sogenannten Bias, korrigiert wurde. Auch hier wurden die Auswirkungen von den Störfaktoren Geschlecht, Alter, Jahre der Ausbildung, Funktionalität der BHS, ApoE-Status und der kognitive Status zu Beginn der Studie ins Modell mit einbezogen.

1.3 Ergebnisse

Demographische und biochemische Grunddaten

Von den 142 Teilnehmern wurden 61 als kognitiv normal (KN) und 81 als kognitiv eingeschränkt (KE) eingestuft. In der AD Gruppe fanden sich 55 Patienten und in der Nicht-AD Gruppe 87 Personen.

Innerhalb der Subgruppen der KN und KE lag das Alter der Teilnehmer zwischen 49 und 88 Jahren, wobei das Durchschnittsalter der KN mit 70 Jahren und das der kognitiv eingeschränkten Teilnehmer mit 74 Jahren nicht statistisch signifikant unterschiedlich war.

Der BMI, das Geschlecht als auch die Jahre der Schulausbildung weisen ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Subgruppen auf.

Es zeigte sich allerdings, dass sowohl in den Liquorgehalten des $A\beta_{1-42}$, im Verhältnis des $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ sowie des Tau-Proteins statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Subgruppen der KN und KE zu finden sind. So sind die Konzentrationen von $A\beta_{1-42}$ sowie das $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ Verhältnis in der Gruppe der KE erniedrigt, was eine erhöhte kortikale Last des β -Amyloids anzeigt.

Dahingegen ließen sich keine Unterschiede zwischen den Konzentrationen der Sterine und Oxysterine in den Subgruppen finden.

Bei 116 Teilnehmern lagen Daten von mindestens einer nachfolgenden Untersuchung vor. Der Durchschnitt der Monate bis zu den Nachuntersuchungen lag für das erste Follow-Up bei 18,6 Monaten und für das zweite Follow-Up bei 30,4 Monaten nach Studienbeginn.

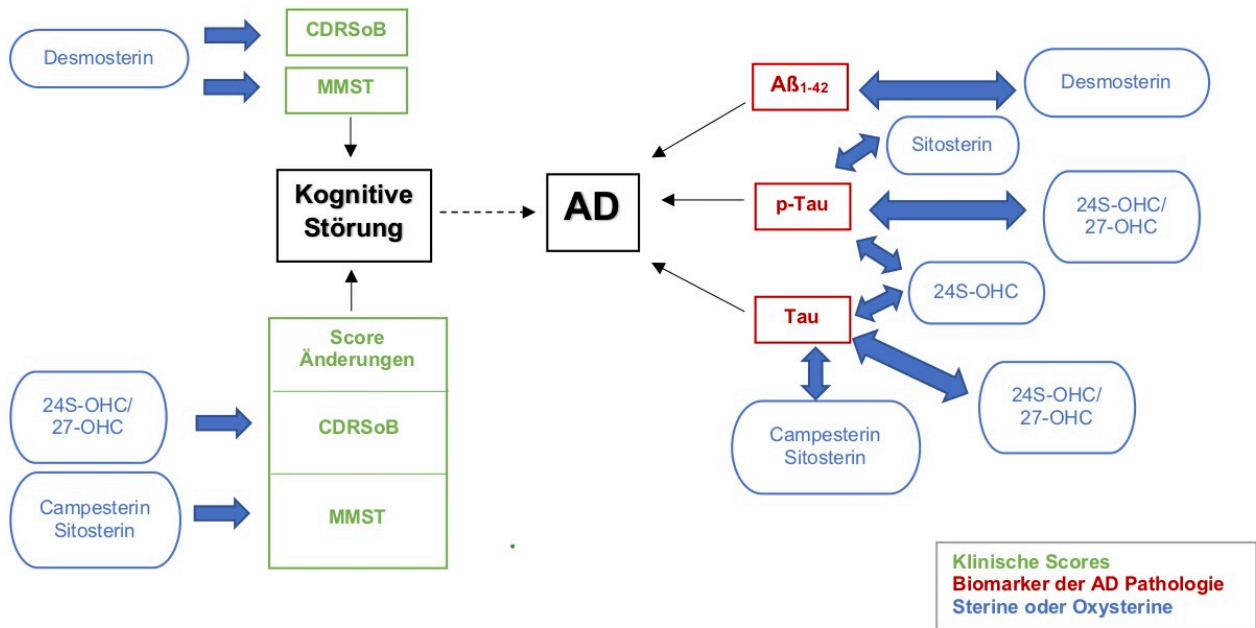


Abb. 4: Graphische Zusammenfassung der Zusammenhänge zwischen biochemischen Parametern, neurologisch-psychologischen Beurteilungen und AD [modifiziert nach „Graphical Abstract“ (Jahn et al., 2021)]

Basierend auf der Abbildung 4, die eine modifizierte Version des „Graphical Abstracts“ der Originalpublikation in der Ausgabe des Journals darstellt (Jahn et al., 2021), wird im Weiteren durch den Ergebnisteil geführt. Hinweise auf Abbildungen und Tabellen der beigefügten Originalarbeit sind durch Anführungszeichen, z.B. „Table 1“, indiziert.

Zusammenhänge zwischen Liquorkonzentrationen von Sterinen und kognitiven Testergebnissen sowie der Veränderung der kognitiven Testergebnisse bei Folgeuntersuchungen

Die Ergebnisse der linearen Regression mit der CDRSoB und dem MMST als abhängige Variable und entweder 24S-OHC, dem Verhältnis von 24S-OHC/27-OHC, Desmosterin, Campesterin oder Sitosterin als unabhängige Variablen, werden in „Table 2“ und „Table 3“ der beigefügten Originalpublikation gezeigt. Hier fanden sich für alle Teilnehmer zu Studienbeginn statisch signifikante Assoziationen zwischen Desmosterin und den Ergebnissen des MMST (positiver Regressionskoeffizient) und des CDRSoB (negativer Regressionskoeffizient).



Abb. 5: Zusammenhänge zwischen biochemischen Parametern, neurologisch-psychologischen Beurteilungen und kognitiven Störungen.

Wir fanden statistisch signifikante Assoziationen zwischen den Konzentrationen von Campesterin und Sitosterin mit der Verringerung von MMST beim ersten Follow Up („Table 8“). Das Verhältnis von 24S-OHC/ 27-OHC war beim letzten Follow Up statistisch signifikant mit Zunahme der CDRSoB Ergebnissen assoziiert („Table 7“).

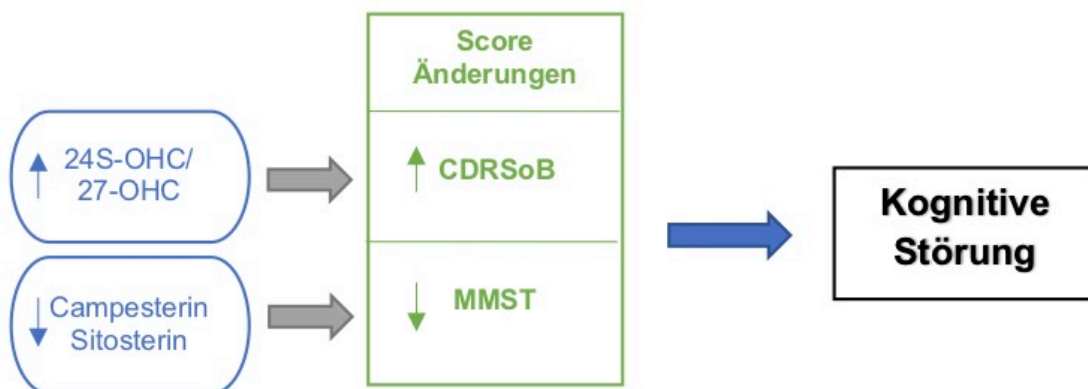


Abb. 6: Zusammenhänge zwischen biochemischen Parametern, neurologisch-psychologischen Beurteilungen und kognitiven Störungen.

Korrelationen zwischen Liquorkonzentrationen von Sterinen und AD Markern Gegenüberstellung AD vs. Nicht-AD-Subgruppe

In der Gegenüberstellung der Subgruppen mit und ohne AD zeigten sich in der AD Subgruppe statistisch signifikant höhere Liquorkonzentrationen von 24S-OHC sowie ein statistisch signifikant höheres Verhältnis von 24S-OHC/27-OHC. Die Ergebnisse dieses Gruppenvergleichs sind in der „Table 4“ der Originalpublikation sowie als Verlängerung über Tau und p-Tau in Abbildung 4 zu finden.

Mithilfe der Pearson Korrelation konnten Wechselbeziehungen zwischen einzelnen Cholesterinmetaboliten bzw. den pflanzlichen Sterinen und AD Biomarkern in den eben genannten Subgruppen dargestellt werden. Die genannten Korrelationen sind in „Table 5“ der Originalpublikation tabellarisch dargestellt.

Es ließen sich innerhalb der AD-Subkohorte Korrelationen zwischen den pflanzlichen Sterinen (Sitosterin und Campesterin) und dem AD Biomarker Tau, der den Grad der Neurodegeneration widerspiegelt, abbilden. Diese Korrelationen traten in der Kontrollkohorte nicht auf. Außerdem zeigte sich in der AD Subkohorte eine Korrelation zwischen 24S-OHC und p-tau („Figure 1A“).

In der Kontrollgruppe der nicht-AD Patienten fanden sich Korrelationen zwischen 24S-OHC und p-Tau sowie zwischen 24S-OHC und A β ₁₋₄₂.

Zusammenhänge zwischen Liquorkonzentrationen von Sterinen und individuellen AD Biomarker in der Gesamtgruppe

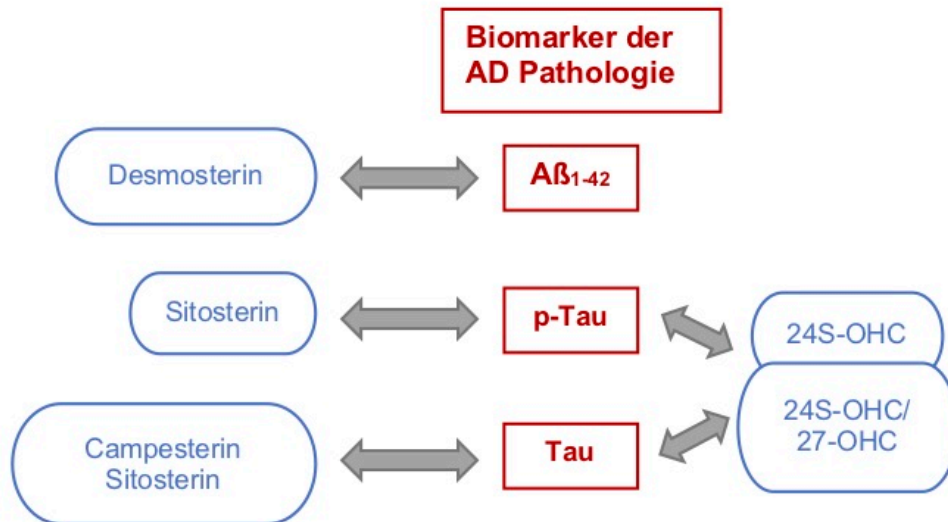


Abb. 7: Zusammenhänge zwischen biochemischen Parametern, neurologisch-psychologischen Scores und AD.

Die Ergebnisse der linearen Regression sind in Abbildung 7 und „Table 6“ der Originalpublikation zu finden und zeigen statistisch signifikante Assoziationen zwischen $A\beta_{1-42}$ und Desmosterin sowie zwischen p-Tau und dem Oxysterin 24S-OHC, Sitosterin und dem Verhältnis von 24S-OHC/ 27-OHC. Außerdem gab es Assoziationen zwischen 24S-OHC, dem Verhältnis von 24S-OHC/ 27-OHC, Campesterin und Sitosterin mit Tau. „Figure 1A“ der Originalpublikation zeigt zusätzlich zu den eben beschriebenen Korrelationen in den Subgruppen, die Zusammenhänge in der gesamten Patientengruppe. Neben den Korrelationen zwischen 24S-OHC, Tau und p-Tau in den Subgruppen, fanden wir diese auch in der Gesamtgruppe. Zusätzlich wurden auch statistisch signifikante Korrelationen zwischen 27-OHC, dem Verhältnis von 24S-OHC/ 27-OHC und dem Albumin Quotienten zwischen Liquor und Serum festgestellt. Ferner gab es in der gesamten Kohorte einen Zusammenhang zwischen Desmosterin und $A\beta_{1-42}$. Die pflanzlichen Sterine Sitosterin und Campesterin korrelierten sowohl in der gesamten Kohorte als auch in den Subgruppen mit dem Albumin Quotienten.

1.4 Diskussion

Cholesterin und Oxysterine im ZNS bei AD Patienten

Unsere Ergebnisse festigen bisherige Befunde von erhöhten Konzentrationen an 24S-OHC und dem Verhältnis von 24S-OHC/ 27-OHC im Liquor bei Patienten mit zerebralen AD Pathologien (Brown et al., 2004; Popp et al., 2012).

