

**Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Holger Höhn**

**Die altersabhängige Makuladegeneration
Untersuchung zur genetischen Assoziation des Apolipoproteins E
und des Alpha-2-Makroglobulins**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Susanne Ziegler
aus Regensburg**

Würzburg, Oktober 2004

Referenten

Referent: Prof. Dr. Bernhard Weber

Koreferent: Prof. Dr. Franz Grehn

Dekan: Prof. Dr. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 2. November 2005

Die Promovendin ist Ärztin

MEINEN ELTERN

1. Einleitung		1
1.1	Die altersabhängige Makuladegeneration	2
1.1.1	Allgemeines	2
1.1.2	Morphologie und Klassifikation	3
1.1.3	Pathogenese	4
1.1.4	Ätiologie	7
1.1.5	Klinik und Diagnose	8
1.1.6	Therapeutische Maßnahmen	10
1.2	Die genetische Entschlüsselung komplexer Krankheiten	11
1.3	Problemstellung und Ziel der Arbeit	13
1.3.1	AMD – eine komplexe Krankheit und der schwierige Weg zur Erforschung ihrer genetischen Komponenten	13
1.3.2	Apolipoprotein E	16
1.3.3	Alpha-2-Makroglobulin	17
1.3.4	Ziel der Arbeit	19
2	Material und Methoden	22
2.1	AMD-Patienten	22
2.2	Kontrollgruppen	22
2.3	DNA-Isolierung aus EDTA-Blut	24
2.4	Amplifizierung von Genbereichen	25
2.5	Primer	27
2.6	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	28
2.7	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	29
2.7.1	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	30
2.7.2	Überprüfung von PCR-Produkten durch Agarose-Gelelektrophorese	31
2.7.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
2.8	Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)	33
2.9	Denaturierungs-Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)	34
2.9	DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode	37
2.10	Statistische Auswertung	39
2.11	Puffer und Lösungen	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Analyse der Apolipoprotein E Allelhäufigkeiten	47
3.1.1	PCR -Amplifikation des APOE Exons 4	47
3.1.2	DGGE	50
3.1.3	SSCP	55
3.1.4	Enzymatische Restriktionsspaltung	55
3.1.5	Auftrennung der verdauten PCR-Produkte	57
3.1.6	Bestimmung der unterschiedlichen Genotypen	59
3.1.7	Auswertung der Allelhäufigkeiten	60
3.2	Analyse der Alpha-2-Makroglobulin Allelhäufigkeiten	67
3.2.1	PCR-Amplifikation des A2M Polymorphismus	67
3.2.2	Auftrennung der PCR-Produkte auf Polyacrylamidgelen	69

3.2.3	Bestimmung der unterschiedlichen Genotypen	70
3.2.4	Auswertung der Allelfrequenzen	71
4	Diskussion	75
4.1	Studiendesign	75
4.1.1	Komplexität der AMD – Hinweise auf eine genetische Ursache	75
4.1.2	Genetische Analyse der AMD	76
4.1.3	AMD und Alzheimer- gemeinsame Phänomene?	78
4.2	Methodenauswahl	81
4.2.1	Bestimmung des ApoE-Allelstatus	81
4.2.2	Bestimmung des A2M-Allelstatus	81
4.3	Bewertung der Ergebnisse ⁸²	
4.3.1	Assoziation der untersuchten ApoE-Allele mit der AMD	83
4.3.2	Signifikante Unterschiede des ApoE-4-Allels in verschiedenen Altersgruppen	84
4.3.3	Studienvergleich	85
4.3.3.1	Vergleich mit der Klaver-Studie	86
4.3.3.2	Vergleich mit der Souied-Studie	87
4.3.3.3	Vergleich mit der Pang-Studie	88
4.3.3.4	Vergleich mit der Schmidt-Studie	88
4.3.3.5	Vergleich mit der Simonelli-Studie	90
4.3.3.6	Vergleich mit der Schultz-Studie	91
4.3.3.7	Vergleich mit der Baird-Studie	91
4.3.3.8	Vergleich mit der Zarepars-Studie	93
4.3.3.9	Übersicht Studienvergleich	94
4.3.3.10	Interpretation	96
4.3.4	Assoziation des A2M-1 und A2M-2 mit der AMD	98
4.4	Ausblick	99
4.4.1	Erforschung der AMD als komplexe Krankheit	99
4.4.2	Mögliche Rolle von Umweltfaktoren	99
4.4.3	Möglichkeiten der funktionellen Genetik im Hinblick auf die Erforschung der AMD-Pathogenese	100
5	Zusammenfassung	102
5.1	Ziel	102
5.2	Voraussetzung	102
5.3	Methoden	103
5.4	Ergebnisse	103
5.5	Interpretation	104
6	Literaturverzeichnis	106

1. Einleitung

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist eine degenerative Netzhauterkrankung. Sie beginnt nicht vor dem 50. Lebensjahr. Von den über 75-Jährigen leiden aber ca. 35% unter diesem schleichenden Verlust ihrer Sehschärfe (Schick et al., 2001). Europaweit sind somit mehr als 12 Millionen Menschen betroffen. Die Ätiologie der AMD ist bis heute unklar. Unsere Vorstellungen altersassoziierter Erkrankungen haben sich in den letzten Jahren erheblich verändert. Wie Francois et al. 1977 aufzeigen, wird in diversen Publikationen, bereits aus den dreißiger Jahren des vorigen Jahrhunderts, eine mögliche genetische Ursache der AMD diskutiert. Heute findet dieser Ansatz wieder verstärkt Beachtung. Noch in den achtziger Jahren brachten epidemiologische Studien in erster Linie Umweltfaktoren, Einflüsse der Lebensweise sowie andere Erkrankungen mit der AMD ursächlich in Verbindung. Heute geht man davon aus, dass die AMD eine multifaktorielle Erkrankung mit mehreren prädisponierenden genetischen Risikokonstellationen und erkrankungspromovierenden Umweltfaktoren darstellt.

Die Rolle der Gene für komplexe, altersassoziierte Erkrankungen findet zunehmend Beachtung. Durch die Entwicklung neuer Methoden lassen sich genetische Loci definieren, die mögliche Risikofaktoren einer komplexen Erkrankung darstellen. Die Untersuchung der genetischen Grundlagen multifaktorieller Krankheiten wie der AMD steht noch am Anfang.

Neben einer Einführung in die Komplexität der AMD geben die folgenden Kapitel der Einleitung einen Überblick über die Schwierigkeiten, bisherigen Erfolge und unterschiedlichen Ansätze der Entschlüsselung komplexer Krankheiten einschließlich der AMD.

1.1 Die altersabhängige Makuladegeneration

1.1.1 Allgemeines

Bereits 1855 beschrieb der niederländische Augenarzt Frans Donders eine im höheren Alter auftretende Augenerkrankung, die heute als altersabhängige Makuladegeneration (AMD) bekannt ist (Krott et al., 1996). Die AMD ist die häufigste Form der Netzhautdystrophien. Sie ist durch degenerative Veränderungen der Makula gekennzeichnet, die in vielen Fällen zu einem Verlust des Farbsinns und der zentralen Sehschärfe führen. Einen Eindruck der degenerativen Veränderung bei der AMD an der Makula geben die Fundusaufnahmen in Abbildung 1.

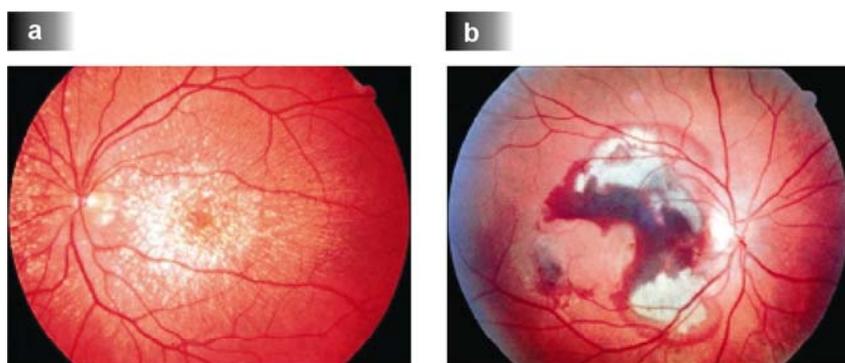


Abbildung 1

Augenhintergrund bei verschiedenen AMD-Formen.

a, morphologisches Bild einer trockenen (atrophischen) Form der AMD, man sieht zahlreiche helle Drusen in der Makula und Umgebung.

b, Beispiel des Augenhintergrundes bei feuchter AMD, deutlich erkennbar sind die seröse Retinaabhebung und die hämorrhagischen Areale.

Die AMD ist im höheren Alter eine der häufigsten Ursachen für einen partiellen Sehverlust. Der Ausfall des zentralen Gesichtsfeldes kann bis hin zur Blindheit führen. Die demographischen Veränderungen innerhalb unserer Gesellschaft bedeuten einen Anstieg der Inzidenz und Prävalenz altersabhängiger, degenerativer Erkrankungen. Mit Veränderung der Alterspyramide in den Industrienationen nimmt somit auch die Prävalenz der AMD zu. Zahlreiche Populationsstudien belegen, dass die Prävalenz der AMD ab dem 50. Lebensjahr zunimmt.

Repräsentative Zahlen nennt beispielsweise die in den USA durchgeführte Beaver Dam Eye Study (Schwartz et al., 1994). In der Gruppe der 65- bis 74-Jährigen tritt die frühe AMD mit einer Frequenz von 18,0% auf, die Spätformen der AMD mit einer Frequenz von 1,4%. Bei der Gruppe der über 75-Jährigen lagen die entsprechenden Zahlen bei 29,7% und 7,1%. Beim Vergleich der beiden Geschlechter war die Häufigkeit für die frühe Form der AMD sehr ähnlich, allerdings trat die späte Form der AMD bei den über 75-Jährigen häufiger bei Frauen (7,8%) als bei Männern (5,6%) auf (Evans et al., 1996).

Noch immer sind trotz intensiver, weltweiter Forschung die tatsächlichen Ursachen und die genaue Pathogenese der AMD unbekannt. Angesichts der begrenzten Therapiemöglichkeiten stellt die AMD in unserer Gesellschaft ein wachsendes sozioökonomisches Problem dar. AMD-Patienten verlieren nicht nur ihre Sehkraft, sondern damit auch ihre Unabhängigkeit im alltäglichen Leben. Soziale Beziehungen werden erschwert, ein Zurechtfinden im öffentlichen Leben ist nur noch mit einer Begleitperson möglich.

1.1.2 Morphologie und Klassifikation

Das morphologische Erscheinungsbild einer AMD ist vielfältig und wird in eine frühe Form der AMD und eine späte Form eingeteilt. Degenerative Veränderungen im Bereich der Makula sind ein zunehmend häufiger Befund ab dem 50. Lebensjahr. Doch nicht jede altersbedingte, degenerative Erscheinung der Makula darf mit einer beginnenden AMD gleichgesetzt werden.

Die Klassifikation nach Bird teilt die AMD nach ihrem klinischen Erscheinungsbild in eine frühe AMD und eine fortgeschrittene Form ein (Bird et. al., 1995). Charakteristische ophthalmologische Läsionen einer frühen AMD sind weißlich-gelbliche Punkte, so genannte Drusen, und Bereiche verstärkter Pigmentation oder Atrophie des retinalen Pigmentepithels (RPE). Dies sind die Anfangsstadien einer AMD. Isoliert auftretende, harte Drusen dagegen gelten als altersabhängige Degenerationserscheinungen ohne pathologischen Wert.

Die Bird-Klassifikation bezeichnet die frühe Form als altersabhängige Makulopathie (age-related maculopathy, ARM). Den Begriff der altersabhängigen Makuladegeneration (age-related macular degeneration, AMD) reservieren Bird et

al. für fortgeschrittenere Stadien, die bereits eine Minderung der Sehstärke bedingen.

1.1.3 Pathogenese

Im normalen Auge werden täglich die Außensegmente der Photorezeptoren, in denen sich die photosensitiven Sehpigmente befinden, erneuert. Photorezeptoraußensegmente werden vom retinalen Pigmentepithel (RPE) phagozytiert, in Lysosomen verdaut, und durch die Kapillaren der Choroidea gereinigt. Das RPE wird von der Choriokapillaris durch eine fünfschichtige Basalmembran getrennt, die so genannte Bruchsche Membran. Es ist bekannt, dass sich die Bruchsche Membran im Laufe des Alters verdickt und es in frühen Stadien der ARM zu einer Akkumulation von lipidreichen Zellablagerungen kommt. Diese Ablagerungen bedingen eine progrediente RPE-Insuffizienz und tragen zur Entstehung von Drusen, einem der charakteristischen klinischen Zeichen einer frühen ARM, bei (Pauleikhoff, 1994).

Bei der Frühmanifestation der AMD unterscheidet man zwischen den fokalen, harten oder weichen Drusen im Gegensatz zu den flächigen, diffusen Drusen. Harte Drusen haben einen Durchmesser von weniger als 50 µm, weiche Drusen sind größer und unschärfer begrenzt. Diese fokalen Drusen unterliegen spontanen Veränderungen. Harte Drusen können mit der Zeit zu weichen Drusen konfluieren oder aber auch kalzifizieren (Holz, 2003).

Histologisch unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Formen von Ablagerungen. Basal laminare Ablagerungen setzen sich aus granulärem Material zusammen, das von weitmaschigem Kollagen durchsetzt ist. Dieses Material ist zwischen der Plasmamembran und der Basalmembran des RPE lokalisiert. Dagegen entstehen die basal linearen Ablagerungen in der inneren Kollagenschicht der Bruch'schen Membran und bestehen aus Vesikeln mit oder ohne Hülle sowie aus Membranbruchstücken (Green, 1999).

Physiologisch bedingen die Ablagerungen nur eine reduzierte Funktion der Retina. Nach diesem Anfangsstadium nimmt die frühe ARM unterschiedliche Ver-

laufsformen an, wobei unabhängig von der Art der primären Ablagerungen alle Formen einer AMD entstehen können (Green, 1999).

RPE-Veränderungen äußern sich als Depigmentation, Hypertrophie, Hyperplasie und Atrophie und werden häufig unter dem Begriff „Pigment-Modellierung“ zusammengefasst. Weiterhin kann es zur Entstehung so genannter weicher Drusen, einer choroidalen Neovaskularisation und zur Vernarbung kommen. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die unterschiedlichen morphologischen Erscheinungsformen einer AMD, ihre Abgrenzungen und Wechselbeziehungen untereinander. Wie aus dem Diagramm ersichtlich wird, sind die Übergänge der unterschiedlichen Formen der AMD fließend.

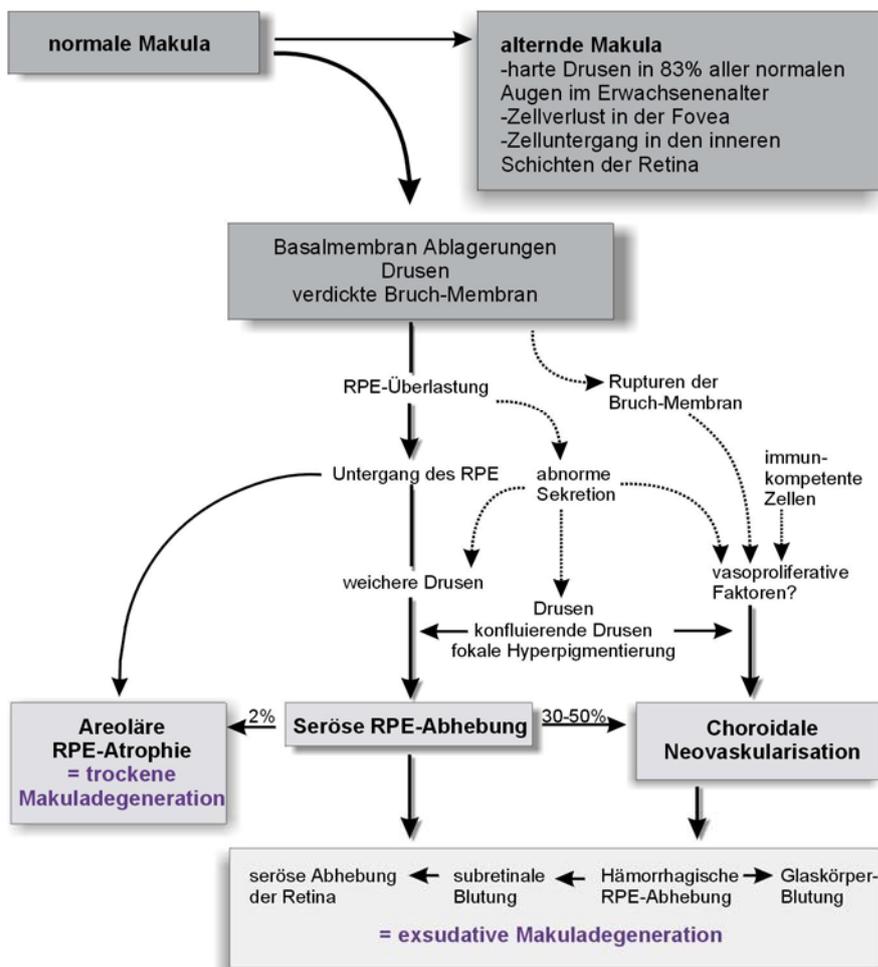


Abbildung 2

Physiologische Veränderungen der alternden Makula und unterschiedliche Verlaufsformen der altersabhängigen Makuladegeneration . Unabhängig von den jeweiligen Vorstufen kann sich sowohl das klinische Bild einer trockenen als auch einer exsudativen AMD entwickeln.

Die häufig zur morphologischen Einteilung gebrauchten Begriffe trockene (syn. atrophische) AMD und feuchte (syn. seröse, exsudative, neovaskuläre) AMD bezeichnen die beiden häufigsten irreversiblen Endstadien einer AMD, zum einen die Atrophie des RPE und zum anderen die choroidale Gefäßneubildung (choroidale Neovaskularisation,CNV) mit eventueller Vernarbung. Die CNV kann einen serösen oder hämorrhagischen Verlauf nehmen (Green, 1999). Abbildungen 3 und 4 geben einen schematischen Einblick in die degenerativen RPE-Veränderungen.

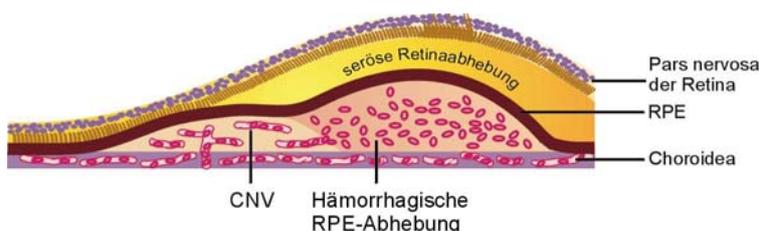


Abbildung 3

Choroidale Neovaskularisation (CNV) im Querschnitt durch Retina, RPE und Choroidea mit schematischer Darstellung von seröser Abhebung der Retina und hämorrhagischer Abhebung des RPE bei Blutung bzw. Leckage aus den porösen Gefäßwänden der Neovaskularisation.



Abbildung 4

Schema der RPE-Atrophie. Querschnitt durch Retina, RPE und Choroidea. Funduskopisch erkennt man in den atrophischen RPE-Arealen teilweise durchscheinende Choroideagefäße.

1.1.4 Ätiologie

Die der AMD zugrunde liegenden Ursachen sind noch unbekannt. Der stärkste Risikofaktor ist sicherlich das Alter. In jungen Jahren tritt eine AMD nicht auf. Als einzig gesicherter, exogener Risikofaktor gilt das Zigarettenrauchen. Epidemiologische Studien ergaben eine positive Korrelation zwischen dem Konsum von Zigaretten und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer AMD (Chan et al., 1998; Delcourt et al., 1998). Der Pathomechanismus ist noch unklar. Plausibel erscheint eine durch das Rauchen bedingte Reduktion von Serum-Antioxidantien, die die Makula vor Sauerstoff-Radikalen schützen. Herz-Kreislauferkrankungen mit Hypertonie, Mangelernährung und UV-Belastung werden zwar als Risikofaktoren diskutiert, eindeutige Zusammenhänge konnten jedoch noch nicht gezeigt werden (Holz, 2003). Auch die Rolle genetischer Dis-

positionen, also endogene Risikofaktoren für die AMD ist bisher nicht geklärt. Gerade die Erforschung genetischer Ursachen würde aber zum Verständnis der pathogenetischen Mechanismen beitragen und somit neue Möglichkeiten zur Entwicklung gezielter Therapieansätze bieten.

1.1.5 Klinik und Diagnose

Unabhängig von den unterschiedlichen Verlaufsformen der AMD führen diese degenerativen Veränderungen mit der Zeit zu einer Minderung der zentralen Sehkraft. AMD-Patienten suchen den Arzt auf, weil sie Dinge verschwommen oder verzerrt sehen, ein Symptom, das man als „Metamorphopsien“ bezeichnet. Die Minderung der Sehstärke kann sich sowohl langsam über einen längeren Zeitraum entwickeln als auch sehr plötzlich eintreten. Bereits in der Anamnese geben ein höheres Lebensalter und die Angabe von Metamorphopsien einen deutlichen Hinweis auf das Vorliegen einer AMD. Erhärtet wird der Verdacht durch eine anschließende Prüfung der Sehschärfe, die bei AMD Patienten stark herabgesetzt sein kann ($\text{Visus} < 0,1$). Auch ein positives Ergebnis beim Test mit dem Amsler-Quadrat (Abbildung 5) deutet auf eine AMD hin.

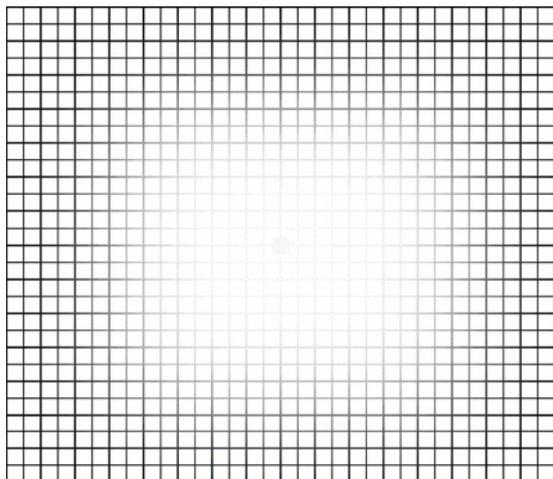


Abbildung 5

Optischer Eindruck eines AMD-Patienten bei Betrachtung des Amsler-Testquadrats. Das zentrale Gesichtsfeld erscheint dem Patienten durch den Ausfall von Photorezeptoren in der Makula verschwommen und unscharf. Liegt eine CNV mit Abhebung des RPE vor, sieht der Patient die Linien verzerrt.

Frühe Stadien einer AMD, also beginnende RPE-Ablagerungen, sind am Augenfundus nicht sichtbar. Erst weitere morphologische Veränderungen ermöglichen eine Diagnose in der Ophthalmoskopie.