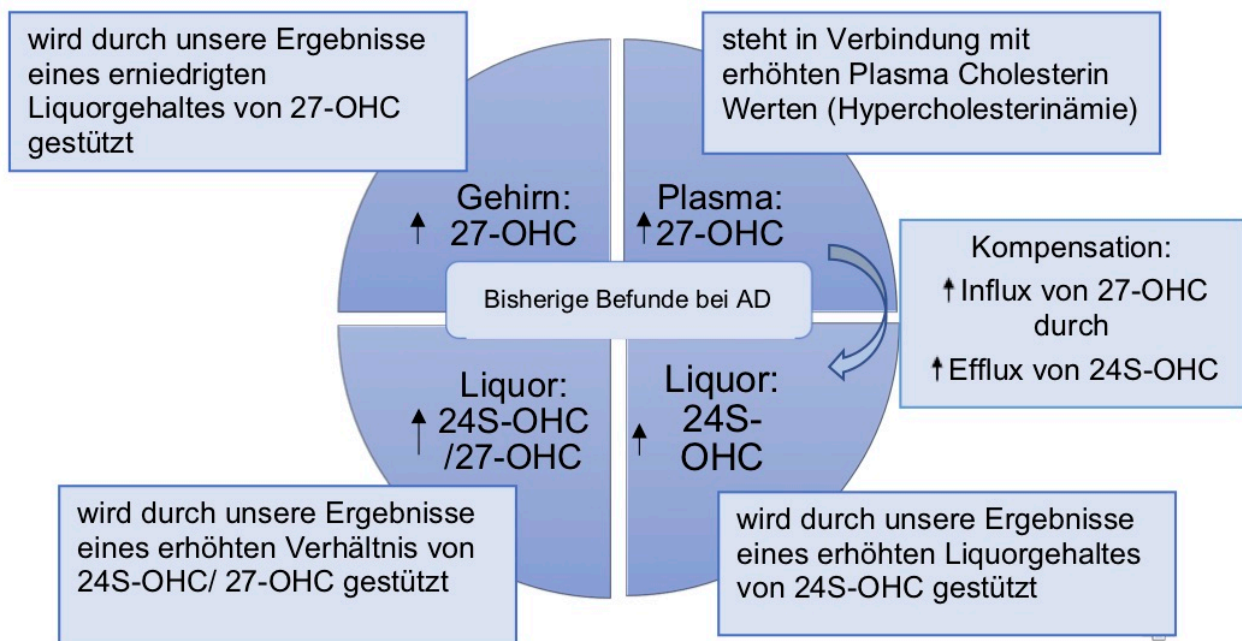


Abb. 8: Darstellung der bisherigen Studienergebnisse in Verbindung zu unseren Ergebnissen.

Erstmals konnten wir mit unserer Studie aufzeigen, dass die Veränderungen der Liquorkonzentrationen der Sterine direkt mit dem Auftreten von AD und nicht nur mit kognitiven Einschränkungen in Verbindung stehen. In früheren Studien konnten durch die rein klinische Diagnose, mittels neuropsychologischen Tests und DSM-5 Kriterien für AD (Popp et al., 2012), bisher die vorklinischen Alzheimer-Stadien nicht mitberücksichtigt werden. Außerdem wurde bisher noch nicht berichtet, ob kognitive Einschränkungen in direktem Zusammenhang mit dem Auftreten von zerebralen Alzheimer Pathologien stehen.

In den Neuronen des ZNS wird das 24S-OHC, das Eliminationsprodukt von zerebralem Cholesterin, mittels CYP46A1 stereospezifisch synthetisiert. Dann tritt 24S-OHC über die

BHS in die peripheren Gefäße und in geringem Maße über die Hirn-Liquorschranke in den Liquor (Lütjohann et al., 1996). 27-OHC, ein weiteres Abbauprodukt des Cholesterins in der Peripherie, kann dahingegen in entgegengesetzter Richtung über die BHS ins Gehirn gelangen. Dort wird es dann zu 7α -Hydroxy-3-oxo-4-cholestensäure umgewandelt, welches dann wiederum in die Peripherie zurückgelangt.

Unsere Ergebnisse zeigen eine erniedrigte Konzentration von 27-OHC im Liquor von AD Patienten, was im Konsens mit den Ergebnissen einer früheren Studie, die erhöhte Konzentrationen von 27-OHC im Gehirn von AD Patienten darstellte, steht (Björkhem et al., 2006). Die Vermutung liegt also nahe, dass 27-OHC, auch wenn es im Gehirn zu 7α -Hydroxy-3-oxo-4-cholestensäure umgebaut werden kann, eventuell im Gehirn von AD Patienten akkumuliert und so zu den niedrigen CSF Spiegel führt. Bei klinisch diagnostizierten Alzheimer Patienten wurden nicht nur erhöhte Werte von 27-OHC im Gehirn, sondern auch veränderte 27-OHC Konzentrationen im Plasma (Björkhem et al., 2006; Brown et al., 2004; Popp et al., 2012) festgestellt, und die These generiert, dass ein erhöhter Influx von 27-OHC ins Gehirn durch einen erhöhten Efflux von 24S-OHC aus dem Gehirn kompensiert wird (Björkhem et al., 2006). Grund für den erhöhten Influx von 27-OHC könnte eine Hypercholesterinämie sein, da erhöhte periphere Cholesterinwerte mit erhöhten 27-OHC Spiegel einhergehen. Cholesterin und die Oxysterole 24S- und 27-OHC werden gleichermaßen in Lipoproteinen transportiert. Dieser Befund wird als die Verbindung zwischen Hypercholesterinämien und dem Auftreten von AD diskutiert (Björkhem et al., 2006). Durch das statistisch signifikant erhöhte Verhältnis von 24S-OHC zu 27-OHC im Liquor und seine Assoziation zum kognitiven Abbau über die Zeit, widergespiegelt durch die Verschlechterung der Ergebnisse des CDRSoB in den Follow-Ups, kann angenommen werden, dass ein verstärkter zerebraler Cholesterinstoffwechsel mit einem erhöhten kognitiven Abbau im Laufe der Zeit in Verbindung steht. Das Verhältnis der Liquorkonzentrationen von 24S-OHC zu 27-OHC dient dabei als Marker für den zerebralen Stoffwechsel.

Cholesterin, seine Metaboliten im Liquor und der Zusammenhang mit den einzelnen CSF Biomarkern von Alzheimer

Zu den Biomarkern von Alzheimer gehören die Konzentrationen der β -Amyloid-Fragmente $A\beta_{1-40}$ und $A\beta_{1-42}$, wobei eine niedrige Liquorkonzentration eine hohe Last im

ZNS widerspiegelt. Erhöhte Liquorgehalte an Tau bringen erhöhte Neurodegeneration zum Ausdruck und erhöhte p-Tau-Anteile eine fortgeschrittene zerebrale Tau-Pathologie. Vorherige Studien zeigten nicht nur erhöhte 27-OHC Konzentrationen im Gehirn von Patienten mit AD (Björkhem et al., 2006), sondern auch einen direkten Zusammenhang zwischen Plasma 27-OHC und β -Amyloid-Pathologien. Plasma 27-OHC korreliert statistisch signifikant sowohl mit 27-OHC als auch mit sAPP Konzentration im Liquor und fördert die Amyloidogenese und so die Ablagerung des $A\beta_{1-42}$ im Gehirn (Popp et al., 2012; Prasanthi et al., 2009). Man kann annehmen, dass sowohl 27-OHC als auch 24S-OHC Effekte auf die Regulation der spezifischen Sekretasen haben, die die APP-Degradierung regulieren. Unsere Ergebnisse der erniedrigten Liquorkonzentration von 27-OHC, lassen den Schluss zu, dass 27-OHC im Gehirn akkumuliert, was im Konsens mit den bereits genannten Ergebnissen einer erhöhten Konzentration von 27-OHC im Gehirn steht (Björkhem et al., 2006). Das zerebrale 24S-OHC hat nachweislich einen inhibitorischen Effekt auf die β -Amyloidsynthese (Famer et al., 2007). Durch die bereits beschriebenen Prozesse kann man davon ausgehen, dass durch den erhöhten Influx von 27-OHC und den dadurch zur Kompensation erhöhten Efflux von 24S-OHC, der inhibitorische Effekt von 24S-OHC auf die Amyloidogenese abgeschwächt wird und es zu einer erhöhten β -Amyloidsynthese kommt. Die Regulation vom Influx des 27-OHC könnte also ein therapeutischer Ansatzpunkt in der Prävention der voranschreitenden Schwere der Alzheimer Erkrankung sein. Statine, als Lipidsenker, könnten mit Hemmstoffen der intestinalen Cholesterinresorption, wie Ezetimib, kombiniert werden, um einerseits den peripheren Cholesterinspiegel zu senken und andererseits so den erhöhten Influx von 27-OHC ins ZNS zu stoppen (Lütjohann et al., 2021; Lütjohann et al., 2019; Sudhop et al., 2002).

Der gezeigte Zusammenhang zwischen 24S-OHC und sowohl den Liquor Konzentrationen von Tau als auch von p-Tau sollte besonders diskutiert werden. In früheren Studien wurden bei Patienten mit Parkinson Zusammenhänge zwischen 24S-OHC und Tau sowie in unabhängigen Kohorten zwischen 24S-OHC und p-Tau beschrieben (Björkhem et al., 2018). Damals wurden experimentelle Studien an 12 Wochen alten, männlichen, genetisch veränderten, Wildtyp Mäusen durchgeführt, um zu schauen ob die zerebralen 24S-OHC Konzentrationen Unterschiede bei Mäusen mit einer Überexpression bzw. einen Tau knock-out aufweisen (Björkhem et al., 2018). Da dies

nicht der Fall war, kann man davon ausgehen, dass keine direkte Interaktion zwischen 24S-OHC und Tau vorliegt, sondern die Korrelation sekundärer Natur ist. Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch den erhöhten Zelltod mehr Cholesterin und auch Tau freigesetzt wird, das Cholesterin vermehrt zu 24S-OHC abgebaut wird und so eine sekundäre Korrelation zwischen Tau und 24S-OHC entsteht. Dies kann auch als Erklärung für die Korrelation zwischen 24S-OHC und AD generell angenommen werden. In einer früheren Studie wurde bereits vermutet, dass erhöhte 24S-OHC Spiegel im Liquor bei AD Patienten, vor allem in den frühen Stadien der Krankheit, mit einem erhöhten zerebralen Cholesterinstoffwechsel in Verbindung steht und als Marker für die Progression der AD genutzt werden könnte (Papassotiropoulos et al., 2002).

Interessanterweise zeigte Desmosterin, als Vorläufer von Cholesterin, nicht nur eine positive Assoziation mit dem kognitiven Status, sondern auch eine positive Korrelation mit $A\beta_{1-42}$. Somit scheint sich erhöhtes Desmosterin, auf Grund einer geringeren $A\beta$ Peptidablagerung im Gehirn, widergespiegelt durch erhöhte Liquorgehalten von $A\beta_{1-42}$, protektiv auf kognitive Einschränkungen auszuwirken. Auf Grund unserer Ergebnisse lässt sich allerdings kein Kausalzusammenhang beweisen und auch in den Ergebnissen in der separat getesteten AD Subgruppe fanden wir zwar verringerte Liquorkonzentrationen von Desmosterin, allerdings waren diese statistisch nicht signifikant.

Die bisher unbekannt positive Korrelation zwischen Desmosterin und $A\beta_{1-42}$ lässt mehrere unterschiedliche Schlüsse zu. Auf der einen Seite könnten die niedrigen Desmosterinspiegel im Liquor, die mit erhöhten $A\beta_{1-42}$ Ablagerungen im Gehirn einhergehen, für eine verringerte zerebrale Cholesterinsynthese sprechen. Eine verringerte Cholesterinbiosynthese wurde in einer früheren Studie bereits mit einer erhöhten Produktion von $A\beta$ -Fragmenten in Zusammenhang gebracht. Allerdings zeigte die Studie auch, dass eine verringerte Enzymaktivität des, für den Umbau von Desmosterin in Cholesterin verantwortliche Enzym, Seladin-1, bei Mäusen zu einer verringerten Cholesterinkonzentration in Membranen führt und so zu einer erhöhten APP Prozessierung und $A\beta$ -Peptidfragment Ablagerung (Cramer et al., 2006). Durch eine verringerte Enzymaktivität des Seladin-1 bei AD müsste konträr zu unseren Ergebnissen die Desmosterinkonzentration demnach sowohl intrazellulär als auch im Liquor steigen, was nach unserer Hypothese zu erniedrigten $A\beta_{1-42}$ Ablagerungen im Gehirn führen müsste.

Auf der anderen Seite könnte man durch die positive Korrelation zwischen Desmosterin und $A\beta_{1-42}$ im Liquor die These aufstellen, dass durch eine erhöhte zerebrale Cholesterinsynthese Desmosterin vermehrt umgebaut wird und so verringert im Liquor vorliegt, was mit einer im Liquor verringerten bzw. konträr dazu im Gehirn erhöhten Konzentration von $A\beta_{1-42}$ einhergeht. Diese These wird durch das Ergebnis einer anderen früheren Studie, in der hohe Cholesterinkonzentrationen mit einer erhöhten APP Prozessierung über den amyloidogenen Weg in Verbindung gebracht werden konnten, gestützt (Popp et al., 2012).