Der direkten Diagnose dienen die Ophthalmoskopie, die Fluoreszenzangiographie und die Indozyanin-Grün-Angiographie. Bei der Ophthalmoskopie erkennt man am Augenhintergrund bei der trockenen Form der AMD das atrophierte retinale Pigmentepithel im Bereich der Makula. Die feuchte Form imponiert als seröse Abhebung von Netzhaut und Pigmentepithel. Im fortgeschrittenen Stadium erkennt man subretinale Neovaskularisationen und eventuell eine zentrale Narbe, Junius-Kuhnt genannt. Mittels der Fluoreszenzangiographie lassen sich durch Darstellung der Gefäße am Augenhintergrund Defizite des retinalen Pigmentepithels sowie eine mögliche subretinale Neovaskularisation diagnostizieren (Pauleikhoff et al., 1999). Dies ist besonders im Hinblick auf die Therapiemöglichkeiten von Bedeutung. Die Indozyanin-Grün-Angiographie ermöglicht durch den besonderen Farbstoff eine selektive Darstel-

lung der Choroideagefäße. Dadurch kann man bereits sehr früh eine beginnende Neovaskularisation diagnostizieren und diese entsprechend frühzeitig und mit höheren Erfolgschancen therapieren.

Die Klassifikation und Einteilung der AMD wurde durch die vielfältigen Erscheinungsformen mit unterschiedlicher Lokalisation, variierender Größe und Läsionstypen erschwert. Über die Jahre hinweg hat sich eine Vielzahl von Definitionen in epidemiologischen Studien ergeben, die einen Vergleich der Studienergebnisse schwierig macht. In der Hoffnung eine einheitliche Klassifikation zu erreichen, hat die Studiengruppe des Londoner Retinaspezialisten Alan Bird (The International Age-related Maculopathy Epidemiological Study Group) ein System zur Einteilung der AMD anhand detaillierter Beurteilungskriterien von Farbaufnahmen des Augenfundus vorgeschlagen (Bird et al., 1995), das sich inzwischen international etabliert hat.

1.1.6 Therapeutische Maßnahmen

Eine ursächliche Therapie der AMD gibt es bis heute nicht. Die derzeit einzig wirksamen Therapien sind die Laserphotokoagulation (Macular Photocoagulation Study Group, 1991), die Photodynamische Therapie (Schmidt-Erfurth et al., 1999) und die in den USA in großangelegten Studien durchgeführte Supplementierung von Mikronährstoffen (AREDS report no. 9, 2001).

Gegen die trockene Form einer AMD gibt es bis heute keine Therapie. Hier kann man den Patienten nur stark vergrößernde Sehhilfen zur Verfügung stellen. Die Laserphotokoagulation wird nur in Fällen feuchter AMD mit meist nur vorübergehendem Erfolg angewendet. Eine Indikation zur Laserung besteht nur bei einer gut abgrenzbaren, subretinalen Neovaskularisation, die nicht innerhalb der Fovea liegt, was allerdings nur in 5-10% aller Fälle von feuchter AMD gegeben ist (Macular Photocoagulation Study Group, 1991). Meist kann die Ausschaltung einer solchen Läsion mit dem Laser ein Rezidiv nicht verhindern.

Eine weitere Therapiemöglichkeit stellt die Photodynamische Therapie dar, die bei subretinalen Membranen die Progredienz der AMD vermindern kann (Schmidt-Erfurth et al., 1999).

Chirurgische Interventionen umfassen die Extraktion subretinaler Membranen mittels Vitrektomie, die Translokation der Makula über intaktes RPE sowie die autologe Verlagerung von peripherem RPE oder Irispigmentepithel. All diese chirurgischen Methoden sind zwar vielversprechend, bisher konnte aber die Rezidivrate durch die operative Therapie nicht gesenkt werden (Kirchhof, 2003). Bei der Supplementierung von Mikronährstoffen führt man antioxidativ wirkende Vitamine, Carotinoide und Spurenelemente zu, die bei rechtzeitigem Beginn einer AMD vorbeugen und, bei bereits eingetretener Erkrankung, die Progression des Krankheitsverlaufs verlangsamen oder gar bremsen können. Unter den Carotinoiden erwiesen sich vor allem Lutein und Zeaxanthin als besonders effektiv. Lutein und Zeaxanthin sind natürliche Bestandteile der Makula und werden deshalb auch als „makuläre Pigmente“ bezeichnet. Sie finden sich vor allem im Bereich der Fovea in hoher Konzentration (Landrum et al., 2001). Werden diese Carotinoide im höheren Alter nicht ausreichend mit der Nahrung zugeführt, sinkt die Konzentration und damit auch der Schutz vor oxidativen Stoffen, den „freien Radikalen“ in der Makula. Dies scheint das Entstehen bzw. das Fortschreiten einer AMD zu begünstigen. Durch die exogene Zufuhr von Vitaminen und Spurenelementen mit antioxidativer Wirkung, wie Vitamin C und E, β -Karotin und Zink, mit der Nahrung erreicht man eine Steigerung der Konzentration von antioxidativ wirkenden Stoffen in der Netzhaut. Bereits mehrere Studien belegen erste Erfolge dieses Therapieansatzes (AREDS report no. 9, 2001; Sackett et al., 2002).

1.2 Die genetische Entschlüsselung komplexer Krankheiten

Unter dem Begriff „komplexe Erkrankungen“ fasst man alle Phänotypen nicht monogener, mendelnder Krankheiten zusammen. Synonym werden auch die Begriffe „multifaktorielle“ oder „quantitative“ Erkrankung gebraucht. Ursachen einer komplexen Krankheit sind vielgestaltig, vermutlich ein Zusammenspiel exogener, also umweltbedingter Faktoren und endogener, genetischer Faktoren. Diese genetischen Faktoren entsprechen jedoch keinem definierten

Phänotyp. Der zugrunde liegende Genotyp kann entweder zufällig sein, oder aber durch Umweltfaktoren oder Wechselwirkungen mit anderen Genen zu verschiedenen Phänotypen führen. Denkbar ist auch, dass verschiedene Genotypen einen einzelnen Phänotyp bestimmen und diesen quantitativ beeinflussen. Die genetische Kartierung hat in den letzten Jahren viele Gene, die monogenische Erbkrankheiten hervorrufen, erfolgreich identifiziert und aufgrund ihrer Position kloniert. Bei der genetischen Kartierung vergleicht man das Erbmuster der Erkrankung mit dem Muster der Vererbung chromosomaler Regionen. Anhand polymorpher genetischer Sequenzen der menschlichen DNA lassen sich solche Kandidatenregionen weiter eingrenzen und die krankheits-assoziierten Gene schließlich identifizieren (Lander et al., 1994).

Komplexe Erkrankungen entziehen sich größtenteils dieser Methode, da sich ein spezifisches Vererbungsmuster innerhalb eines Stammbaums nicht oder nur schwer erkennen lässt. Oft ist es nicht möglich, einen genetischen Marker zu finden, der mit der Krankheit vererbt wird (segregiert). Die Gründe hierfür können vielfältig sein und reichen von unvollständiger Penetranz über genetische Heterogenität bis hin zu polygenischer Vererbung. Dies alles erschwert die Suche nach einem Anhaltspunkt für eine genetische Beteiligung an einer komplexen Krankheit.

Um diese Schwierigkeiten zu bewältigen ist es sinnvoll, mögliche genetische Ursachen einzuengen. In der genetischen Epidemiologie versucht man deshalb, zuerst die Inzidenz und das Muster, mit denen die Krankheit innerhalb einer Familie oder Population auftritt, zu ermitteln. Strategien für eine solche Eingrenzung sind: Zwillingsstudien, die Bestimmung des relativen Risikos mit Geschwisterstudien und die Durchführung von Familien-Segregations-Analysen. Die Krankheit selbst sollte anhand ihres klinischen Erscheinungsbildes, des Alters bei Auftreten der Erkrankung, der Familiengeschichte und des Schweregrads exakt beschrieben werden.

Hat man eine komplexe Erkrankung mittels der genannten Strategien definiert, gibt es im Prinzip vier verschiedene Ansätze zur genetischen Entschlüsselung der krankheitsverursachenden Komponenten: Kopplungsanalysen, Allel-Sharing-Analysen innerhalb von Familien, Assoziationsstudien und Kreuzungs-

experimente im Tiermodell. All diese Ansätze haben sowohl Vor- als auch Nachteile und nicht alle eignen sich für die Erforschung einer bestimmten komplexen Erkrankung. Wegen des hohen Manifestationsalters ist es beispielsweise bei der AMD schwierig, eine Familie mit ausreichend vielen Betroffenen für die Durchführung einer Kopplungsanalyse zu finden. Dies ist sicherlich ein Grund, warum es nur wenige Familienstudien über die genetischen Ursachen der AMD gibt.

1.3 Problemstellung und Ziel der Arbeit

Angesichts der zunehmenden Prävalenz und Inzidenz der AMD wird diese Erkrankung immer mehr Gegenstand intensiver, weltweiter Forschung. Eine Aufklärung der Pathogenese würde neue Ansatzpunkte für eine effektive Therapie bieten.

1.3.1 AMD – eine komplexe Krankheit und der schwierige Weg zur Erforschung ihrer genetischen Komponenten

Wie bereits erwähnt handelt es sich bei der AMD um eine ätiologisch komplexe Augenerkrankung, wobei bisher erst wenige exogene Faktoren als gesichert gelten. Familien- und Geschwisterstudien haben bewiesen, dass es eine deutliche genetische Disposition für die AMD gibt (Seddon et al., 1997; Yates et al., 2000), die vermutlich in Abhängigkeit von exogenen Faktoren die Entstehung der Erkrankung begünstigt.

Einen Ansatzpunkt für die Erforschung dieser genetischen Disposition bieten die bekannten Gene hereditärer Retinadystrophien wie Morbus Best, Morbus Stargardt, die Sorsby Fundusdystrophie und die Doyme Honeycombsche Retinadystrophie. Sie alle besitzen phänotypische Ähnlichkeit mit dem klinischen Bild der AMD. Die zugrunde liegenden Krankheitsgene gelten daher auch als mögliche Kandidatengene für die AMD. Bisher wurden 156 Gene mit Netzhautdystrophien assoziiert, 110 Gene davon kloniert (Stand vom 8.10.2004). Eine Übersicht bietet hier das Online-Portal RetNet der Universität Houston,

Texas (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>). Es existieren erste Studien, die eine Assoziation dieser Kandidatengene mit der AMD untersuchen. Beispielsweise wurde das ABCR-Gen, das in mutierter Form für den Morbus Stargardt verantwortlich ist, bereits in mehreren Studien bei AMD-Patienten auf Mutationen hin analysiert. ABCR codiert für das Rim Protein (RmP), ein Protein des Außensegments der Zapfen (photoreceptor-specific ATP-binding cassette protein, ABCR). Allikments et al. (1997) fanden eine erhöhte Prävalenz verschiedener Varianten des ABCR-Gens unter AMD-Patienten. Nachfolgende Studien zu einer möglichen Assoziation von ABCR-Varianten mit AMD ergaben sowohl positive (Lewis et al., 1999; Shroyer et al., 1999) als auch negative Ergebnisse (Stone et al., 1998; Kuroiwa et al., 1999; De La Paz et al., 1999; Rivera et al., 2000).

Die Hoffnung, durch die Aufklärung der pathogenetischen Zusammenhänge dieser Erkrankungen einen Einblick in die Entstehung der komplexen AMD zu gewinnen, ist ein langer und zeitaufwendiger Weg. Die Funktion dieser Krankheitsgene ist oft noch unklar und eine mögliche Assoziation mit der AMD wurde bisher nur im Falle des ABCR-Gens gefunden.