Zusätzlich lassen die gefundenen Assoziationen zwischen einem erniedrigten Liquorgehalt an Desmosterin und einer Verschlechterung im CDRSoB, der die Schwere der kognitiven Beeinträchtigung widerspiegelt, die Frage zu, ob die Höhe der Liquorkonzentrationen von Desmosterin und damit die Höhe der zerebralen Konzentration das Risiko für eine rasche kognitive Verschlechterung beeinflussen oder doch nur beschreiben könnte.

Die bisherigen Publikationen stellen unterschiedliche Thesen auf und beide lassen sich je nach Interpretation mit unseren Ergebnissen in Verbindung bringen. Denn im Gegensatz der Ergebnisse einer Verbindung zwischen erniedrigten Cholesterinkonzentrationen durch mangelnde Enzymaktivität des Seladin-1 und einer gesteigerten APP Prozessierung (Cramer et al., 2006) steht die These, dass hohe Cholesterinkonzentrationen mit einer erhöhten APP Prozessierung über den amyloidogenen Weg in Verbindung gebracht werden können (Popp et al., 2012).

Die Bestimmung der Bedeutung von Desmosterin bedarf also weiterer Untersuchungen und könnte ausschlaggebend für einen möglichen pharmazeutischen Ansatzpunkt in der Prävention und Behandlung der, unter anderem durch $A\beta_{1-42}$ Ablagerungen ausgelösten AD sein.

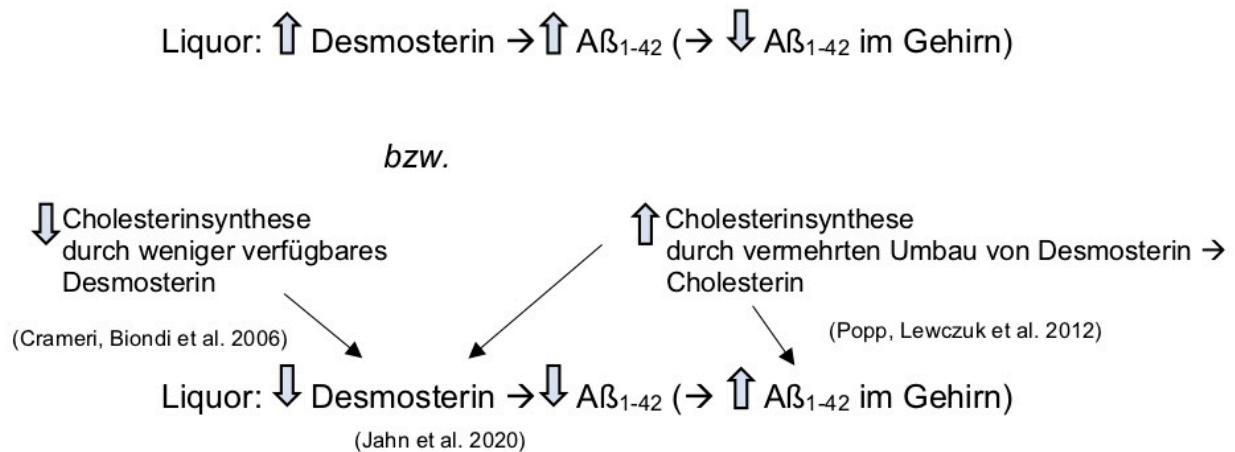


Abb. 9: Kontroverse der bisherigen Studienergebnisse

Unsere Ergebnisse zeigen erstmals eine neue, zuvor noch nicht beschriebene Korrelation zwischen den pflanzlichen Sterinen Campesterin und Sitosterin und Tau an. Diese Korrelation war sowohl in der gesamten Kohorte als auch in der Subgruppe der AD Patienten statistisch signifikant. Zusätzlich dazu fanden wir eine Assoziation zwischen den pflanzlichen Sterinen und der sinkenden MMST-Punkte in den Follow-Up Untersuchungen. Dies könnte für eine Relevanz der pflanzlichen Sterine für die Schwere des AD Verlaufs sprechen. Doch hier muss man ebenfalls kritisch hinterfragen, ob die Korrelation auch anders erklärt werden könnten. Da pflanzliche Sterine nur durch die Nahrung aufgenommen werden können, und durch Lipoproteine ins ZNS transportiert werden, könnte der Zusammenhang zum Tau auch sekundär durch eine Störung in der BHS entstehen. Normalerweise ist der Transport der Sterine ins ZNS limitiert. Eine Dysfunktion der BHS könnte zu einem erhöhten Eindringen der Sterine ins ZNS führen. Eine frühere Studie zeigte bereits, dass erhöhte Konzentrationen von pflanzlichen Sterinen ein Prädiktor für eine dysfunktionale BHS waren (Vanmierlo et al., 2011) und dass diese Dysfunktion bei Alzheimer Patienten häufig zu finden war (Bowman et al., 2018). Unsere Ergebnisse zeigen eine Korrelation der pflanzlichen Sterine zu der Albumin Rate, die die Funktionalität der BHS widerspiegelt, sodass wir zunächst diese Hypothese unterstützen konnten. Nachdem wir jedoch in der Subkohorte der AD Patienten die Albumin Rate als Störfaktor ausgeschlossen hatten, blieben die Korrelationen statistisch signifikant, was für eine, von dem Zustand der BHS unabhängigen, Spezifität der Korrelation gegenüber AD spricht. Auffällig ist, dass der Quotient Campesterin/Sitosterin

im CSF $\ll 1$, also gegensätzlich zu dem Quotienten im Blut, wo Campesterin/Sitosterin > 1 ist (Heinemann et al., 1993). Dies führt zu der Annahme, dass entweder Sitosterin besser über die BHS diffundiert und daher schlussendlich im Liquor erhöht ist oder dass Campesterin im Gehirn akkumuliert und daher im CSF erniedrigt vorliegt. Campesterin und Sitosterin erhöhen die A β -Produktion und Sekretion im Gehirn, wenn auch nicht so stark wie Cholesterin (Burg et al., 2013). Unsere gezeigten Korrelationen zwischen den pflanzlichen Sterinen und β -Amyloidfragmenten unterstützen diese These und sprechen erneut für den eventuellen Therapieeinsatz von Ezetimib, der sowohl die intestinale Absorption von Cholesterin als auch von pflanzlichen Sterinen hemmt. Trotz allem sollte weitergehend untersucht werden, ob die Korrelationen direkter Natur sind oder sekundär aufgrund einer Dysfunktion der BHS entstehen.

1.5 Zusammenfassung

Demenzerkrankungen und vor allen Dingen eine Demenz vom Alzheimer-Typ zählen mit zu den größten Herausforderungen des 21. Jahrhunderts (Scheltens et al., 2016). Bislang konnten bereits Abweichungen im Cholesterinstoffwechsel im ZNS und in der Peripherie mit Alzheimer Demenz in Verbindung gebracht und Biomarker für eine frühzeitige Erkennung festgelegt werden. Diese Arbeit wurde unter den Hypothesen erstellt, dass Metaboliten des zerebralen Cholesterinstoffwechsels und pflanzliche Sterine mit dem Auftreten von zerebralen Alzheimer Pathologien, mit denen im zerebrospinalen Liquor gefundenen Biomarkern sowie dem Abbau kognitiver Fähigkeiten über der Zeit korrelieren.

Unsere Ergebnisse zeigen Assoziationen zwischen den Liquorgehalten von Desmosterin und Amyloid β 1-42 und den pflanzlichen Sterinen Campesterin und Sitosterin mit den Biomarkern Tau und p-Tau. Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen dem Cholesterinstoffwechsel und der Amyloidogenese sowie auf einen Einfluss der pflanzlichen Sterine auf Tau-Pathologien und Neurodegeneration hin.

Durch Wiederholungen der klinischen und der neurologischen Tests nach 18 bzw. 36 Monaten konnten wir zeigen, dass der Cholesterinstoffwechsel und auch die pflanzlichen Sterine bei Studieneinschluss maßgeblich für den Schweregrad sowie das Voranschreiten der Krankheit sind.

Obwohl methodologisch keine kausalen Zusammenhänge nachgewiesen werden können, unterstützen die Ergebnisse unserer Studie die Ansätze, die peripheren Serumgehalte an Cholesterin, den pflanzlichen Sterinen und Cholesterinmetaboliten zu senken. Dies würde auch eine Verminderung des Überganges o.g. Sterine über die BHS ins ZNS zur Folge haben. Ob Lipidsenker wie Statine, Hemmstoffe der intestinalen Cholesterinresorption wie Ezetimib oder Hemmstoffe des LDL-Rezeptor Abbaus, die PCSK9 Inhibitoren, einen protektiven, retardierenden Effekt auf die klinische Entwicklung oder gar therapeutische Wirkung auf die zerebrale Pathologie bei AD zeigen, sollte Ziel weiterer Untersuchungen sein.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Anstey KJ, Lipnicki DM, Low LF. Cholesterol as a risk factor for dementia and cognitive decline: a systematic review of prospective studies with meta-analysis. *Am J Geriatr Psychiatry* 2008; 16: 343-354

Björkhem I, Heverin M, Leoni V, Meaney S, Diczfalusy U. Oxysterols and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 2006; 185: 43-49

Björkhem I, Patra K, Boxer AL, Svenningsson P. 24S-Hydroxycholesterol Correlates With Tau and Is Increased in Cerebrospinal Fluid in Parkinson's Disease and Corticobasal Syndrome. *Front Neurol* 2018; 9: 756

Bowman GL, Dayon L, Kirkland R, Wojcik J, Peyratout G, Severin IC, Henry H, Oikonomidi A, Migliavacca E, Bacher M, Popp J. Blood-brain barrier breakdown, neuroinflammation, and cognitive decline in older adults. *Alzheimers Dement* 2018; 14: 1640-1650

Brown J, 3rd, Theisler C, Silberman S, Magnuson D, Gottardi-Littell N, Lee JM, Yager D, Crowley J, Sambamurti K, Rahman MM, Reiss AB, Eckman CB, Wolozin B. Differential expression of cholesterol hydroxylases in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 2004; 279: 34674-34681

Burg VK, Grimm HS, Rothhaar TL, Grosgen S, Hundsdorfer B, Hauptenthal VJ, Zimmer VC, Mett J, Weingartner O, Laufs U, Broersen LM, Tanila H, Vanmierlo T, Lütjohann D, Hartmann T, Grimm MO. Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study. *J Neurosci* 2013; 33: 16072-16087

Carlson RV, Boyd KM, Webb DJ. The revision of the Declaration of Helsinki: past, present and future. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 57: 695-713

Cermenati G, Mitro N, Audano M, Melcangi RC, Crestani M, De Fabiani E, Caruso D. Lipids in the nervous system: from biochemistry and molecular biology to pathophysiology. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1851: 51-60

Crameri A, Biondi E, Kuehnle K, Lütjohann D, Thelen KM, Perga S, Dotti CG, Nitsch RM, Ledesma MD, Mohajeri MH. The role of seladin-1/DHCR24 in cholesterol biosynthesis, APP processing and A β generation in vivo. *EMBO J* 2006; 25: 432-443

Curtis MJ, Bond RA, Spina D, Ahluwalia A, Alexander SP, Giembycz MA, Gilchrist A, Hoyer D, Insel PA, Izzo AA, Lawrence AJ, MacEwan DJ, Moon LD, Wonnacott S, Weston AH, McGrath JC. Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in *BJP*. *Br J Pharmacol* 2015; 172: 3461-3471

Duron E, Hanon O. Vascular risk factors, cognitive decline, and dementia. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4: 363-381

Esiri MM, Chance SA. Cognitive reserve, cortical plasticity and resistance to Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2012; 4: 7

Famer D, Meaney S, Mousavi M, Nordberg A, Björkhem I, Crisby M. Regulation of alpha- and beta-secretase activity by oxysterols: cerebrosterol stimulates processing of APP via the alpha-secretase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 359: 46-50

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12: 189-198

Heinemann T, Axtmann G, von Bergmann K. Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *Eur J Clin Invest* 1993; 23: 827-831

Hughes CP, Berg L, Danziger WL, Coben LA, Martin RL. A new clinical scale for the staging of dementia. *Br J Psychiatry* 1982; 140: 566-572

Hughes TM, Rosano C, Evans RW, Kuller LH. Brain cholesterol metabolism, oxysterols, and dementia. *J Alzheimers Dis* 2013; 33: 891-911

Jahn T, Clark C, Kerksiek A, Lewczuk P, Lütjohann D, Popp J. Cholesterol metabolites and plant sterols in cerebrospinal fluid are associated with Alzheimer's cerebral pathology and clinical disease progression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2021; 205: 105785. doi: 10.1016/j.jsbmb.2020.105785. Epub 2020 Nov 7.

Lawton MP, Brody EM. Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist* 1969; 9: 179-186

Loera-Valencia R, Goikolea J, Parrado-Fernandez C, Merino-Serrais P, Maioli S. Alterations in cholesterol metabolism as a risk factor for developing Alzheimer's disease: Potential novel targets for treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2019; 190: 104-114

Lund EG, Guileyardo JM, Russell DW. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7238-7243

Lütjohann D, Björkhem I, Friedrichs S, Kerksiek A, Geilenkeuser WJ, Lövgren-Sandblom A, Ansorena D, Astiasaran I, Baila-Rueda L, Barriuso B, Bretillon L, Browne RW, Caccia C, Cenarro A, Crick PJ, Fauler G, Garcia-Llatas G, Griffiths WJ, Iuliano L, Lagarda MJ,

Leoni V, Lottenberg AM, Matysik S, McDonald J, Rideout TC, Schmitz G, Nunes VS, Wang Y, Zerbinati C, Diczfalusy U, Schott HF. International descriptive and interventional survey for oxysterol determination by gas- and liquid-chromatographic methods. *Biochimie* 2018; 153: 26-32

Lütjohann D, Breuer O, Ahlborg G, Nennesmo I, Sidén A, Diczfalusy U, Björkhem I. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9799-9804

Lütjohann D, Stellaard F, Bolukbasi B, Kerksiek A, Parhofer KG, Laufs U. Anti-PCSK 9 antibodies increase the ratios of the brain-specific oxysterol 24S-hydroxycholesterol to cholesterol and to 27-hydroxycholesterol in the serum. *Br J Clin Pharmacol* 2021:

Lütjohann D, Stellaard F, Mulder MT, Sijbrands EJG, Weingärtner O. The emerging concept of "individualized cholesterol-lowering therapy": A change in paradigm. *Pharmacol Ther* 2019; 199: 111-116

Lütjohann D, von Bergmann K. 24S-hydroxycholesterol: a marker of brain cholesterol metabolism. *Pharmacopsychiatry* 2003; 36 Suppl 2: S102-106

Marwarha G, Raza S, Prasanthi JR, Ghribi O. Gadd153 and NF-kappaB crosstalk regulates 27-hydroxycholesterol-induced increase in BACE1 and beta-amyloid production in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *PLoS One* 2013; 8: e70773

Mathys J, Gholamrezaee M, Henry H, von Gunten A, Popp J. Decreasing body mass index is associated with cerebrospinal fluid markers of Alzheimer's pathology in MCI and mild dementia. *Exp Gerontol* 2017; 100: 45-53

Meaney S, Heverin M, Panzenboeck U, Ekström L, Axelsson M, Andersson U, Diczfalusy U, Pikuleva I, Wahren J, Sattler W, Björkhem I. Novel route for elimination of brain

oxysterols across the blood-brain barrier: conversion into 7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid. *J Lipid Res* 2007; 48: 944-951

Mielke MM, Lyketsos CG. Lipids and the pathogenesis of Alzheimer's disease: is there a link? *Int Rev Psychiatry* 2006; 18: 173-186

Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* 1993; 43: 2412-2414

O'Bryant SE, Waring SC, Cullum CM, Hall J, Lacritz L, Massman PJ, Lupo PJ, Reisch JS, Doody R, Texas Alzheimer's Research C. Staging dementia using Clinical Dementia Rating Scale Sum of Boxes scores: a Texas Alzheimer's research consortium study. *Arch Neurol* 2008; 65: 1091-1095

Papassotiropoulos A, Lütjohann D, Bagli M, Locatelli S, Jessen F, Buschfort R, Ptak U, Björkhem I, von Bergmann K, Heun R. 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *J Psychiatr Res* 2002; 36: 27-32

Popp J, Lewczuk P, Kölsch H, Meichsner S, Maier W, Kornhuber J, Jessen F, Lütjohann D. Cholesterol metabolism is associated with soluble amyloid precursor protein production in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2012; 123: 310-316

Popp J, Meichsner S, Kölsch H, Lewczuk P, Maier W, Kornhuber J, Jessen F, Lütjohann D. Cerebral and extracerebral cholesterol metabolism and CSF markers of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* 2013; 86: 37-42

Popp J, Oikonomidi A, Tautvydaite D, Dayon L, Bacher M, Migliavacca E, Henry H, Kirkland R, Severin I, Wojcik J, Bowman GL. Markers of neuroinflammation associated with Alzheimer's disease pathology in older adults. *Brain Behav Immun* 2017; 62: 203-211

Prasanthi JR, Huls A, Thomasson S, Thompson A, Schommer E, Ghribi O. Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on beta-amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Neurodegener* 2009; 4: 1

Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia* 2013; 9: 63-75.e62

Sachdev PS, Blacker D, Blazer DG, Ganguli M, Jeste DV, Paulsen JS, Petersen RC. Classifying neurocognitive disorders: the DSM-5 approach. *Nat Rev Neurol* 2014; 10: 634-642

Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, Van der Flier WM. Alzheimer's disease. *Lancet* 2016; 388: 505-517

Sudhop T, Lütjohann D, Kodali A, Igel M, Tribble DL, Shah S, Perevozskaya I, von Bergmann K. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. *Circulation* 2002; 106: 1943-1948

Ullrich C, Pirchl M, Humpel C. Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. *Mol Cell Neurosci* 2010; 45: 408-417

Vanmierlo T, Popp J, Kölsch H, Friedrichs S, Jessen F, Stoffel-Wagner B, Bertsch T, Hartmann T, Maier W, von Bergmann K, Steinbusch H, Mulder M, Lütjohann D. The plant sterol brassicasterol as additional CSF biomarker in Alzheimer's disease. *Acta Psychiatr Scand* 2011; 124: 184-192

2. Veröffentlichung

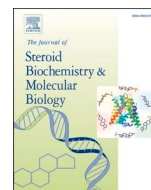
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 205 (2021) 105785



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsbmb



Cholesterol metabolites and plant sterols in cerebrospinal fluid are associated with Alzheimer's cerebral pathology and clinical disease progression

Tabea Jahn^a, Christopher Clark^b, Anja Kerksiek^a, Piotr Lewczuk^{c,d}, Dieter Lütjohann^{a,*,1}, Julius Popp^{b,e,f,1,**}

^a Institute of Clinical Chemistry and Clinical Pharmacology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

^b Institute for Regenerative Medicine, University of Zürich, Zürich, Switzerland

^c Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Clinic Erlangen, and Friedrich-Alexander University Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

^d Department of Neurodegeneration Diagnostics and Department of Biochemical Diagnostics, University Hospital of Białystok, Białystok, Poland

^e Department of Psychiatry, University Hospital of Lausanne, Switzerland

^f Department of Geriatric Psychiatry, University Hospital of Psychiatry Zurich, Zürich, Switzerland

ARTICLE INFO

Keywords:

Neurodegeneration
Oxysterols
Alzheimer's disease
Brain cholesterol metabolism
Cholesterol synthesis
Cerebrospinal fluid
Lipids

ABSTRACT

Background and Purpose: Altered cholesterol metabolism is associated with increased risk of neurodegeneration and in particular with the development of Alzheimer's disease (AD). Here, we investigate whether non-cholesterol sterols and oxysterols in the central nervous system are associated with (i) the presence of cerebral AD pathology, (ii) distinct aspects of AD pathology, i.e. amyloid pathology, neuronal injury, and tau pathology, and (iii) cognitive decline over time.

Experimental Approach: One hundred forty-two elder subjects with normal cognition, mild cognitive impairment, or mild dementia participating in a cohort study on cognitive decline and AD were included. Clinical and neuropsychological assessments were performed at inclusion and repeated at follow-up visits at 18 and 36 months. Concentrations of cholesterol, non-cholesterol sterols, and cholesterol metabolites were measured in cerebrospinal fluid (CSF), along with CSF beta-amyloid ($A\beta_{1-42}$; $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ ratio, total-tau (tau), and tau phosphorylated at threonine 181 (p-tau) as markers of amyloid pathology, neuronal injury and tau pathology, respectively. Cognitive decline was assessed by changes in Mini-Mental State Examination and Clinical Dementia Rating sum of boxes at follow-up visits.

Key Results: CSF 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC) and the 24S-OHC/27-OHC ratio were higher in subjects with AD pathology. CSF desmosterol correlated with $A\beta_{1-42}$ levels. The 24S-OHC levels, the 24S-OHC/27-OHC ratio and the plant sterols campesterol and sitosterol were associated with the tau and p-tau levels. Both plant sterol concentrations along with the 24S-OHC/27-OHC ratio at baseline predicted cognitive decline at follow-up visits.

Conclusions and Implications: We show the importance of CSF levels of several non-cholesterol sterols and oxysterols to AD and core AD biomarkers. The plant sterols campesterol and sitosterol appear to be involved in tau pathology and neurodegeneration. CSF desmosterol level indicates CNS cholesterol synthesis and might be of relevance for clinical disease severity. Therefore these non-cholesterol sterols may represent intervention targets to slow down disease progression.

Abbreviations: AD, Alzheimer Dementia; $A\beta$, beta amyloid; APOE, Apolipoprotein E; BCB, blood CSF barrier; CDR, Clinical Dementia Rating; CDRSoB, Clinical Dementia Rating sum of boxes; CI, Cognitive Impairment; CN, cognitively normal; CSF, cerebrospinal fluid; FU, follow up; MCI, Mild cognitive impairment; MMSE, mini-mental state examination; sAPP, soluble amyloid precursor protein; tau, total tau; p-tau, tau phosphorylated at threonine 181; Q_{Alb} , albumin CSF/serum ratio; 24S-OHC, 24S-hydroxycholesterol.

* Corresponding author at: Institute of Clinical Chemistry and Clinical Pharmacology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany.

** Corresponding author at: Department of Geriatric Psychiatry, Centre for Gerontopsychiatric Medicine, University Hospital of Psychiatry Zurich, Minervastrasse 145, P.O. Box 341, 8032, Zurich, Switzerland.

E-mail addresses: dieter.luetjohann@ukbonn.de (D. Lütjohann), julius.popp@pukzh.ch (J. Popp).

¹ Equal contribution

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105785>

Received 10 August 2020; Received in revised form 28 October 2020; Accepted 3 November 2020

Available online 7 November 2020

0960-0760/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer dementia (AD) is the last stage of Alzheimer's disease, representing the most prevalent neurological dysfunction in the elderly, with preclinical and mild cognitive impairment stages coming first [1]. The interest of lipids in physiopathology of AD has been supported by many studies [2,3]. Regarding their chemical structure lipids can be divided into several subgroups, of which the isoprene lipid cholesterol has been demonstrated to correlate with AD in many studies [4] and alterations of cholesterol metabolism can be linked with AD and related cerebral pathology. Cerebral cholesterol is almost completely synthesised in the brain, since the blood brain barrier (BBB) prevents the uptake of lipoprotein cholesterol from systemic circulation [5]. Lanosterol, the first cyclic steroidal intermediate of cholesterol, its hydrated product 2425-dihydrolanosterol, the downstream metabolite lathosterol (Kandutsch-Russell pathway) and desmosterol (Bloch pathway) are intermediates of the cholesterol metabolism [6]. Whereas oxysterols, such as the brain specific 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC) and the neurotoxic 27-hydroxycholesterol (27-OHC), the latter ubiquitously produced outside of the central nervous system, are oxygen derivatives of cholesterol (for a general review find [6]). Lipoproteins not only transport cholesterol but also non-cholesterol sterols such as cholesterol precursors as well as the plant sterols campesterol and sitosterol within the circulation. Plant sterols are exclusively from plant dietary origin [7, 8]. The finding that plant sterols such as campesterol and sitosterol, the naturally occurring cholesterol equivalents in plants and structurally similar to cholesterol, gain access to the CNS has fueled research focusing on the physiological roles of plant sterols in the healthy and diseased CNS [9]. Apolipoproteins are structural proteins of lipoproteins, which transport the hydrophobic lipid in hydrophilic solutions. Apolipoprotein E is of importance regarding the process of the clearance of cholesterol from the circulation and the presence of the e4 allele in its gene is the strongest known risk factor for AD [10]. The presence of the APOE e4 allele was found to be associated with the lowest level of 24SOHC, which is in agreement with the hypothesis of an earlier and more intensive neurodegenerative process in e4 carriers [11]. Oxysterols, mainly 24S-OHC and the neurotoxic 27-OHC, can cross the blood-brain barrier (BBB) and are likely the link between cholesterol metabolism in the periphery and cholesterol metabolism in the brain. It can be calculated that 99 % of the flux occurs through the BBB and only 1% via CSF [12]. Increased body cholesterol may lead to an increased conversion of cholesterol into 27-OHC and with it an increase of its entrance into the brain [13]. Alterations of 24S-OHC and 27-OHC levels may be linked with increased A β production in the brain [14–17]. However, 24S-OHC, originating mainly from the CNS [18], effluxes the brain by passing the BBB [5]. The CSF levels of 24S-OHC have shown to be increased in the most patients with AD [19] and to be associated with tau pathology and neurodegeneration [20]. It has been shown that the influx of 27-OHC into the brain correlates negatively with the efflux of 24S-OHC [19]. The regulation of 24S-OHC/27-OHC ratio could therefore be an important starting point for controlling A β levels in AD [14].