Deshalb gibt es neue Ansätze zur Erforschung der multifaktoriellen AMD. Ausgehend von anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, versucht man Parallelen zur Entstehung der AMD zu finden. Wie die AMD ist die Alzheimer Erkrankung eine von vielen, weitgehend unbekanntem Faktoren verursachte Krankheit. Auch bei Morbus Alzheimer bilden Ablagerungen aus Zellresten den Ausgangspunkt der Pathogenese. Diese Ablagerungen bestehen überwiegend aus β -Amyloid. Neueste Studien belegen, dass β -Amyloid auch ein Bestandteil von Drusen bei AMD-Patienten ist. In der normalen Retina hingegen ist β -Amyloid nicht nachweisbar. Auch in harten Drusen, die zu den physiologischen Ablagerungen des RPEs im Alter zählen, findet man β -Amyloid nicht (Johnson et al., 2002; Dentchev et al., 2003).

Eine Studie aus dem Jahr 1998 von Klaver et al. untersuchte das Gen für das Apolipoprotein E hinsichtlich einer möglichen Assoziation mit der AMD. Apolipoprotein E (ApoE) spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese einiger neurodegenerativer Erkrankungen. Das Allel ApoE- ϵ 4 des Apolipoprotein E-Gens

(APOE) ist ein erheblicher Risikofaktor für die Alzheimer Erkrankung (Corder et al., 1993; Strittmatter et al., 1993; Saunders et al., 1993). Klaver et al. (1998) stellten deshalb die Hypothese auf, dass ApoE aufgrund seiner vielfältigen Funktionen im neuronalen Gewebe auch mit der AMD assoziiert sein könnte. In ihrer Studie ermittelten sie die ApoE-Genotypen von 88 AMD-Patienten und 901 Kontrollpersonen und stellten einen signifikanten Unterschied in der Allelhäufigkeit des ApoE- ϵ 4 fest. Den Ergebnissen von Klaver et al. sowie einer weiteren Studie von Souied et al. (1998) zufolge besitzt ApoE- ϵ 4 einen protektiven Effekt bezüglich der AMD. Träger des ApoE- ϵ 2 Allels hingegen scheinen ein erhöhtes Risiko für AMD zu haben, wobei diese Daten aber keine Signifikanz erreichen. Inzwischen sind diverse Folgestudien publiziert, die kontroverse Ergebnisse brachten. Zum einen konnte durch Studien die Assoziation des ApoE- ϵ 4 Allels mit der AMD im Sinne eines protektiven Faktors bestätigt werden (Schmidt et al., 2000; Simonelli et al., 2001; Baird et al., 2004; Zarepari et al., 2004), andere Studien hingegen widerlegen bei gleichem Studiendesign eine Assoziation des ApoE- ϵ 4 mit der AMD (Pang et al., 2000; Schultz et al., 2003).

Das Studiendesign der vorliegenden Assoziationsstudie wurde 1999 konzipiert. Ausgehend von den Studien von Klaver et al. (1998) und Souied et al. (1998), die beide eine Assoziation von ApoE- ϵ 4 mit der AMD nachweisen, sollte der ApoE-Polymorphismus an einem neuen und weitaus größeren Patientenkollektiv überprüft werden.

In Anlehnung an die Klaver-Studie wurde weiterhin der Ansatz aufgegriffen, von einer neurodegenerativen Erkrankung wie der Alzheimer Erkrankung ausgehend Parallelen zur AMD zu finden. Möglicherweise sind mit der Alzheimer Erkrankung assoziierte genetische Polymorphismen ebenfalls mit der AMD assoziiert. Hierfür wurden mittels Literaturstudium alle bisher im Zusammenhang mit der Alzheimer Erkrankung untersuchten Proteine bzw. deren häufige Polymorphismen zusammengefasst, insgesamt 7 Proteine. Proteine mit häufig vorkommenden Polymorphismen wie bei ApoE wurden in die engere Auswahl aufgenommen. Erfolgversprechend erschien das Alpha-2-Makroglobulin, da einer der beiden häufigen Polymorphismen des Alpha-2-Makroglobulin-Gens bereits

in einer Studie ebenfalls mit der Alzheimer Erkrankung assoziiert wurde (Blacker et al., 1998).

Die folgenden Abschnitte bieten einen kurzen Überblick über die beiden in dieser Assoziationsstudie untersuchten Proteine.

1.3.2 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (ApoE) ist das vorherrschende Apolipoprotein des ZNS mit regulatorischer Funktion im Cholesterin- und Lipidtransport. ApoE scheint eine wichtige Rolle bei neurodegenerativen Prozessen zu spielen, da es mit einigen degenerativen Erkrankungen des ZNS, vor allem der Alzheimer Erkrankung, assoziiert ist. Es konnte in den krankheitsbedingten Läsionen mehrfach nachgewiesen werden (Klaver et al., 1998). Darüber hinaus wurde ApoE mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert (Eichner et al., 2002).

Das kodierende Gen APOE ist auf Chromosom 19q13.2 lokalisiert, setzt sich aus 4 Exonen zusammen und umspannt eine Region von 3,6 Kb. APOE ist polymorph, es existiert in 3 häufigen Isoformen, den Allelen ApoE- ϵ 2, ApoE- ϵ 3 und ApoE- ϵ 4 (Abbildung 6). Dabei stellt ApoE- ϵ 3 das häufigste der 3 Allele dar. 75% der mitteleuropäischen Bevölkerung besitzen das ϵ 3-Allel, hingegen kommen ApoE- ϵ 2 und ApoE- ϵ 4 in einer Häufigkeit von nur 9% und 16% vor (Klaver et al., 1998). Das ϵ 3-Allel wurde deshalb in der Literatur bisher auch als das ursprüngliche oder Wildtyp-Allel bezeichnet, ApoE- ϵ 2 und ApoE- ϵ 4 dagegen als Varianten, die aufgrund von Punktmutationen entstanden sind (Mahley et al., 1988). Neuere Studien dieser viel untersuchten Isoformen ergaben jedoch, dass nicht das häufige ApoE- ϵ 3, sondern das ApoE- ϵ 4 am engsten mit dem APOE des Schimpansen verwandt ist (Fullerton et al., 2000). Fullerton et al. schlussfolgerten daraus, dass ApoE- ϵ 4 das ursprüngliche Gen ist und ApoE- ϵ 3 lediglich in den letzten 200 000 Jahren gegenüber ApoE- ϵ 4 an Frequenz zugenommen hat.

Bei diesen drei häufigen Isoformen des APOE handelt es sich um Einzelnukleotid-Polymorphismen innerhalb einer kodierenden Region, auch als SNP (single-nucleotide-polymorphisms) abgekürzt (Abbildung 6).

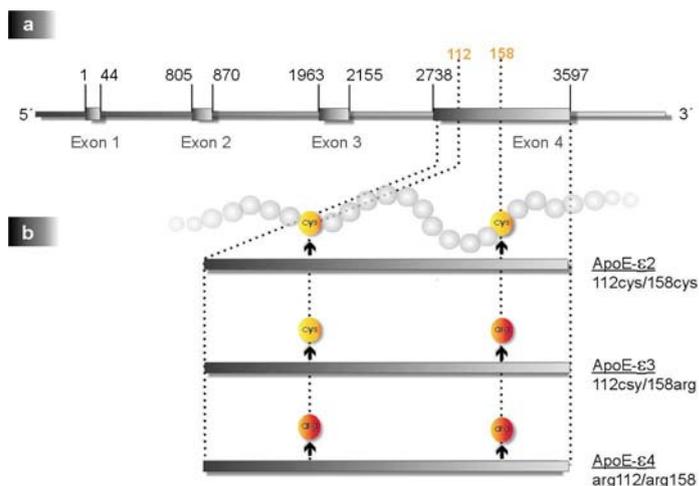


Abbildung 6

a, Exon-Intron-Struktur des APOE, die beiden untersuchten Polymorphismen liegen an Position 112 und 158 im Exon 4.

b, Die drei APOE-Allele definieren sich durch die beiden polymorphen Seiten im Exon 4, ApoE-ε2 ist als 112cys/158cys, ApoE-ε3 als 112cys/158arg und ApoE-ε4 als 112arg/158arg festgelegt. Durch Punktmutation T nach C erfolgt ein Aminosäure-Austausch (arg statt cys) im Apolipoprotein E.

Diesen APOE-Polymorphismen gilt ein großes Interesse im Rahmen der Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen. Das ApoE-ε4 Allel ist ein gesicherter Risikofaktor für die Alzheimer Erkrankung (Corder et al., 1993; Strittmatter et al., 1993; Saunders et al., 1993).

1.3.3 Alpha-2-Makroglobulin

Alpha-2-Makroglobulin (α_2 M) ist ein unspezifischer Proteinase-Hemmer des humanen Serums, der eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden besitzt, beispielsweise entzündungsvermittelnde Zytokine, den Tumor-Nekrose-Faktor-alpha, Interleukin I-beta und A-beta-Amyloid. Das Protein hat eine tetramere Struktur, die mehrere Bindungsdomänen und eine inhibitorische Domäne aufweist (Roche et al., 1988). Das zugrunde liegende Gen A2M ist auf Chromosom 12p13.3-p12.3 lokalisiert, umfasst 36 Exone und erstreckt sich über 48 kb

(Matthijs et al., 1992). Aufgrund seiner Fähigkeit A-beta-Amyloid, die Hauptkomponente der Beta-Amyloid-Ablagerungen bei der Alzheimer Erkrankung, zu binden und anschließend die Endozytose durch Neuronen zu vermitteln, wurde es mit Alzheimer in Verbindung gebracht. Der α_2 M -Rezeptor (LRP) bindet auch mit ApoE beladene Lipoproteine. Die Proteine scheinen in enger Beziehung zueinander zu stehen und tragen möglicherweise gemeinsam zu pathologischen Veränderungen bei. Diese Überlegung wurde auch in die vorliegende Arbeit integriert. Eine 1998 von Blacker et al. veröffentlichte Familienstudie belegte eine Assoziation eines häufigen Polymorphismus im A2M mit einem erhöhten Risiko einer Erkrankung an Alzheimer ((Blacker et al. , 1998)). Als Grundlage ihrer Untersuchungen zogen Blacker et al. die Gene aller bekannten Liganden des ApoE-bindenden LRP1-Rezeptors als potentielle krankheitsassoziierte Gene für Alzheimer in Betracht. Bei dem von ihnen untersuchten A2M-Polymorphismus handelt es sich um eine 5bp Insertion/Deletion am 5'-Spleißende des Exons 18 (-7 bis -3), die 1991 das erste Mal beschrieben wurde (Matthijs et al., 1991). Blacker et al. (1998) klassifizierten das Allel mit Deletion als A2M-2, das Allel ohne Deletion als A2M-1 (Abbildung 7). Obwohl es sich um einen Polymorphismus in einer nicht-kodierenden Region handelt, scheint die Deletion dennoch einen funktionalen Einfluss auf das Bindungsverhalten des Plasma- α_2 M zu haben: Das Plasma- α_2 M von Patienten, die homozygot für die Deletion sind, zeigt signifikante Änderungen im Bindungsverhalten u.a. für TGF-1-beta (Hope et al., 2003).