The core CSF biomarkers of AD are the β -amyloid protein (A β), which accumulates and deposit in the brain; total tau (tau), which shows the intensity of neurodegeneration, and hyperphosphorylated tau protein (p-tau), which is linked with the formation of neurofibrillary tangles [21,22]. High cholesterol diets have been shown to result in increased phosphorylation of tau protein and accumulation of tau-pathology in animal studies [23].

CSF A β ₄₂ has an inverse association to cortical amyloid load, so that low CSF levels of A β _{1–42} display amyloid depositions in the brain. It is also suggested that high CSF concentrations of cholesterol, 24S-OHC and 27-OHC are associated with increased production of soluble amyloid precursor protein (sAPP) in AD [17,24]. The processing of sAPP to generate A β peptides, responsible for amyloid plaque deposition, is executed by β - and γ -secretase, which are regulated by cholesterol and

sphingomyelin [25,26].

Here, we aim to investigate the correlation between cerebrospinal fluid (CSF) concentrations of individual components of cholesterol metabolism and of plant sterols and the presence of AD and its “core” biomarkers as well as their relationship to cognitive impairment. In addition, we want to assess the relationship between cholesterol metabolism, based on its CSF concentration of metabolites, non-cholesterol sterols and oxysterols, and plant sterols at baseline, and cognitive decline over time.

2. Methods

2.1. Study population

One hundred and forty-two individuals, aged 49–88 years, were enrolled into a study on cognitive decline and AD conducted in the Department of Psychiatry and the Department of Clinical Neurosciences, University Hospital of Lausanne, Switzerland. All subjects underwent a full clinical evaluation and neuropsychological assessment which included the Mini Mental State Examination (MMSE) and the Clinical Dementia Rating (CDR) as previously described [27,28]. Briefly, a full test battery along with standardised questionnaires applied to the participants and their relatives was used to determine the CDR and CDR sum of boxes (CDRSoB) scores and to verify inclusion and exclusion criteria. Scales and tests used are validated and common in the field. All subjects in the cognitive impaired (CI) group had memory impairment, and/or impairment in other cognitive domains such as executive tasks or language skills. In addition, all subjects in the CI group had clinical diagnoses of either mild cognitive impairment (MCI) or mild dementia, and a CDR score > 0.5 [28]. Candidates with neurological or psychiatric affections that may interfere with cognitive performance, or unstable, or acute medical conditions were excluded. Cognitive unaffected or normal (CN) subjects were free of relevant psychiatric or neurologic disease, had neither current cognitive impairment nor a history of it, and had CDR = 0. They were recruited through journal announcements and word of mouth [28] and the same tests as for the CI subjects were used for their assessment. Clinical and neuropsychological evaluations were repeated after 18- and 36-months during follow-up visits using the same methods and tests.

2.2. Protection of human participants

The study was conducted in accordance with applicable laws and regulations, including the International Conference on Harmonization, Guideline for Good Clinical Practice and the ethical principles that have their origins in the Declaration of Helsinki [29]. The local ethics committee approved this study (No. 171/2013), and all participants or their legal representatives provided written informed consent.

2.3. Cerebrospinal fluid collection

Lumbar punctures were performed after an overnight fast. Ten to twelve mL of CSF were collected for analysis, spun down at 4 °C, immediately aliquoted, and snap frozen at –80 °C until assayed [30].

2.4. CSF AD biomarkers, albumin index, and APOE genotype

CSF β -amyloid 1–42 peptide (A β _{1–42}), A β _{1–40}, total-tau (tau) and tau phosphorylated at threonine 181 (p-tau) concentrations were measured using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits (Fujirebio, Gent, Belgium). Additionally, the concentrations of A β _{1–42} and A β _{1–40} were measured with immunoassays from IBL International (Hamburg, Germany) according to the manufacturer's protocols. The ratios of the biomarkers (tau/ A β _{1–42} and p-tau/A β _{1–42}) were also calculated as markers of the combined presence of β -amyloid-pathology and neuronal injury tau-pathology. An AD CSF profile was defined by a

p-tau/A β_{1-42} ratio > 0.0779 indicating concomitant presence of amyloid pathology and tau pathology, as previously described [30].

The albumin CSF/serum ratio (Q_{Alb}) as a marker of blood-CSF barrier (BCB) function along with the Apolipoprotein E (APOE) genotype were determined as previously described [31]. Study staff blinded to clinical data performed biochemical and genetic analyses.

2.5. Sterol metabolites measurements

Concentrations of cholesterol, non-cholesterol sterols (cholesterol precursors: lanosterol, 2425-dihyrolanosterol, desmosterol and lathosterol and the plant sterols: campesterol and sitosterol) and cholesterol metabolites such as 5 α -cholestanol and the oxysterols 24S- and 27-OHC in CSF were measured by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring (GC-MS-SIM) [32,33]

2.6. Data and statistical analysis

For statistical analyses the cohort was twice divided into two subgroups: firstly, into control (CN) and cognitively impaired participants (CI; the participants with MCI and those with dementia were considered together as one group) according to the clinical presentation; and secondly, into AD and non-AD group according to the presence or absence of a CSF AD biomarker profile (AD: p-tau/A β_{1-42} ratio > 0.0779).

The subgroups of CN and CI participants were compared by using Students' two-tailed *t*-test for continuous variables and Chi-square tests for categorical variables. Data are given as median (interquartile range). Benjamini-Hochberg correction of *P*-value for multiple testing was applied for all analyses using a false-discovery rate of 0.1.

Correlations between sterol concentrations and neuropsychological measures (i.e., CDRSoB and MMSE) were assessed with Spearman's rho. To evaluate the associations between cholesterol metabolite concentrations and clinical disease severity and cognitive performance at baseline while controlling for possible confounders, we used linear regression with CDRSoB or MMSE as dependent variables and individually selected metabolites, based on correlations and group comparisons, as independent variables and considering Sex, Age, Years of Education, APOE status and Q_{Alb} by entering them into the model before considering cognitive measurements. A binary logistic regression was performed to evaluate the association between cholesterol metabolism and cognitive impairment at baseline, using cognitive impairment (CDR > 0) at baseline as a dependent variable and the same confounders as above.

Individual concentrations of cholesterol, non-cholesterol sterols, cholesterol metabolites 5 α -cholestanol and oxysterols 24S-OHC and 27-OHC as well as the 24S-OHC/27-OHC ratio were compared in subgroups (AD and non-AD group) based on the presence/absence of cerebral AD pathology by using Students' two-tailed *t*-test. The ratio of 24S-OHC to 27-OHC serves as a reflector of the cholesterol metabolism in the brain relatively to the cholesterol metabolism in the periphery [34]. We analysed the association of sterol concentrations with the presence of AD pathology (according to the p-tau/A β_{1-42} ratio cut-off) using binary logistic regression. We considered the following possible confounders: Sex, Age, APOE status, and Q_{Alb} by entering them into the model before considering sterol concentrations.

Correlations between cholesterol metabolites and CSF A β_{1-42} , A β_{1-42} /A β_{1-40} , Tau and p-tau were analysed by two-tailed Pearson's correlation coefficient in the whole cohort. To appraise the association of cholesterol metabolites with CSF biomarkers of amyloid pathology, neuronal injury, and tau pathology we used linear regression with individual CSF AD biomarkers as dependent variable and selected sterol metabolites as independent variables. Sterol metabolites were selected based on the results of the above correlations and group comparisons. We considered the following possible confounders: Sex, Age, APOE status, and Q_{Alb} by entering them into the model before considering sterol concentrations.

We used linear regression models to evaluate the association between selected cholesterol metabolites and clinical disease severity progression, and cognitive decline at both the first follow-up visit (FU) and last FU for each participant. Cognitive decline was assessed using change in CDRSoB or MMSE scores normalised according to the number of months elapsed between baseline assessment and follow-up visit, therefore correcting for bias in different time periods between baseline and follow-up visits. We considered the effect of the following confounders: Sex, Age, Years of education, Q_{Alb} , APOE and Baseline cognitive impairment (CDR > 0) by entering them into the model before considering sterol concentrations.

The data and statistical analysis, performed with IBM SPSS Statistics version 25.0, comply with the recommendations on experimental design and analysis in pharmacology [35].

3. Results

3.1. Characteristics of the cohort

Subjects' characteristics and biochemical data on average by group comparison, based on cognitive status at baseline, are shown in Table 1. Of 142 individuals, aged 49–88 years, 61 were cognitively normal (CN) and 81 were cognitively impaired (CI). A β_{1-42} and the A β_{1-42} /A β_{1-40} ratio show significantly reduced levels in the CI group, which is in accordance with an increased cortical A β burden. All other measured protein biomarkers as well as age displayed significant differences. No significant differences between sterols in CN and CI subjects were found (data not shown). Longitudinal clinical data from at least one FU visit were available in 116 participants. The mean FU time for the first and the last FU visits were 18.6 and 30.4 months, respectively.

3.2. Correlations and associations between sterol concentrations and neuropsychological measures

We next examined the correlations between sterol concentrations and neuropsychological measures (CDR, CDRSoB and MMSE). We did not find any significant correlation.

Linear regressions with CDRSoB and MMSE as dependent variable and either 24S-OHC, the ratio of 24S-OHC/27-OHC, desmosterol, campesterol or sitosterol are shown in Table 2 and Table 3. Significant associations of desmosterol with CDRSoB and MMSE at baseline were found.

Binary linear regression tests with cognitive impairment at baseline as dependent variable and the same sterol metabolites as independent variables showed a slightly significant negative association between cognitive impairment at baseline and 24S-OHC (Regression coefficient, B: -0.504, Standard error of B, SE: 0.255, *P*-Value: 0.048).

Table 1
Characteristics of cognitive normal (CN) and cognitive impaired (CI) subjects.

Subject characteristics	CN group (n = 61)	CI group (n = 81)	<i>P</i> -Value ^a
Sex (m/f): n	23/38	34/47	0.610
Age (years)	70 (65–75) ^b	74 (69.5–78)	< 0.001
Years of education	12 (11–15)	12 (9.8–14)	0.071
MMSE	29 (28–29)	26 (22.5–29)	< 0.001
CDRSoB	0 (0–0)	1.5 (0.5–3)	< 0.001
BMI	26 (22.8–28.4)	25 (22–27)	0.348
A β_{1-42} (pg/mL)	1020 (795.5–1222.4)	696 (563–983)	< 0.001
A β_{1-42} /A β_{1-40}	0.07 (0.05–0.08)	0.043 (0.03–0.06)	< 0.001
Tau (pg/mL)	278.7 (211–388)	389 (276–601)	< 0.001
p-tau (pg/mL)	52.2 (42.6–68.5)	63.6 (50.9–83.4)	0.025

A β_{1-40} , β -amyloid 1–40 peptide; A β_{1-42} , β -amyloid 1–42 peptide; BMI, body mass index; CDRSoB, Clinical Dementia Rating sum of boxes; MMSE, mini mental state examination; p-tau, phosphorylated tau at threonine 181; tau, total tau.

^a *P*-Values were calculated using Students' two-tailed *t*-test.

^b Values are presented as median (interquartile range).

3.3. Correlations and association of sterol concentration with AD

We then performed group comparisons for the non-AD and AD groups, defined according to the presence of an AD CSF biomarker profile. 24S-OHC and the 24S-OHC/27-OHC ratio were significantly higher in participants with cerebral AD pathology (Table 4).

We also analysed the correlations of cholesterol metabolites with AD biomarkers within the subgroups of non-AD and AD, based on p-tau/ $A\beta_{1-42}$ ratio (Table 5). Within the AD group the campesterol and sitosterol levels correlated with tau. By contrast, none of those correlations were statistically significant in the non-AD group. Furthermore, 24S-OHC was positively correlated with p-tau in the AD group. Within the non-AD group, 24S-OHC was significantly positively correlated to the $A\beta_{1-42}$ and p-tau levels.

3.4. Correlation between sterol CSF data and individual biomarkers of AD pathology

Correlations between 24S-OHC, tau and p-tau were significant in the AD and non-AD subjects (Fig. 1A). A significant correlation between 27-OHC, the 24S-OHC/27-OHC ratio, and the albumin ratio was observed. Desmosterol levels correlated with $A\beta_{1-42}$ (Fig. 1B) for the whole cohort. CSF levels of 24S-OHC correlated significantly with tau and p-tau in the whole population (Fig. 1C) and those of campesterol and sitosterol correlated significantly with the albumin ratio in the AD, non-AD and the whole population (Fig. 1A).

Linear regressions with the $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ ratio, $A\beta_{1-42}$, p-tau and tau as dependent variables and 24S-OHC, 24S-OHC/27-OHC ratio, campesterol, desmosterol and sitosterol as independent variable are shown in Table 6. Positive and significant associations between $A\beta_{1-42}$ and desmosterol, as well as between tau and p-tau, and 24S-OHC, the 24S-OHC/27-OHC ratio and sitosterol were found. The 24S-OHC, campesterol and sitosterol concentrations and the 24S-OHC/27-OHC ratio were associated with tau levels.

Binary regression showed associations of the 24S-OHC/27OHC and campesterol or sitosterol levels with the p-tau/ $A\beta_{1-42}$ ratio.

3.5. Alterations in cholesterol metabolism as predictors of cognitive decline

Linear regression with either the score changes of MMSE or CDRSoB at the first FU and the last FU as dependent variable, assessing cognitive decline over time, showed significant associations of campesterol and sitosterol with decreased MMSE at first FU. The ratio of 24S-OHC/27-OHC was significantly associated with an increasing CDRSoB score at the last FU (Table 7 and Table 8).

A summarizing figure merges the individual correlations and associations of the biochemical marker, cholesterol, and non-cholesterol sterols as well as the clinical tests (Graphical Abstract).

Table 2

Linear regression on clinical disease severity at baseline, based on CDRSoB.

Predictor	B	SE	R ²
24S-OHC	-0.395	0.224	0.127
24S-OHC/27-OHC	0.228	0.429	0.102
Desmosterol	-3.888	1.033	0.211***
Campesterol	-0.035	0.302	0.100
Sitosterol	0.53	0.103	0.102

*Correlation is significant at level 0.05; ** at level 0.01; ***Correlation is significant at level 0.001.

CDRSoB, Clinical Dementia Rating sum of boxes; B, regression coefficient; SE, Standard error of B; R², square of correlation coefficient; 24S-OHC, 24S-hydroxycholesterol; 27-OHC, 27-hydroxycholesterol.

Table 3

Linear regression on cognitive performance at baseline, based on MMSE.

Predictor	B	SE	R ²
24S-OHC	0.288	0.357	0.138
24S-OHC/27-OHC	-0.442	0.674	0.369
Desmosterol	5.262	1.656	0.212*
Campesterol	-0.016	0.476	0.080
Sitosterol	-0.016	0.163	0.364

MMSE, mini-mental state examination; B, regression coefficient, SE, Standard error of B; β , standardised regression coefficient; R², square of correlation coefficient, 24S-OHC, 24S-hydroxycholesterol; 27-OHC, 27-hydroxycholesterol.

* Correlation is significant at level 0.05.

Table 4

Biochemical data in group comparison.

Biochemical CSF data	Non-AD (n = 87)	AD Group (n = 55)	P-Value ^a
Cholesterol (mg/dL)	0.45 (0.38–0.56) ^b	0.45 (0.38–0.54)	0.624 ^b
Lanosterol (μ g/dL)	0.23 (0.22–0.23)	0.22 (0.22–0.23)	0.891
24.25-Dihydrolanosterol (μ g/dL)	0.02 (0.019–0.022)	0.02 (0.019–0.024)	0.901
Desmosterol (μ g/dL)	0.68 (0.56–0.82)	0.66 (0.51–0.78)	0.114
Lathosterol (μ g/dL)	0.25 (0.20–0.32)	0.23 (0.19–0.26)	0.135
5 α -Cholestanol (μ g/dL)	0.11 (0.10–0.12)	0.11 (0.099–0.120)	0.882
Campesterol (μ g/dL)	1.25 (0.99–1.76)	1.15 (0.09–1.43)	0.232
Sitosterol (μ g/dL)	4.19 (3.25–5.45)	3.60 (3.11–4.93)	0.249
24S-OHC (ng/mL)	2.65 (2.25–3.16)	3.07 (2.56–3.86)	0.005
27-OHC (ng/mL)	1.66 (1.13–2.13)	1.50 (1.32–2.05)	0.601
24S-OHC/27-OHC ratio	1.74 (1.43–2.07)	1.96 (1.60–2.32)	0.013

CSF, Cerebrospinal fluid; Non-AD, no Alzheimer Dementia; AD, Alzheimer Dementia, 24S-OHC, 24S-hydroxycholesterol; 27-OHC, 27-hydroxycholesterol.

^a P-Values were calculated using Students' two-tailed t-test.

^b Values are presented as median (interquartile range).

Table 5

Correlations between CSF Sterols and CSF AD biomarkers for non-AD and AD group.

Pearson correlation coefficient for	Non-AD (n = 86)	AD (n = 55)
Tau vs campesterol	0.108	0.332**
Tau vs sitosterol	0.107	0.374***
24S-OHC vs $A\beta_{1-42}$	0.291***	0.209
24S-OHC vs p-Tau	0.623***	0.361***

*Correlation is significant at level 0.05; ** at level 0.01; *** at level 0.001.

Non-AD, no Alzheimer Dementia; AD, Alzheimer Dementia; $A\beta_{1-42}$, β -amyloid 1–42 peptide; 24S-OHC, 24S-hydroxycholesterol; 27-OHC, 27-hydroxycholesterol.

4. Discussion

We investigated alterations of CSF levels of cholesterol, non-cholesterol sterols, and oxysterols in cognitive impaired and AD patients, and addressed relations with CSF markers of amyloid pathology, tau-related neurodegeneration and with measures of cognitive decline. We found higher CSF 24S-OHC levels and the 24S-OHC/27-OHC ratio in subjects with AD. CSF desmosterol correlated with $A\beta_{1-42}$ levels. The plant sterols campesterol and sitosterol were associated with the tau/ $A\beta_{1-42}$ ratio and predicted cognitive decline at follow-up visits.

We found increased CSF 24S-OHC and 24S-OHC/27-OHC ratio in subjects with cerebral AD pathology compared to participants without AD. Previous studies reported such alterations in subjects with clinically defined AD but did not consider whether those subjects' cognitive impairment was related to the presence of cerebral AD pathology nor if the cognitively normal controls may have had preclinical AD [17,24]. Our results show that these alterations are related to the presence of AD pathology while the levels of 24S-OHC and the 24S-OHC/27-OHC

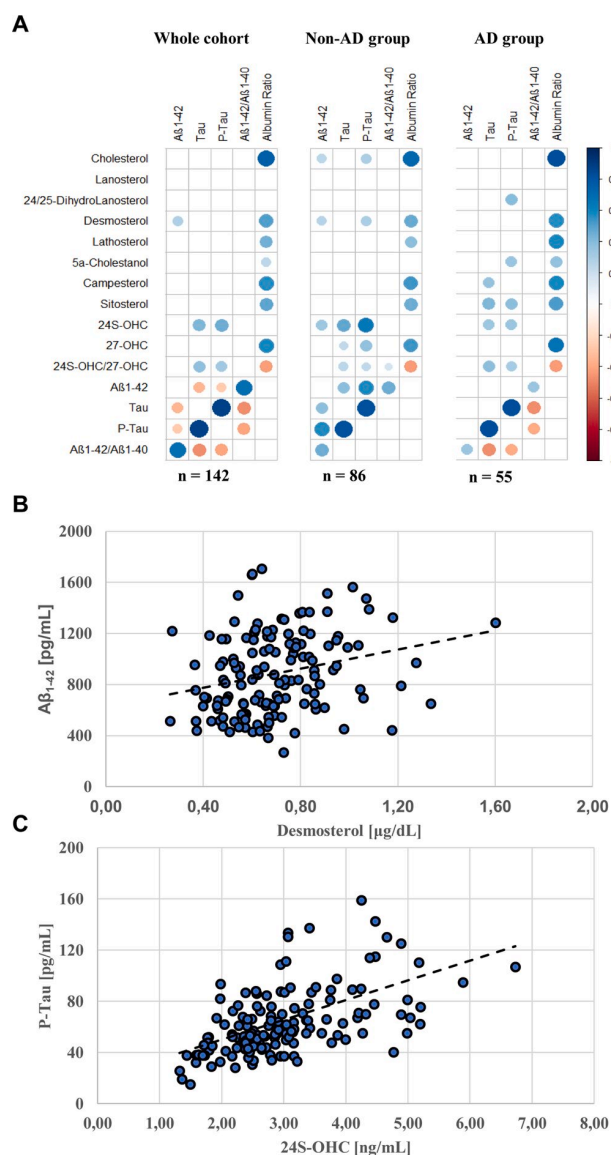


Fig. 1. (A) Correlation matrix presenting individual sterol and oxysterol correlations with each CSF AD biomarker and Albumin ratio in the whole cohort (left), non-AD participants (middle) and AD patients (right). Positive correlations are shown in blue and negative correlations in red. The size of the circle is proportional to the significance of the correlation. Insignificant correlations (p -value > 0.05) are omitted. (B, C) Scatter plots of individual sterols of interest versus specific CSF AD biomarkers in the whole cohort. Dotted line represents linear regression trendline. Desmosterol vs. Aβ₁₋₄₂, R² = 0.0644, P < 0.001 (B) and 24S-OHC vs. P-Tau, R² = 0.2073, P < 0.001 (C) are shown. Aβ₁₋₄₀, β-amyloid 1–40 peptide; Aβ₁₋₄₂, β-amyloid 1–42 peptide; p-tau, phosphorylated tau at threonine 181; tau, total tau; 24S-OHC, 24S-hydroxycholesterol; 27-OHC, 27-hydroxycholesterol, R², regression coefficient; P, significance.

ratio are not significantly altered in patients with cognitive impairment, i.e. presenting as MCI or mild dementia of AD type, as compared to cognitively normal subjects; indicating that increased cholesterol metabolism in the CNS relative to the periphery is specifically related to the presence of cerebral AD pathology across the clinical continuum of the disease. Altered levels of the oxysterol 27-OHC have been reported in clinically diagnosed AD in prior studies [17,19,24]. It has been suggested that increased influx of 27-OHC from the circulation into the brain may be compensated by an increased efflux of 24S-OHC [19].

Table 6
Linear regression to predict Aβ₁₋₄₂, p-tau and tau.

Predictors for Aβ ₁₋₄₂	B	SE	R ²
24S-OHC	49.787	30.488	0.196
24S-OHC/27-OHC	-34.487	59.116	0.179
Desmosterol	436.587	142.711	0.243*
Campesterol	-15.271	40.575	0.177
Sitosterol	-1.892	13.981	0.176
Predictors for p-tau			
24S-OHC	13.293	3.412	0.258***
24S-OHC/27-OHC ratio	23.386	6.618	0.241***
Desmosterol	20.336	17.482	0.163
Campesterol	8.703	4.723	0.178
Sitosterol	4.805	1.585	0.220*
Predictors for tau			
24S-OHC	94.804	28.035	0.226***
24S-OHC/27-OHC ratio	230.827	51.972	0.277***
Desmosterol	88.079	142.059	0.146
Campesterol	89.171	37.834	0.185*
Sitosterol	34.585	12.937	0.197***

B, regression coefficient, SE, Standard error of B; R², square of correlation coefficient, 24S-OHC, 24S-hydroxycholesterol; 27-OHC, 27-hydroxycholesterol. * Correlation is significant at level 0.05; ** at level 0.01; *** at level 0.001.

Table 7
Linear regression test to evaluate associations between the CSF concentrations of sterols and CDRSoB in the first and the last follow-up.

First Follow Up	B	SE	R ²
24S-OHC	0.10	0.017	0.373
24S-OHC/27-OHC ratio	0.025	0.031	0.376
Desmosterol	0.093	0.023	0.384
Campesterol	0.023	0.008	0.371
Sitosterol	0.008	0.008	0.371
Last Follow Up			
24S-OHC	0.016	0.011	0.289
24S-OHC/27-OHC ratio	0.043	0.020	0.313*
Desmosterol	0.060	0.015	0.278
Campesterol	0.015	0.005	0.277
Sitosterol	0.005	0.005	0.272

B, regression coefficient; SE, Standard error of B; R², square of correlation coefficient; 24S-OHC, 24S-hydroxycholesterol; 27-OHC, 27-hydroxycholesterol. * Correlation is significant at level 0.05.

Table 8
Linear regression test to evaluate association between the CSF concentrations of sterols and MMSE in the first and the last follow-up.

First Follow Up	B	SE	R ²
24S-OHC	-0.001	0.017	0.197
24S-OHC/27-OHC ratio	-0.037	0.030	0.212
Desmosterol	0.076	0.089	0.204
Campesterol	-0.057	0.021	0.265*
Sitosterol	-0.019	0.007	0.260*
Last Follow Up			
24S-OHC	-0.010	0.017	0.263
24S-OHC/27-OHC ratio	-0.026	0.031	0.267
Desmosterol	-0.009	0.097	0.260
Campesterol	-0.029	0.031	0.269
Sitosterol	-0.007	0.010	0.265

B, regression coefficient; SE, Standard error of B; R², square of correlation coefficient; 24S-OHC, 24S-hydroxycholesterol; 27-OHC, 27-hydroxycholesterol. * Correlation is significant at level 0.05.

Increased circulating levels of cholesterol in hypercholesterolemia are highly correlated with increased levels of 27-hydroxycholesterol in the same subjects. This leads to the assumption that a high body cholesterol level results in enhanced 27-OHC processing and increased influx of this oxysterol into the brain and represents the link between hypercholesterolemia and AD [19]. Björkhem et al. showed brain levels of 27-OHC to be increased in AD [19]. Our data show decreased levels of

CSF 27-OHC, so it can be assumed that 27-OHC presumably accumulates in the brain, leading to the decreased CSF level of 27-OHC. This is underlined by the significantly higher ratio of CSF 24S-OHC to 27-OHC in AD as compared to subjects without AD, as presented.