Obwohl bereits im Jahr 2000 drei verschiedene Populationsstudien die Assoziation von A2M mit Alzheimer widerlegten (Halimi et al., 2000; Gibson et al., 2000; Blennow et al., 2000), bleibt das Gen dennoch ein interessanter Kandidat für eine potentiell pathogenetische Rolle bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen. Aufgrund der zentralen Vermittlerrolle, die das α_2 M bei endozytotischen Vorgängen im ZNS spielt, könnte es auch an der pathogenetischen Ablagerung von Zellschutt beteiligt sein, die bei der AMD stattfindet. Deshalb wurden in dieser Studie an den Patienten- und Kontrollgruppen neben dem ApoE-Allelstatus auch die Häufigkeitsverteilung der beiden Allele A2M-1 und A2M-2 des A2M untersucht.

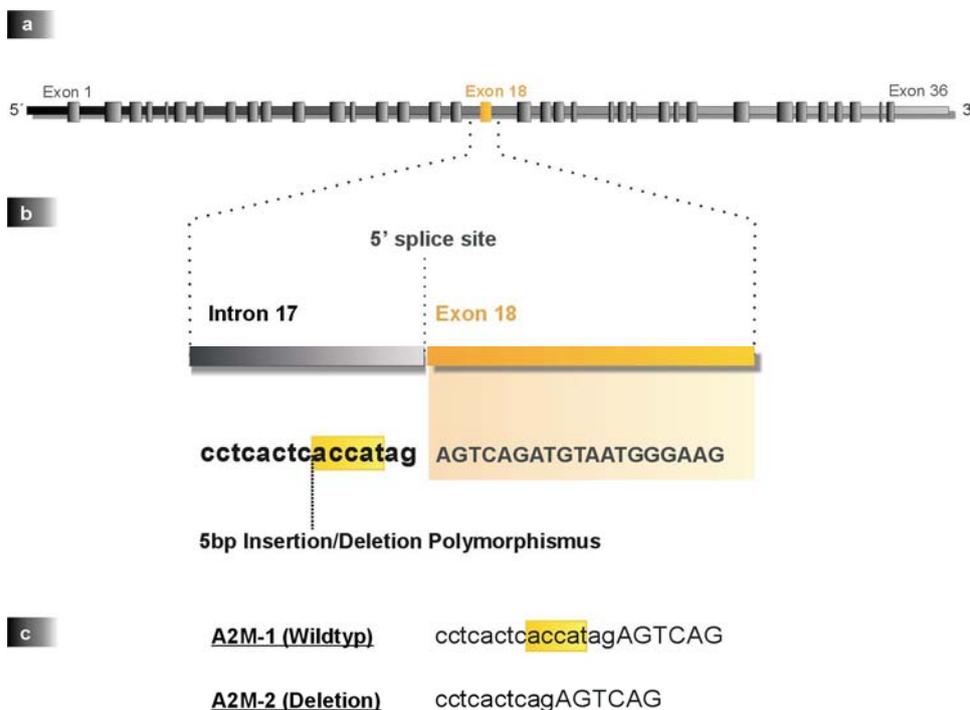


Abbildung 7

a, Exon-Intron-Struktur von A2M
b, Lage des 5bp Insertions-Deletions-Polymorphismus an der 5'-splice site des Exon 18
c, DNA-Sequenzen der A2M-Allele; der Wildtyp A2M-1 besitzt die 5bp-Insertion, A2M-2 ist das deletierte Allel.

1.3.4 Ziel der Arbeit

Voraussetzung für die vorliegende Arbeit waren zwei Studien, die eine Assoziation der ApoE-Polymorphismen ApoE- ϵ 2, ApoE- ϵ 3 und ApoE- ϵ 4 mit der AMD untersuchten (Klaver et al, 1998; Souied et al., 1998). Dabei stellten diese Studien folgende Hypothese auf: Das ApoE- ϵ 4-Allel ist ein Risikofaktor für Morbus Alzheimer (Corder et al., 1993). AMD ist wie Morbus Alzheimer eine neurodegenerative Erkrankung. Die Vermutung lag nahe, dass einer der ApoE-Polymorphismen auch mit der AMD assoziiert sein könnte.

Die Ergebnisse beider Studien belegen eine Assoziation des ApoE- ϵ 4-Allels mit der altersabhängigen Makuladegeneration. Sowohl bei Klaver et al. (1998) als

auch bei Souied et al. (1998) trat das ApoE- ϵ 4-Allel in der Gruppe der AMD-Patienten (bei Klaver et al. n=88 AMD-Patienten, bei Souied et al. n=116 Patienten) in signifikant geringerer Häufigkeit auf als in den Kontrollgruppen (ApoE- ϵ 4-Allelfrequenz bei Klaver et al. 0,7 in der Patientengruppe vs. 0,16 in der Kontrollgruppe, p=0,002; bei Souied et al. 0,7 vs. 0,15, p=0,006). Beide Studien schlussfolgern daraus, dass ApoE- ϵ 4 einen protektiven Effekt für das Erkrankungsrisiko bei AMD hat. Überraschenderweise wirkt das ApoE- ϵ 4-Allel für AMD protektiv, bei Morbus Alzheimer hingegen erhöht es das Risiko.

In der vorliegenden Studie sollte eine mögliche Assoziation des ApoE- ϵ 4-Allels mit der AMD an einem neuen, regional begrenzten Patientenkollektiv untersucht werden. Die Größe der Patientengruppe lag mit einer Anzahl von 400 Probanden deutlich über den Gruppenstärken in den beiden Vorgängerstudien. Alle Patienten waren kaukasischer Abstammung. Auch hinsichtlich der Kontrollgruppen zeigte das Studiendesign Unterschiede. Die beiden vorangegangenen Studien arbeiteten mit Kontrollgruppen, die zwar keine AMD-Zeichen aufwiesen, im Durchschnittsalter aber bis zu 10 Jahre unter dem Alter der Patientengruppen lagen (Durchschnittsalter Patienten vs. Kontrollen bei Klaver et al. 82 vs. 72 Jahre, bei Souied et al. 71 vs. 75 Jahre). Diese Kontrollgruppen können Probanden enthalten, die erst jenseits des 75. Lebensjahres an AMD erkranken. Die vorliegende Studie arbeitete hingegen mit einer altersgemäßen Kontrollgruppe (n=153), deren Durchschnittsalter mit 80 Jahren fast an das der Patientengruppe (Altersdurchschnitt = 82 Jahre) heranreicht. All diese Kontrollpersonen wurden auf Zeichen einer AMD untersucht und waren unauffällig. Zusätzlich wurde eine die Normalbevölkerung repräsentierende Kontrollgruppe (n=200, Durchschnittsalter=39 Jahre) untersucht. Eine Assoziation des ApoE- ϵ 4 mit der AMD sollte aufgrund der Größe der Patienten- und Kontrollgruppen sowie der Auswahl von altersgemäßen Kontrollen deutlich sichtbar werden.

Außerdem wurde folgende Überlegung angestellt: Auch andere mit Morbus Alzheimer assoziierte, häufige Polymorphismen könnten genetische Ursachen der AMD darstellen. Hierfür wurden mittels Literaturstudium alle bisher im Zusammenhang mit Morbus Alzheimer untersuchten Gene bzw. assoziierte Polymorphismen zusammengefasst. Gene mit häufig vorkommenden Polymorphis-

men wurden in die engere Auswahl aufgenommen. Die Untersuchung des Alpha-2-Makroglobulin (A2M), ein unspezifischer Proteinase-Hemmer im menschlichen Serum mit einer Vielzahl von Liganden, erschien erfolgversprechend. Einer der beiden häufigen Polymorphismen des Gens wurde in einer Studie mit der Alzheimer Erkrankung assoziiert (Blacker et al., 1998). Studien, die eine Assoziation von A2M mit AMD untersuchen, wurden noch nicht publiziert. An den bereits oben genannten Patienten- und Kontrollgruppen wurde deshalb zusätzlich untersucht, ob einer der beiden häufigen A2M-Polymorphismen mit der AMD assoziiert ist.

2 Material und Methoden

2.1 AMD-Patienten

Insgesamt wurden für diese Arbeit Blutproben von 400 AMD Patienten kaukasischer Abstammung herangezogen, wobei sowohl Patienten mit feuchter AMD als auch Fälle von trockener AMD in die Studie gingen (Alter im Durchschnitt 82,3 Jahre; n =400; Bereich 60-93 Jahre). Die Herkunft der Patienten-DNAs teilte sich folgendermaßen auf: 150 AMD-Patienten-DNAs stammen aus der Augenlinik des Universitätsklinikums Münster, 50 DNAs von Patienten aus der Universitäts-Augenklinik in Heidelberg, 165 AMD-Patienten-DNAs aus der Augenlinik der Universität Würzburg und 35 DNAs von Patienten der Universitäts-Augenklinik Tübingen (Tabelle 1). Alle Patienten hatten zum Zeitpunkt der Diagnose und Blutentnahme klinisch manifeste Zeichen einer AMD. Die Patienten-DNAs liegen in anonymisierter Form vor.

	Münster ¹	Heidelberg ²	Würzburg ³	Tübingen ⁴
AMD-Patientengruppe n=400	150	50	165	35

Tabelle 1

Herkunft der AMD-Patienten

- 1, Fachklinik für Augenheilkunde, St. Franziskus Hospitals Münster, PD Dr. D. Pauleikhoff
- 2, Augenklinik der Universität Heidelberg, PD Dr. F. Holz
- 3, Augenklinik der Universität Würzburg
- 4, Augenklinik der Universität Tübingen

2.2 Kontrollgruppen

Die Kontrollgruppe differenziert sich in zwei Untergruppen. Hinsichtlich des Probandenalters setzt sie sich aus einer Gruppe altersgemäßer Kontrollpersonen (Durchschnittsalter 80,3 Jahre; n =153; Bereich 68-102 Jahre) und einer die Normalbevölkerung repräsentierenden Gruppe (Alter im Durchschnitt 39,8

Jahre; n =200; 1- 90 Jahre) zusammen. Auch die Personen der Kontrollgruppen sind Kaukasier.

Die Gruppe der Altersgemäßen (n=153) stellt klinisch einwandfreie Kontrollen dar, die ophthalmologisch untersucht wurden und bei ihrem hohen Alter nachweislich keine Anzeichen einer AMD aufwiesen. 92 der altersgemäßen DNA-Kontrollen stammen aus der Augenklinik der Universität Münster, 61 aus der Augenklinik der Heidelberger Universität (Tabelle 2).

Die Gruppe "Normalbevölkerung" setzt sich folgendermaßen zusammen: 78 DNA-Proben stammen von Albinismus-Patienten und deren Angehörigen, die im Rahmen einer Albinismus-Studie am Uniklinikum Homburg an der Saar untersucht wurden (Passmore et al., 1999), 118 DNAs von Personen, die im Rahmen der Chorea Huntington-Diagnostik am Humangenetischen Institut der Universität Würzburg untersucht wurden und aus ganz Deutschland stammen, die restlichen 4 DNA-Kontrollen von Mitarbeitern des Humangenetischen Instituts der Universität Würzburg (Tabelle 2).

Auch die DNA-Proben aller Personen der Kontrollgruppen liegen in vollständig anonymisierter Form vor.