Furthermore, we have shown an association between the 24S-OHC/27-OHC ratio and CDRSoB score changes at follow up visits. This can be seen as an underline of the importance of the increased cholesterol metabolism in the CNS, represented by the ratio of 24S-OHC/27-OHC, relative to the periphery for disease progression over time. Therefore, the magnitude of the CNS cholesterol metabolism alteration may represent an indicator or a factor contributing to rapidly progressive neurodegeneration and related clinical worsening, or both.

Additionally, 27-OHC has been shown to be linked to amyloid pathology. CSF 27-OHC correlates with sAPP levels [17] and increased levels of 27-OHC in the brain may increase $A\beta_{1-42}$ production leading to $A\beta_{1-42}$ accumulation [14]. Due to the association of the CSF 24S-OHC/27-OHC ratio with AD, the suggested correlated efflux of 24S-OHC and influx of 27-OHC, and its effects on $A\beta_{1-42}$ production, the regulation of the 24S-OHC/27-OHC ratio could be an interesting target in modulating $A\beta_{1-42}$ production. 24S-OHC was shown to increase sAPP levels and 27-OHC to increase $A\beta_{1-42}$ levels in experimental studies [14,16,36,37]. With the results of our study these relationships can be assumed in humans as well, so it can be suggested that 24S-OHC and 27-OHC might have effects on the production or processing of sAPP and $A\beta$ peptides by taking part in the regulation of the secretase(s) processing sAPP into $A\beta$ peptides. It has been shown that brain 24S-OHC has an inhibitory effect on the generation of amyloid plaques and this inhibitory effect may be reduced by the replacement of 24S-OHC by 27-OHC in the brain [15]. So that the regulation of the levels of oxysterols, especially the increased influx of 27-OHC, may result in reduced production of $A\beta_{1-42}$ and its reduced release into the CSF. One option for patients with early forms of AD or at risk for AD could be to receive low-dose statins together with ezetimibe to lower cholesterol and plant sterols outside the CNS only with the effect of lowering the 27-OHC level, so that less 27-OHC can enter the CNS, triggering a higher flow within the CNS, i.e. increased cholesterol synthesis and stimulation of CYP46A1 and thus increased conversion into 24S-OHC [8,38,39].

Our results further reveal associations between CSF 24S-OHC and both CSF p-tau and tau levels indicating relationships with tau pathology and neurodegeneration. Previously we reported association between 24S-OHC and p-tau CSF levels in an independent cohort [20]. A prior study has shown an association between 24S-OHC and tau in Parkinson's disease and corticobasal syndrome [40]. Björkhem et al. first suggested a direct interaction between the neuronal production of 24S-OHC and tau, but this hypothesis was not supported by experiments with mouse models, where the neuronal levels of 24S-OHC were not altered in tau knock-out or tau-overexpressing mice [40]. Therefore, a direct interaction between 24S-OHC and tau does not seem to be likely, rather the strong association seems to be secondary to neurodegeneration, suggesting that, due to cell death and released cholesterol and tau, the levels of the cholesterol elimination product 24S-OHC increase along with increasing tau levels.

Interestingly, desmosterol as a biosynthetic intermediate of the cerebral sterol biosynthesis, showed a positive association with cognitive performance, implying that a high level of desmosterol may be protective of cognitive impairment, but a significant reduction of its level in the AD group was not found. Whereas 24S-OHC, indicating cerebral cholesterol turnover, was significantly elevated in the AD group, but showed no association to MMSE nor CDRSoB scores at baseline, reflecting cognitive performances and clinical disease severity. 24S-OHC correlated instead with tau and p-tau, and thus reflecting the increased solution of cholesterol and transformation in its elimination product 24S-OHC in relation to neurodegeneration and tau pathology. This might be the explanation for the correlation between 24S-OHC and AD.

Regarding the putatively protective relation between desmosterol and AD pathology, we additionally found a novel significant positive correlation between CSF levels of desmosterol and $A\beta_{1-42}$. This suggests decreased CSF levels of desmosterol may lead to an increased load of amyloid pathology in the brain, as indicated by decreased $A\beta_{1-42}$ levels in the CSF. A previous study found that decreased cholesterol production is correlated to an increased APP β -cleavage and $A\beta$ production [41]. This leads to the assumption that due to less desmosterol, less cholesterol is synthesized, and a negative feedback mechanism of the secretase, processing APP, leads to increased cerebral amyloid accumulation and an increased risk of AD.

It is established that the enzyme seladin-1, which is of importance in the processing of desmosterol into cholesterol, is lower in AD subjects [41], further leading to a decreased cholesterol level in the brain. Accordingly, the modulation of desmosterol levels and its processing could represent treatment targets to maintain normal cerebral cholesterol production. Additionally, the mechanisms linking the decreased levels of desmosterol with $A\beta_{1-42}$ levels remain to be further investigated. Intriguingly, we also observed a significant negative association of desmosterol levels with CDRSoB scores suggesting that altered cholesterol production as indicated by lower desmosterol levels has relevance for clinical disease severity.

Interestingly, we found associations between the plant sterols campesterol and sitosterol and tau in the whole population as well as in the separately tested AD group. To the best of our knowledge, these associations have not been reported earlier. Additionally, we found an association between the plant sterols and MMSE score change at follow-up visits, indicating a relevance of plant sterols for disease progression over time. The findings lead to the assumption that the plant sterols, which are structurally similar to cholesterol, have effects on neurodegeneration and specifically on AD-related neurodegeneration, and that this may be relevant for clinical disease progression over time. Since those sterols are exclusively of dietary origin and are transported by lipoproteins, the positive correlation between the levels of the plant sterols and tau levels could also indicate a defective BCB. Plant sterols cannot be hydroxylated into 24S-OH-campesterol or -sitosterol and thus appear to accumulate in the CNS [7]. Under physiological conditions the transport of plant sterols, as well as the transport of cholesterol, towards the CNS is limited. The unbalanced exchange of sterols between the CNS may accordingly indicate a dysfunctional BCB [7]. A previous study has shown that CSF plant sterols levels, especially brassicasterol and sitosterol, are significantly lower in AD patients and that the albumin quotient was a strong predictor for plant sterol concentrations in the CSF [42]. Here, we show a positive correlation between the plant sterols and the albumin ratio, which reflects the integrity of the BCB, and supports this hypothesis.

Data in Table 4 confirms previous findings that absolute levels of 24S-OHC and its ratio to 27-OHC in CSF are significantly higher in AD patients. 24S-OHC and the ratio of 24S-OHC/27-OHC correlate with tau and p-tau as shown in Fig. 1A and Fig. 1C (neurodegeneration and tau pathology) likely resulting from neuronal cell death and with it solution of cholesterol and conversion in its elimination product 24S-OHC. Though not significant, the absolute levels of 27-OHC are lower. During AD pathology progress the blood-brain barrier and most probably the blood-cerebrospinal fluid barrier (BCB) integrity is impaired [31]. Fig. 1A shows a highly significant correlation of CSF 27-OHC levels with the albumin ratio. No such correlation is observed for 24S-OHC. Thus, the ratio of 24S-OHC to 27-OHC is negatively and significantly correlated with the albumin ratio. This could indicate that the influx of 27-hydroxycholesterol from the periphery into the CSF is determined by the function of the BCB in general while in AD this influx may more marked due to disease-related BCB dysfunction.

Nevertheless, after controlling for the albumin ratio in the separately tested AD group, the correlation between sitosterol, campesterol and the level of tau remained significant, showing that this relationship is independent of BCB impairment and specific to AD. Interestingly, the

campesterol/sitosterol ratio in the CSF is opposite and lower than in the serum, where the level of campesterol is twice as much as sitosterol, due to doubled absorption rates [43]. This indicates either an easier transport of sitosterol over the BCB or an accumulation of in fluxed campesterol in the CNS and with it an increased efflux of sitosterol into the CSF. Additionally, another study showed that campesterol and sitosterol increase $A\beta_{1-42}$ generation and secretion, but are not as amyloidogenic as cholesterol, and that stigmasterol, another plant sterol, might be beneficial in preventing AD by reducing $A\beta$ generation [9]. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe has been shown to reduce cholesterol and plant sterol absorption, which in turn was shown to be higher after the inhibition of cholesterol synthesis by statins [39] suggesting that ezetimibe may also be a possible target to interfere with the development of AD pathology in reducing both, peripheral cholesterol and plant sterols. Nevertheless, it has to be further investigated if plant sterols have a direct effect on the integrity of the BCB and neurodegeneration; or if those associations are secondary to an increased flux of plant sterols via lipoproteins over a defective BCB, which commonly occurs in AD patients [31], or both. Lowering plant sterol levels may slow down clinical disease progression through these different mechanisms.

The findings of this study have to be seen in light of some limitations. As the size of the cohort was limited and especially the CN group was too small to address the question whether the shown associations between AD's core biomarker and cholesterol metabolites may precede the clinical stage of the disease. Also, the time between baseline tests and follow up visits might not be long enough to evaluate the cognitive decline in participants with normal cognition.

Since our data is obtained on CSF, drawing, especially in routine practice, is more complicated and often unable to perform. In university memory clinics, the sampling and analysis of biochemical markers for neurodegenerative diseases has become routine provided that the sampling is performed by experienced and well-trained clinicians or neurologists. However, we were able to obtain results in subgroups strictly defined according to the presence/absence of AD pathology while considering important possible confounders such as baseline cognitive status, BCB function and APOE genotype and we also addressed effects on cognitive function and decline over time.

5. Conclusion

We presented associations of CSF desmosterol with $A\beta_{1-42}$ and of CSF campesterol and sitosterol with tau and p-tau indicating the influence of cholesterol synthesis in amyloidogenesis and the involvement of plant sterols in tau pathology and neurodegeneration. Additionally, we showed associations of CSF 24S-OHC with tau and p-tau indicating CNS cholesterol degradation in relation to neurodegeneration and tau pathology. As indicated by correlations of desmosterol with the scores of MMSE and CDRSoB at baseline (Table 2 and Table 3), of campesterol and sitosterol levels with MMSE score changes at the first follow-up visits (Table 8), as well as by correlation of the 24S-OHC/27-OHC ratio with CDRSoB score changes at the last follow-up visits (Table 7), these associations are relevant for clinical severity and progression of the disease over time.

The results from this study supports already ongoing attempts to lower peripheral circulating concentrations of plant sterols and cholesterol or its metabolites and their influx into the CNS and to decrease CNS cholesterol synthesis and metabolism. Whether lipid-lowering drugs such as statins, ezetimibe or Proproteinconvertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) inhibitors may be useful, not only in coronary or peripheral artery disease, but also to prevent or treat AD needs further investigation. However, if the use of high-dose lipophilic statins, anti-PCSK9 antibodies or combination with ezetimibe interrupts a causal relation between sterol metabolism and AD or may slow down both progression of cerebral pathology and cognitive decline by secondary or pleiotropic effects has to be clarified in further clinical studies.

CRedit authorship contribution statement

Tabea Jahn: Data curation, Formal analysis, Methodology, Software, Validation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Christopher Clark:** Data curation, Formal analysis, Software, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Anja Kerksiek:** Data curation, Methodology, Software, Validation, Writing - review & editing. **Piotr Lewczuk:** Investigation, Methodology, Writing - review & editing. **Dieter Lütjohann:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Software, Validation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Julius Popp:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Software, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Swiss National Research Foundation (to JP) (SNF 320030_141179), Synapsis Foundation - Alzheimer Research Switzerland (to JP) (grant number 2017-PI01) The skilful technical assistance by Cornelia Corno and Gwendoline Peyratout is gratefully acknowledged.

References

- [1] B. Dubois, H.H. Feldman, C. Jacova, J.L. Cummings, S.T. Dekosky, P. Barberger-Gateau, A. Delacourte, G. Frisoni, N.C. Fox, D. Galasko, S. Gauthier, H. Hampel, G. A. Jicha, K. Meguro, J. O'Brien, F. Pasquier, P. Robert, M. Rossor, S. Salloway, M. Sarazin, L.C. de Souza, Y. Stern, P.J. Visser, P. Scheltens, Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon, *Lancet Neurol.* 9 (2010) 1118–1127.
- [2] G. Cermenati, N. Mitro, M. Audano, R.C. Melcangi, M. Crestani, E. De Fabiani, D. Caruso, Lipids in the nervous system: from biochemistry and molecular biology to patho-physiology, *Biochim. Biophys. Acta* 1851 (2015) 51–60.
- [3] M.M. Mielke, C.G. Lyketsos, Lipids and the pathogenesis of Alzheimer's disease: is there a link? *Int. Rev. Psychiatry* 18 (2006) 173–186.
- [4] K.J. Anstey, D.M. Lipnicki, L.F. Low, Cholesterol as a risk factor for dementia and cognitive decline: a systematic review of prospective studies with meta-analysis, *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 16 (2008) 343–354.
- [5] I. Björkhem, S. Meaney, Brain cholesterol: long secret life behind a barrier, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (2004) 806–815.
- [6] A. Zarrouk, M. Debbabi, M. Bezine, E.M. Karym, A. Badreddine, O. Rouaud, T. Moreau, M. Cherkaoui-Malki, M. El Ayebe, B. Nasser, M. Hammami, G. Lizard, Lipid biomarkers in Alzheimer's disease, *Curr. Alzheimer Res.* 15 (2018) 303–312.
- [7] T. Vanmierlo, J.F. Bogie, J. Mailleux, J. Vanmol, D. Lütjohann, M. Mulder, J. J. Hendriks, Plant sterols: Friend or foe in CNS disorders? *Prog. Lipid Res.* 58 (2015) 26–39.
- [8] K. von Bergmann, T. Sudhop, D. Lütjohann, Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights, *Am. J. Cardiol.* 96 (2005) 10D–14D.
- [9] V.K. Burg, H.S. Grimm, T.L. Rothhaar, S. Groschen, B. Hundsdoerfer, V. J. Haupenthal, V.C. Zimmer, J. Mett, O. Weingartner, U. Laufs, L.M. Broersen, H. Tanila, T. Vanmierlo, D. Lütjohann, T. Hartmann, M.O. Grimm, Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study, *J. Neurosci.* 33 (2013) 16072–16087.
- [10] E.H. Corder, A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, G. W. Small, A.D. Roses, J.L. Haines, M.A. Pericak-Vance, Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families, *Science* 261 (1993) 921–923.
- [11] V. Leoni, C. Caccia, Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases, *Chem. Phys. Lipids* 164 (2011) 515–524.
- [12] D. Lütjohann, K. von Bergmann, 24S-hydroxycholesterol: a marker of brain cholesterol metabolism, *Pharmacopsychiatry* 36 (2003) S102–106.
- [13] M. Heverin, S. Meaney, D. Lütjohann, U. Diczfalusy, J. Wahren, I. Björkhem, Crossing the barrier: net flux of 27-hydroxycholesterol into the human brain, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 1047–1052.
- [14] J.R. Prasanthi, A. Huls, S. Thomasson, A. Thompson, E. Schommer, O. Ghribi, Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on beta-amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Mol. Neurodegener.* 4 (2009) 1.
- [15] D. Famer, S. Meaney, M. Mousavi, A. Nordberg, I. Björkhem, M. Crisby, Regulation of alpha- and beta-secretase activity by oxysterols: cerebrosterol stimulates processing of APP via the alpha-secretase pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359 (2007) 46–50.

- [16] G. Marwarha, S. Raza, J.R. Prasanthi, O. Ghribi, Gadd153 and NF-kappaB crosstalk regulates 27-hydroxycholesterol-induced increase in BACE1 and beta-amyloid production in human neuroblastoma SH-SY5Y cells, *PLoS One* 8 (2013), e70773.
- [17] J. Popp, P. Lewczuk, H. Kölsch, S. Meichsner, W. Maier, J. Kornhuber, F. Jessen, D. Lütjohann, Cholesterol metabolism is associated with soluble amyloid precursor protein production in Alzheimer's disease, *J. Neurochem.* 123 (2012) 310–316.
- [18] D. Lütjohann, O. Breuer, G. Ahlborg, I. Nennesmo, A. Siden, U. Diczfalusy, I. Björkhem, Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 9799–9804.
- [19] I. Björkhem, M. Heverin, V. Leoni, S. Meaney, U. Diczfalusy, Oxysterols and Alzheimer's disease, *Acta Neurol. Scand.* 185 (2006) 43–49.
- [20] J. Popp, S. Meichsner, H. Kölsch, P. Lewczuk, W. Maier, J. Kornhuber, F. Jessen, D. Lütjohann, Cerebral and extracerebral cholesterol metabolism and CSF markers of Alzheimer's disease, *Biochem. Pharmacol.* 86 (2013) 37–42.
- [21] P. Lewczuk, P. Riederer, S.E. O'Bryant, M.M. Verbeek, B. Dubois, P.J. Visser, K. A. Jellinger, S. Engelborghs, A. Ramirez, L. Parnetti, C.R. Jack Jr., C.E. Teunissen, H. Hampel, A. Lleo, F. Jessen, L. Glodzik, M.J. de Leon, A.M. Fagan, J. L. Molinuevo, W.J. Jansen, B. Winblad, L.M. Shaw, U. Andreasson, M. Otto, B. Mollenhauer, J. Wiltfang, M.R. Turner, I. Zerr, R. Handels, A.G. Thompson, G. Johansson, N. Ermann, J.Q. Trojanowski, I. Karaca, H. Wagner, P. Oeckl, L. van Waalwijk van Doorn, M. Bjerke, D. Kapogiannis, H.B. Kuiperij, L. Farotti, Y. Li, B. A. Gordon, S. Epelbaum, S.J.B. Vos, C.J.M. Klijn, W.E. Van Nostrand, C. Minguillon, M. Schmitz, C. Gallo, A. Lopez Mato, F. Thibaut, S. Lista, D. Alcolea, H. Zetterberg, K. Blennow, J. Kornhuber, C.G.D.K.A.L.M.F.T. Members of the wfsbp task force working on this topic: peter Riederer, cerebrospinal fluid and blood biomarkers for neurodegenerative dementias: an update of the consensus of the task force on biological markers in psychiatry of the world federation of societies of biological psychiatry, *World J. Biol. Psychiatry* 19 (2018) 244–328.
- [22] R. Loera-Valencia, J. Goikolea, C. Parrado-Fernandez, P. Merino-Serrais, S. Maioli, Alterations in cholesterol metabolism as a risk factor for developing Alzheimer's disease: potential novel targets for treatment, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 190 (2019) 104–114.
- [23] C. Ullrich, M. Pirchl, C. Humpel, Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits, *Mol. Cell. Neurosci.* 45 (2010) 408–417.
- [24] J. Brown 3rd, C. Theisler, S. Silberman, D. Magnuson, N. Gottardi-Littell, J.M. Lee, D. Yager, J. Crowley, K. Sambamurti, M.M. Rahman, A.B. Reiss, C.B. Eckman, B. Wolozin, Differential expression of cholesterol hydroxylases in Alzheimer's disease, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 34674–34681.
- [25] S. Wahrle, P. Das, A.C. Nyborg, C. McLendon, M. Shoji, T. Kawarabayashi, L. H. Younkin, S.G. Younkin, T.E. Golde, Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains, *Neurobiol. Dis.* 9 (2002) 11–23.
- [26] S. Zhou, H. Zhou, P.J. Walian, B.K. Jap, Regulation of gamma-secretase activity in Alzheimer's disease, *Biochemistry* 46 (2007) 2553–2563.
- [27] J.C. Morris, The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules, *Neurology* 43 (1993) 2412–2414.
- [28] J. Mathys, M. Gholamrezae, H. Henry, A. von Gunten, J. Popp, Decreasing body mass index is associated with cerebrospinal fluid markers of Alzheimer's pathology in MCI and mild dementia, *Exp. Gerontol.* 100 (2017) 45–53.
- [29] A. World Medical, World medical association declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects, *JAMA* 310 (2013) 2191–2194.
- [30] J. Popp, A. Oikonomidi, D. Tautvydaite, L. Dayon, M. Bacher, E. Migliavacca, H. Henry, R. Kirkland, I. Severin, J. Wojcik, G.L. Bowman, Markers of neuroinflammation associated with Alzheimer's disease pathology in older adults, *Brain Behav. Immun.* 62 (2017) 203–211.
- [31] G.L. Bowman, L. Dayon, R. Kirkland, J. Wojcik, G. Peyratout, I.C. Severin, H. Henry, A. Oikonomidi, E. Migliavacca, M. Bacher, J. Popp, Blood-brain barrier breakdown, neuroinflammation, and cognitive decline in older adults, *Alzheimers Dement.* 14 (2018) 1640–1650.
- [32] H. Kölsch, D. Lütjohann, M. Ludwig, A. Schulte, U. Ptok, F. Jessen, K. von Bergmann, M.L. Rao, W. Maier, R. Heun, Polymorphism in the cholesterol 24S-hydroxylase gene is associated with Alzheimer's disease, *Mol. Psychiatry* 7 (2002) 899–902.
- [33] B. Sosic-Jurjevic, D. Lütjohann, K. Renko, B. Filipovic, N. Radulovic, V. Ajdzanovic, S. Trifunovic, N. Nestorovic, J. Zivanovic, M. Manojlovic Stojanoski, J. Khrle, V. Milosevic, The isoflavones genistein and daidzein increase hepatic concentration of thyroid hormones and affect cholesterol metabolism in middle-aged male rats, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 190 (2019) 1–10.
- [34] T.M. Hughes, C. Rosano, R.W. Evans, L.H. Kuller, Brain cholesterol metabolism, oxysterols, and dementia, *J. Alzheimers Dis.* 33 (2013) 891–911.
- [35] M.J. Curtis, R.A. Bond, D. Spina, A. Ahluwalia, S.P. Alexander, M.A. Giembycz, A. Gilchrist, D. Hoyer, P.A. Insel, A.A. Izzo, A.J. Lawrence, D.J. MacEwan, L. D. Moon, S. Wonnacott, A.H. Weston, J.C. McGrath, Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in *BJP, Br. J. Pharmacol.* 172 (2015) 3461–3471.
- [36] H. Fukumoto, A. Deng, M.C. Irizarry, M.L. Fitzgerald, G.W. Rebeck, Induction of the cholesterol transporter ABCA1 in central nervous system cells by liver X receptor agonists increases secreted Abeta levels, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 48508–48513.
- [37] S. Sharma, R.P.J. Prasanthi, E. Schommer, G. Feist, O. Ghribi, Hypercholesterolemia-induced Abeta accumulation in rabbit brain is associated with alteration in IGF-1 signaling, *Neurobiol. Dis.* 32 (2008) 426–432.
- [38] T. Sudhop, D. Lütjohann, A. Kodai, M. Igel, D.L. Tribble, S. Shah, I. Perevozskaya, K. von Bergmann, Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans, *Circulation* 106 (2002) 1943–1948.
- [39] D. Lütjohann, F. Stellaard, M.T. Mulder, E.J.G. Sijbrands, O. Weingartner, The emerging concept of "individualized cholesterol-lowering therapy": a change in paradigm, *Pharmacol. Ther.* 199 (2019) 111–116.
- [40] I. Björkhem, K. Patra, A.L. Boxer, P. Svenningsson, 24S-hydroxycholesterol correlates with tau and is increased in cerebrospinal fluid in Parkinson's disease and corticobasal syndrome, *Front. Neurol.* 9 (2018) 756.
- [41] A. Cramer, E. Biondi, K. Kuehnle, D. Lütjohann, K.M. Thelen, S. Perga, C.G. Dotti, R.M. Nitsch, M.D. Ledesma, M.H. Mohajeri, The role of seladin-1/DHCR24 in cholesterol biosynthesis, APP processing and Abeta generation in vivo, *EMBO J.* 25 (2006) 432–443.
- [42] T. Vanmierlo, J. Popp, H. Kölsch, S. Friedrichs, F. Jessen, B. Stoffel-Wagner, T. Bertsch, T. Hartmann, W. Maier, K. von Bergmann, H. Steinbusch, M. Mulder, D. Lütjohann, The plant sterol brassicasterol as additional CSF biomarker in Alzheimer's disease, *Acta Psychiatr. Scand.* 124 (2011) 184–192.
- [43] T. Heinemann, G. Axtmann, K. von Bergmann, Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man, *Eur. J. Clin. Invest.* 23 (1993) 827–831.

3. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Gunther Hartmann, der mir ermöglicht hat, am Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie zu promovieren.

Bedanken möchte ich mich vor allem bei meinem Doktorvater und Betreuer, Herrn Prof. Dr. Dr. rer. nat. Dieter Lütjohann, für all die Stunden in denen er mir geduldig zur Seite stand, mich beraten, unterstützt und Korrekturen vorgenommen hat.

Dieter, danke für deine Zeit, deine Geduld, deine Erklärungen, deine Zuverlässigkeit und Gewissenhaftigkeit mit der du mich unterstützt hast. Mich freut es sehr, den Schritt zur Promotion gemeinsam mit dir gegangen zu sein.

Außerdem gilt mein Dank meinem Zweitbetreuer Prof. Dr. med Julius Popp, der mir für das Paper die klinischen und biochemischen Daten bereitgestellt hat. Mit seinem Wissen bezüglich der klinischen Aspekte und der untersuchten Kohorte sowie durch seine Korrekturen und Anmerkungen hat er maßgeblich dazu beigetragen, die Arbeit abzurunden. Danke, Julius.

Darüber hinaus gilt mein Dank Frau Anja Kersiek und Silvia Friedrichs für ihre Arbeit bei der recht komplexen gaschromatographischen-massenspektrometischen Analytik, sowie Christopher Clark, der mir bei der statistischen Auswertung der Daten mit Rat und Tat zur Seite stand. Außerdem bedanke ich mich bei meinen Schwestern und Freunden für die Korrektur der Arbeit.

Zu guter Letzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinem Freund, der hinter mir steht und mir jeglichen Freiraum für meine Träume gibt sowie bei meinen Eltern, die mir die Freiheit und das Vertrauen auf dem langen Weg bis zum Medizinstudium und darüber hinaus geschenkt haben und mich in jeglicher Art unterstützen.