	Münster ¹	Heidelberg ²	Deutschland ³ weit	Homburg ⁴	Würzburg ⁵
Kontrollgruppe n=353	92	61	118	78	4

Tabelle 2

Herkunft der Kontrollgruppen-DNAs

- 1, Augenabteilung des St. Franziskus Krankenhaus in Münster, PD Dr. D. Pauleikhoff
- 2, Augenklinik der Universität Heidelberg, PD Dr. F. Holz
- 3, DNAs aus der Chorea Huntington-Diagnostik des Instituts für Humangenetik der Universität Würzburg
- 4, Augenklinik der Universität des Saarlandes, Homburg a.d. Saar, PD Dr. Kaesmann-Kellner; Albinismus-Studie: Passmore et al., 1999
- 5, DNA-Proben von Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik der Universität Würzburg

2.3 DNA-Isolierung aus EDTA-Blut

Zur Gewinnung genomischer DNA benötigt man 10 ml EDTA-Blut. In einem 50 ml Falconröhrchen werden die 10 ml EDTA-Blut mit kaltem Lysis-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 40 ml aufgefüllt und anschließend für 15-30 Minuten auf Eis inkubiert, wobei man das Röhrchen einige Male invertiert. Durch Zentrifugieren (10 min, 2000 UpM, 4 C°) werden die kernhaltigen Leukozyten präzipitiert, die sich als weißes Pellet an der Wand des Röhrchens anlagern. Man verwirft den Überstand und löst das Pellet in 5 ml Lysispuffer und zentrifugiert wiederum (10 min, 2000 UpM, 4 C°). Nachdem man den Überstand erneut abgeschüttelt hat, löst man das Pellet nun in 5 ml SE-Puffer, gibt 250 µl SDS (20%) und 50 µl Pronase E (10 mg/ml) hinzu und inkubiert über Nacht bei Raumtemperatur oder für 2-3 Stunden bei 55 C°. Bei diesem Schritt werden die kernhaltigen Leukozyten aufgebrochen und assoziierte Proteine verdaut.

Nach der Proteolyse erfolgt die Salzextraktion. Die nun freigesetzte DNA wird durch Zugabe von NaCl von Proteinen gereinigt und mit Ethanol gefällt. Man versetzt hierzu die DNA-Lösung mit 2,5 ml SE-Puffer und 2,1 ml gesättigter NaCl-Lösung (ca. 6 M) und mischt auf dem Vortex. Um eine Ausflockung des zugesetzten SDS zu verhindern, erwärmt man die Lösung für 10 Minuten bei 55 C°. Anschließend werden durch Zentrifugation (15 min, 4.000 UpM, RT) die ausgefallenen Proteine und die Zelltrümmer präzipitiert. Den klaren Überstand füllt man in ein frisches Falconröhrchen und fällt die enthaltende DNA mit 2 Vol EtOH (100%). Die gefällte DNA, die man als weißes Knäuel sieht, fischt man mit einem sterilen Glashaken aus der Lösung, wäscht sie mit 70% EtOH und lässt sie 10-20 Minuten an der Luft trocknen. Anschließend gibt man die DNA in ein mit 400-800 µl TE-Puffer gefülltes Kryoröhrchen und löst sie über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Heidolph-Schüttler.

Alle in dieser Arbeit verwendeten DNA-Proben wurden anhand der beschriebenen Methode aus EDTA-Blut der Patienten und Kontrollpersonen gewonnen.

2.4 Amplifizierung von Genbereichen

Die von Saiki et al. (1985) beschriebene Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction = PCR) ist eine zell-unabhängige Methode der DNA-Klonierung. Sie basiert auf den Prinzipien der DNA-Replikation und ermöglicht es, eine spezifische Ziel-DNA-Sequenz aus genomischer DNA in vitro zu amplifizieren. In dieser Arbeit wurde die PCR als Ausgangsbasis für die weiterführenden Untersuchungen eingesetzt.

Voraussetzung für eine PCR ist die Kenntnis der Sequenzen an den Enden des ausgewählten Bereichs, da Oligonukleotide synthetisiert werden müssen, die als so genannte „Primer“ die Zielregion einrahmen. Diese beiden Primer werden so gewählt, dass sie antiparallel zueinander jeweils an einen der beiden DNA-Stränge hybridisieren. Eine DNA-Polymerase verlängert dann in Gegenwart von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang des DNA-Stranges und synthetisiert so neue komplementäre DNA-Stränge.

Die heute standardmäßig eingesetzte DNA-Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase). Dieses Enzym besitzt ein Temperaturoptimum von über 70°C und ist für kurze Zeit bei Temperaturen von bis zu 95°C stabil.

Für den Reaktionsansatz benötigt man neben der DNA-Matrize (Template) zwei der bereits erwähnten Oligonukleotid-Primer, die spezifisch an die zu amplifizierende Sequenz binden, eine Mischung aller vier Desoxynukleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), Reaktionspuffer und die *Taq*-Polymerase.

Die PCR-Reaktion besteht aus sich wiederholenden Temperaturzyklen. Jeder Zyklus beginnt mit der Denaturierungsphase bei 94°C, in der die DNA-Doppelstränge voneinander getrennt werden und so die Matrize für Primer und DNA-Polymerase bilden. In der Annealingphase hybridisieren die Primer mit ihren Zielsequenzen, wobei die Temperatur jeweils von der Sequenz der Oligonukleotide abhängt. Sie schwankt je nach Primerpaar im Bereich von 40-65°C. Schließlich werden in der Elongationsphase bei 72°C die Primer mit den dNTPs durch die Aktivität der *Taq*-Polymerase entsprechend der DNA-Matrize in 5'-3'-Richtung verlängert. Dabei dienen die neu synthetisierten DNA-Stränge in den

folgenden Zyklen als Matrizen für die weitere DNA-Synthese. Durch diese Kettenreaktion entstehen nach etwa 30 Temperaturzyklen zusätzlich zur ursprünglichen DNA ungefähr 10^5 Kopien der spezifischen DNA-Sequenz. Die abschließende Elongationsphase, 5 Minuten bei 72 °C, soll die Ausbeute an PCR-Produkten voller Länge erhöhen.

Den typischen 25µl-Ansatz einer Standard-PCR zeigt Tabelle 3.

	Endkonzentration	Volumen
ddH ₂ O		add 25µl
10x Reaktionspuffer	1 x	2,5 µl
50 mM MgCl ₂	1,0 - 2,0 mM	0,5-1,0 µl
Formamid	4 %	1,0 µl
dNTPs (je 1,25 mM)	100 µM	2,0 µl
forward Primer (10 pmol/µl)	10 pmol	1,0 µl
reverse Primer (10 pmol/µl)	10 pmol	1,0 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,04 U/µl	0,2 µl
DNA (ca.100ng/µl)	4 ng/µl	1,0 µl

Tabelle 3

Standardansatz einer PCR, wobei man beim Testen der spezifischen PCR-Bedingungen je nach verwendetem Primerpaar und dem DNA-Template sowohl die MgCl₂-Konzentration im Bereich von 1,0-2,0 mM als auch das Hinzugeben von Formamid variieren kann.

Die Komponenten des PCR-Ansatzes werden in ein 200µl Eppendorff-Cap pipettiert, auf Eis inkubiert und dann in den vorgeheizten PCR-Block gestellt. Nach Ablauf der PCR-Zyklen und Abkühlen der Proben auf 5 C° werden je 10µl der PCR-Produkte mit 5µl Ladepuffer vermischt und in die Taschen eines mit Ethidiumbromid versetzten 1% Agarosegels geladen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgt in der Laufkammer bei 120V für 30 Minuten. Als Längensstandard lässt man eine DNA-Leiter mitlaufen. Nach der Auftrennung kann das Gel unter einem UV-Tisch angeschaut werden. Bei gelungener Reaktion imponiert das PCR-Produkt als helle Bande auf Höhe der erwarteten Größe der spezifischen DNA-Sequenz.

2.5 Primer

Das Gelingen einer PCR ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Wichtig ist vor allem die Wahl geeigneter Primer. Primer sind ssDNA-Sequenzen, die eine Länge von etwa 20 bp haben sollten. Für die PCR-Reaktion benötigt man einen forward- und einen reverse-Primer, die die zu amplifizierende Sequenz von beiden Seiten flankieren. Die Primer binden während der PCR-Reaktion bei einer bestimmten Temperatur, der so genannten annealing Temperatur T_A , an die Einzelstränge der template-DNA. Die T_A ist dabei von der spezifischen Sequenz der Primer abhängig. Sie liegt etwa 5 °C unterhalb der Dissoziationstemperatur T_D der Oligonukleotide und wird nach dem CG- bzw. AT-Gehalt der Sequenz nach der in Tabelle 4 angegebenen Formel berechnet oder aber mittels spezieller Software ermittelt.

$$T_A = T_D - 5 \text{ °C}$$

$$T_D = ([G+C] \times 4\text{°C} + [A+T] \times 2\text{°C})$$

Tabelle 4

Berechnung der Annealing-Temperatur T_A
zum optimalen Primer-Design

Ein Primerpaar sollte so gestaltet sein, dass die T_A des forward- und des reverse-Primers in etwa übereinstimmen. Außerdem sollten sich innerhalb des Primers keine palindromen Sequenzen befinden, da der Primer sonst Sekundärstrukturen bilden kann, die ein Annealing erschweren. Für dieses Primerdesign existieren spezielle Computerprogramme, mit deren Hilfe sich geeignete Primerpaare entwerfen lassen. Die in der Arbeit verwendeten Primer wurden alle mit Generunner© angepaßt und überprüft.

Die empirisch ermittelte T_A muss immer in einer Test-PCR überprüft werden. Sie kann in einigen Fällen vom berechneten Wert abweichen.

Die Sequenzen der in der Arbeit verwendeten Primer und die durch Test-PCRs ermittelten optimalen T_A sind beispielhaft in Abbildung 8 dargestellt.

a**Primer ApoE-Forward:** 5'-TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCA-3' (65°C)**Primer ApoE-Reverse:** 5'-GGCCCCGGCCTGGTACACTGCCA-3' (75°C)**b****Primer A2M-Forward:** 5'-TTCTCTCATAAGCTTTATCTGTATG-3' (75°C)**Primer A2M-Reverse:** 5'-AAGTACTTTCGTACGGTCTCCG-3' (65°C)**Abbildung 8**

Die Sequenzen der verwendeten Primer. Es wurde auf gleiche Länge, ein ausgewogenes Verhältnis der Basenpaare und auf die Annealing-Temperatur (TA) geachtet, die nicht extreme Differenzen zeigen sollte.

a, Primerpaar für die Amplifikation des ApoE-Polymorphismus

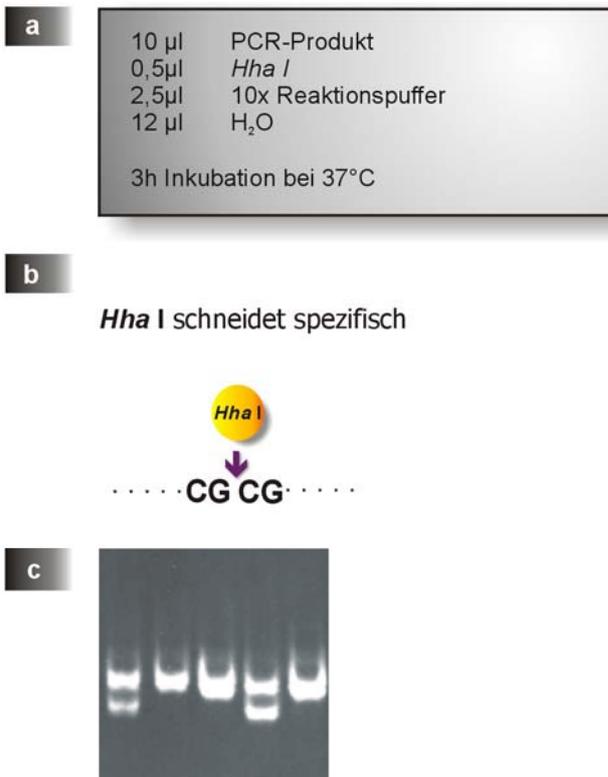
b, Primerpaar für die Amplifikation des A2M-Polymorphismus

Bei beiden Primerpaaren wurde die anhand von Genrunner ermittelten voraussichtlichen TA mit angegeben.

2.6 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die die DNA an spezifischen Nukleotidsequenzen schneiden. In der Molekularbiologie werden hauptsächlich TypII-Restriktionsenzyme verwendet, komplexe Proteine, die sowohl eine Restriktionsendonuklease- als auch eine Methylasefunktion besitzen. Sie binden spezifisch an symmetrische Sequenzen aus vier oder mehr palindromischen Nukleotidpaaren und schneiden dort. Dabei entstehen entweder überhängende, kohäsive (sticky) oder glatte (blunt) Enden (Kessler et al., 1985; Roberts et al., 1988; Kornberg et al., 1974).

Das in der Arbeit verwendete Enzym *Hha I* bzw. dessen Isoenzym *Cfo I* schneidet spezifisch die Sequenz GCGC und erzeugt dabei glatte Enden. Bei einer Reaktionstemperatur von 37°C gewährleisten 2U *Hha I* pro µg DNA eine vollständige Spaltung. Die Komponenten eines Spaltungsansatzes zeigt Abbildung 9. Zur Kontrolle des Enzymverbaus wird eine Probe der gespaltenen DNA auf einem Agarosegel aufgetrennt.

**Abbildung 9**

- a**, Beispielhafter Ansatz eines Enzymverdaus mit *Hha* I
b, Spezifische Zielsequenz der Restriktionsendonuklease *Hha* I
c, Auftrennung mit *Hha* I verdauter PCR-Produkte auf einem Agarosegel

2.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Elektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, bei dem die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu deren Trennung ausgenutzt wird.

Nukleinsäuren sind durch ihr Zucker-Phosphat-Rückgrat negativ geladen. Im elektrischen Feld wandert die DNA von der Kathode zur Anode. Bei der Gelelektrophorese wirkt die Gelmatrix aufgrund ihrer Porenstruktur wie ein Molekularsieb: größere Moleküle bewegen sich langsamer durch die Gelporen hindurch als kleine Moleküle. Die Porengröße in Agarosegelen wird durch die Agarose-Konzentration bestimmt, wobei die Porengröße mit steigender Konzentra-

tion des Gels abnimmt. Bei Polyacrylamidgelen wird die Porengröße entsprechend von der Konzentration des Acrylamids sowie vom Vernetzungsgrad des Gels bestimmt.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle wird im Wesentlichen bestimmt von Molekülgröße und Gelkonzentration sowie von der Konformation der DNA (linear, zirkulär, supercoil), der angelegten Spannung und dem verwendeten Laufpuffer.

2.7.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Mit der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente von 70bp bis etwa 50kb Länge schnell und einfach auftrennen. Linear doppelsträngige DNA wandert im elektrophoretischen Feld mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl ihrer Nukleotidpaare ist. Durch einen Vergleich mit definierten DNA-Längenstandards, die während der Elektrophorese mitlaufen, lässt sich die Länge eines bestimmten DNA-Fragments ermitteln. Die Agarose-Konzentration wählt man je nach Abhängigkeit der Länge der aufzutrennenden DNA-Fragmente (0,7 % bis 2 %), höhere Konzentrationen bei kurzen Fragmenten bzw. niedrige Konzentrationen bei sehr großen Fragmenten und standardmäßig eine 1%ige Agarosekonzentration.

Zur Herstellung eines Agarose-Gels kocht man je nach gewünschter Konzentration x g (= $x\%$) Agarose in 100ml 1 x TBE-Puffer so lange auf, bis die Lösung klar ist. Anschließend kühlt man die Gellösung auf Handwärme ab, gibt 2 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzu, gießt sie in eine Gelkammer und setzt einen Taschenformer ein. Nach ca. 30 Min ist das Gel polymerisiert und lässt sich beladen. Die DNA-Proben werden mit 0,5 Vol 10x Loading-Puffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in 1 x TBE-Puffer bei 100 - 120 V in etwa 20 Min. Während der Elektrophorese interkaliert das Ethidiumbromid im Agarosegel zwischen den Basenpaaren der DNA. Nach der Auftrennung kann man die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator anhand der roten Fluo-

reszenz des interkalierten Ethidiumbromids lokalisieren und deren Größe durch einen Vergleich mit dem Längenstandard bestimmen.

2.7.2 Überprüfung von PCR-Produkten durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung der Proben auf einem Agarosegel. Entsprechend der zu erwartenden Größe der PCR-Produkte sowohl des ApoE und als auch des A2M im Bereich von 100-300 bp wurde eine Agarosekonzentration von 1% gewählt. Als Längenstandard diente eine 1kb-Plus-DNA Leiter der Firma Gibco®.

Zu Dokumentationszwecken wurden die Gele nach der Auftrennung auf dem UV-Transilluminator mit einem Bioprint-System fotografiert.

2.7.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten auf Agarosegelen ist allerdings begrenzt. Längenunterschiede unter 50 Basenpaaren werden nur ungenau dargestellt. Um DNA-Fragmente, die sich in ihrer Länge beispielsweise nur um eine Base unterscheiden, auftrennen zu können, benötigt man höher vernetzte Gele. Hierfür wurden Polyacrylamid-Gele verwendet, deren Zusammensetzung je nach gewählter Methode variierte.

Polyacrylamidgele zeichnen sich gegenüber Agarosegelen durch ein genaueres Auftrennungsvermögen aus. Sie eignen sich zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Größenbereich von ca. 10bp bis 2000bp, selbst Fragmentunterschiede von 1bp sind auf den Gelen detektierbar.

Polyacrylamid entsteht durch Polymerisation von Acrylamid-Polymeren. Die Gele entstehen durch Quervernetzung mit bifunktionalen Verbindungen wie z.B. N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis), das die Ketten des Acrylamids untereinander vernetzt und so die dreidimensionale Struktur des Gels herstellt. Gestartet wird diese Polymerisation durch Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-

Tetramethylethylen-diamin (TEMED). TEMED katalysiert die Bildung freier Radikale aus dem Persulfat, die wiederum die Polymerisierung initiieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden vor allem 6%ige und 20%ige denaturierende und nicht-denaturierende Gele verwendet. Denaturierende Gele enthalten Harnstoff in einer Konzentration von 7,5 M. Durch seine Eigenschaft, Wasserstoffbrücken zu brechen, verhindert Harnstoff die Bildung von Sekundärstrukturen der DNA. Die Auftrennung der DNA in denaturierenden Gelen wird daher nur durch die Molekülgröße bestimmt.

Im Allgemeinen benötigt man für große Gele (35x40cm) 70ml Gellösung, für kleine Gele (20x35) 40ml. Zum Gießen des Gels verwendet man zwei unterschiedlich lange Glasplatten, die vorher gründlich mit A.bidest, 70%igem und 100%igem Ethanol gereinigt werden. Die kürzere der beiden Platten wird unter dem Abzug silanisiert. Hierdurch wird die Oberfläche stärker wasserabweisend, so dass sich die Platte nach dem Gellauf leichter lösen lässt und das Gel auf der längeren Glasplatte haftet.

Die Glasplatten werden nun durch dazwischenliegende 0,4mm dicke Spacer getrennt und mit Klammern fixiert. Nun kann man die Gellösung mit APS und TEMED versetzen und zügig zwischen die Glasplatten gießen wobei man die Bildung von Luftblasen vermeiden sollte. An den oberen Rand des Gels werden Haifischzahnkämme zur Bildung einer Tasche gesteckt. Bei RT ist das Gel nach einer Stunde auspolymerisiert. Man entfernt die Klammern und steckt nun die Kämmen mit der gezahnten Seite in das Gel und erhält einzelne abgetrennte Taschen.

Die Elektrophorese erfolgt in einer mit 1xTBE-Puffer gefüllten, vertikalen Gelkammer. Die Geltaschen werden mit Puffer gespült und dann mit den Proben beladen (ca. 4µl Probe). Die Leistung beträgt entweder 75W (große Gele) oder 55W (kleinere Gele), die Laufzeit bei Auftrennung von PCR-Produkten 1h, bei Sequenzierungen für kurze Läufe 1,5h, für lange 5h, bei SSCP-Analysen variiert die Dauer.

Nach Ende der Laufzeit werden die Glasplatten getrennt. Bei der Auftrennung der *Hha* I verdauten PCR-Produkte wurden die Gele anschließend für 20 Min in ein 2%iges Ethidiumbromidbad gelegt und danach unter dem UV-

Transilluminator fotografiert. Bei der SSCP-Analyse und der Sequenzierung hebt man nur die kürzere Glasplatte ab, das Gel bleibt auf der längeren Platte haften und wird von dort auf Whatman 3MM Filterpapier transferiert. Anschließend wird es mit Klarsichtfolie überzogen und für 45 Min bei 80°C in einem Vakuum-Geltrockner getrocknet. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgt nun mittels Autoradiographie.

2.8 Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

Die SSCP-Methode soll in dieser Arbeit nur kurz dargestellt werden, da sie zwar zur Bestimmung der ApoE-Genotypen getestet wurde, sich aber nicht als optimale Methode herausstellte und deshalb nicht für die Bestimmung der Genotypen aller Proben der Studie verwendet wurde.

Das 1989 erstmals beschriebene Verfahren der Analyse von Einzelstrangpolymorphismen (single-strand conformation polymorphisms SSCP) dient zur Darstellung von Sequenzunterschieden in kurzen DNA-Stücken. Grundlage für diese Methode ist die Änderung der gelelektrophoretischen Mobilität von Einzelstrang-DNA aufgrund von Unterschieden in der DNA-Sequenz. Nach Hitze-Denaturierung doppelsträngiger DNA und schnellem Abkühlen auf Eis nehmen die Einzelstränge für sie thermodynamisch günstige Strukturen ein, wobei komplementäre Regionen durch Rückfaltungen interne doppelsträngige Helices, verbunden durch einzelsträngige, schleifenbildende Bereiche (loops) bilden können. Der Austausch eines Basenpaares kann zu einer veränderten Konformation führen. Das Resultat ist eine im Vergleich zu einer nichtmutierten Gensequenz verzögerten oder beschleunigten Mobilität der DNA bei der Auftrennung in einem Polyacrylamid-Gel. Sequenzunterschiede verschiedener DNA-Proben erkennt man somit im Gel an ihrer unterschiedlich weiten Laufstrecke bei gleicher Laufzeit. Je größer der Einfluß einer gegebenen Mutation auf die Konformation des Einzelstrangs ist, desto deutlicher wird ihr Nachweis.

Für die SSCP-Analyse werden die gewünschten DNA-Sequenzen aus den DNA-Proben mittels PCR amplifiziert. Hierfür verwendet man unter anderem das radioaktiv markierte Nukleotid α^{33} -CTP, um später die DNA-Banden im Gel

mittels Autoradiographie detektieren zu können. Die PCR-Produkte werden bei 100°C im Heizblock denaturiert, sofort auf Eis inkubiert und dann bei 4°C Raumtemperatur auf einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Ende der Elektrophorese wird das Gel getrocknet und auf einem Röntgenfilm exponiert. Abbildung 10 stellt die Methode schematisch dar.

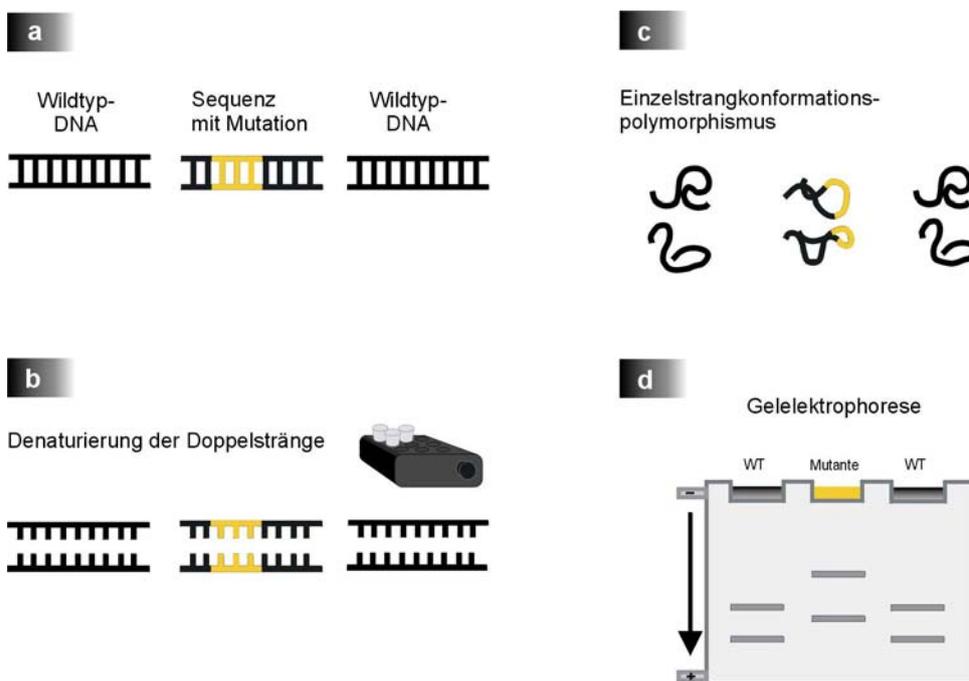


Abbildung 10

Prinzip der SSCP: Eine von einer nicht mutierten Gensequenz (hier als Wildtyp bezeichnet) abweichende Sequenz kann zu einer veränderten Konformation führen, die in einer abweichenden Mobilität im Gel resultiert.

a, PCR-Produkte mit und ohne Mutation

b, Denaturierung der PCR-Produkte im Heizblock bei 100°C

c, Abkühlen auf Eis: die DNA-Einzelstränge nehmen thermodynamisch günstige Strukturen ein, die sequenzspezifisch sind; die Mutation führt zur Änderung der Konformation.

d, Auftrennung auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel bei 4°C.

2.9 Denaturierungs-Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)

Auch die Methode der DGGE sei hier in ihren Grundzügen dargestellt, da sie ebenso wie die SSCP getestet und einige Male variiert wurde, die Ergebnisse

aber nicht den Anforderungen einer Analyse an über 700 DNA-Proben genügen.

Die DGGE ist ebenfalls eine elektrophoretische Methode, mit der man einen einzelnen Basenaustausch innerhalb eines DNA-Strangs identifizieren kann. Die der DGGE zugrunde liegende Technik der Auftrennung wurde 1983 erstmals von Fischer und Lerman beschrieben (Fischer et al., 1983). Doppelsträngige DNA wird auf einem Acrylamidgel aufgetrennt, das einen Denaturierungsgradienten darstellt. Die doppelsträngigen DNA-Stücke werden dabei einem zunehmendem denaturierenden Milieu ausgesetzt und denaturieren bzw. schmelzen schließlich in disrechten Banden, den so genannten "Schmelzdomänen" (melting domains), auf. Die Schmelztemperatur T_m dieser Domänen ist sequenzabhängig und spezifisch für eine Sequenz. Wird die T_m der niedrigsten Schmelzdomäne erreicht, schmilzt die DNA partiell auf und bildet dann eine Art verzweigtes Molekül. Diese Struktur verringert nun die Mobilität der DNA im Acrylamidgel. Da die T_m einer bestimmten Schmelzdomäne sequenzspezifisch ist, ändert eine Mutation das Schmelzprofil der DNA verglichen mit dem Wildtyp. Eine DNA, die Mutationen enthält, zeigt bei der Auftrennung Mobilitätsverschiebungen an einer verglichen mit dem Wildtyp anderen Position im Gel. Denaturiert das Fragment vollständig, wird die Migration wieder eine Funktion der Größe.

Bei der DGGE wird das denaturierende Milieu durch die Kombination einer einheitlichen Temperatur in der Gelkammer, typischerweise zwischen 50 und 65°C, und einem linearen denaturierenden Gradienten im Gel, bestehend aus Harnstoff und Formamid, erzeugt. Gelgradienten stellt man aus zwei verschiedenen denaturierenden Lösungen her, die beim Gießen des Gels so vermischt werden, dass ein kontinuierlicher Gelgradient entsteht. Eine 100%ige Denaturierungslösung beispielsweise besteht aus 7M Harnstoff und 40% Formamid. Der Denaturierungsgradient kann sowohl perpendicular als auch parallel zur Richtung der Elektrophorese angelegt werden. Für ein Perpendikulargel, dessen Gradient perpendicular zum elektrischen Feld verläuft, verwendet man normalerweise einen breiten Denaturierungsgradienten mit einer Spannweite von 0-100% oder 20-70%. Dieses Gel dient zu Beginn der Bestimmung des op-

timalen Denaturierungsbereichs. Zur genaueren Auftrennung verwendet man danach ein Parallelgel, dessen Denaturierungsgradient parallel zum elektrischen Feld verläuft. Hier engt man den Denaturierungsgradienten ein, um eine bessere Trennung von Fragmenten zu ermöglichen.

Auf einem denaturierenden Gel mit einem Gradienten laufen die Wildtyp DNA-Fragmente und die mutierten DNA-Fragmente nebeneinander. So lassen sich Mutationen anhand unterschiedlicher Migration von Wildtyp- und mutierter DNA feststellen. Die Fragmente werden vorher mit der PCR amplifiziert, um genug DNA auf das Gel laden zu können. Eine optimale Auflösung erzielt man, wenn die Moleküle nicht vollständig denaturieren und die zu untersuchende Region in der niedrigsten Schmelzdomäne liegt. Dies erreicht man durch den Anhang einer 30-40bp langen Sequenz sich wiederholender GC-Nukleotide (GC-clamp) an einen der Primer. Da Sequenzen mit hohem GC-Gehalt einen sehr hohen Schmelzpunkt haben, entsteht durch den GC-clamp an einem Ende des PCR-Produkts eine Schmelzdomäne mit sehr großer T_m , die untersuchte Region innerhalb des PCR-Produkts liegt somit in der niedrigsten Schmelzdomäne. Alternativ zum GC-clamp kann man auch ChemiClamp Primer verwenden, die die beiden DNA-Stränge an einem Ende miteinander verbinden.

Für die Bestimmung der Schmelzdomänen einer Sequenz existieren spezielle Computerprogramme wie die MacMelt® Software, die das theoretische Schmelzprofil einer DNA-Sequenz berechnen und graphisch darstellen. Schmelzprofile zeigen Regionen mit hohen und niedrigen Schmelzdomänen an. Anhand dieser Programme lassen sich dann auch die Platzierung der Primer und des GC-clamps theoretisch prüfen und bis hin zum geeignetsten Schmelzprofil optimieren.

Die bei dieser Methode gebildeten Heteroduplexe tragen dazu bei, Homoduplex Mutationen zu detektieren. Typischerweise wendet man dieses Verfahren an, wenn es nicht möglich ist, eine homoduplexe Mutation zu lösen. Die Analyse heteroduplexer Moleküle kann die Sensitivität der DGGE erhöhen. Heteroduplexe lassen sich erzeugen, wenn man Wildtyp- und mutierte DNA gemeinsam als template-DNA in die PCR gibt oder aber separate PCR-Produkte mischt, denaturiert und wieder renaturieren lässt. Ein Heteroduplex hat eine fal-

sche Basenpaarung (mismatch) im Doppelstrang, was zu einer Veränderung seiner eigentlichen Konformation führt. Dies destabilisiert den Doppelstrang und führt zu einer Denaturierung bei einer geringeren Denaturierungskonzentration. Die heteroduplexe Bande wandert im Gel stets langsamer als die korrespondierende homoduplexe Bande unter spezifischen Bedingungen.

2.9 DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode

Die DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode wurden von Sanger et al. (1977) entwickelt. Diese Methode der enzymatischen DNA-Sequenzierung basiert auf dem zufälligen Einbau von Didesoxynukleotiden während der Neusynthese von DNA, der zu einem Abbruch der Synthese führt. Didesoxynukleotide (ddNTPs) sind Analoga der dNTPs, von denen sie sich durch eine fehlende Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoffatom unterscheiden. Sie werden zwar an die wachsende Nukleotid-Kette angehängt, können jedoch, da die 3'-Hydroxylgruppe fehlt, an ihrem 3'-Kohlenstoffatom keine Phosphodiesterbindung ausbilden. Es kommt zum Kettenabbruch. Da der Einbau und damit der Kettenabbruch zufällig erfolgt, erhält man bei der Reaktion eine statistische Mischung aller Kettenlängen, von der jedoch jede mit dem Nukleotid endet, das als ddNTP der Reaktion zugegeben wurde. Durch den Reaktionszusatz eines radioaktiv markierten dNTP, meist handelt es sich hierbei um ^{35}S -dATP, lässt sich die gesuchte Sequenz nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem 6% PAA-Gel durch Autoradiographie ablesen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Reaktionen wurden mit dem Sequenase™ Version 2.0 DNA Sequencing Kit von USB, Cleveland (USA), durchgeführt.

Bei der Sequenzierreaktion werden ebenso wie bei der PCR dNTPs sowie kurze Oligonukleotidprimer eingesetzt. Da auch nach der PCR noch dNTPs und Primer in großen Mengen im Reaktionsansatz vorhanden sind, müssen diese vor der Sequenzierung eliminiert werden. Eine aus der Garnele stammende alkalische Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP) entfernt überschüssige dNTPs durch Abspaltung der 5'-Phosphatreste aus dem Ansatz. Die verbliebenen Primer werden durch die Exonuclease I, einem DNA-Einzelstrang spaltenden Enzym, gespalten. Beide Enzyme sind im PCR-Puffer aktiv, so dass

man den PCR-Ansatz direkt einsetzen kann. Man gibt zu 5 μl PCR-Ansatz 0,5 μl Exonuclease I (1U/ μl) und 0,5 μl SAP (1U/ μl) und inkubiert die Lösung für 15 Min bei 37°C. Anschließend inaktiviert man die Exonuclease I und die SAP durch Erhitzen auf 80 °C, 15 Min. Jetzt lässt sich die DNA aus der PCR direkt für die Sequenzierreaktion einsetzen. Alternativ zu dieser Methode wurde für manche Sequenzierungen das PCR-Produkt nach Agarosegel-Auftrennung als Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mittels eines DNA-Extraktionskits aus dem Gel extrahiert.

Für die Sequenzierreaktion muss die DNA einsträngig vorliegen. Weiterhin wird ein Oligonukleotidprimer als Ansatzstelle für die Polymerase benötigt. Dieser ist meist identisch mit dem PCR-Primer und wird in einer Menge von 10pmol dem vorbehandelten PCR-Produkt zugegeben und mit ddH₂O auf ein Volumen von 10 μl aufgefüllt. Man erhitzt den Ansatz für 3 Min bei 100°C und stellt ihn danach sofort auf Eis. An den sich dabei trennenden DNA-Doppelstrang lagern sich die Primer an ihre Startstelle an.

Man führt pro zu sequenzierendem PCR-Produkt also parallel vier basenspezifische Reaktionen durch, wobei jeder Reaktionsansatz die vier dNTPs und eines der vier ddNTPs enthält. Da man im Vergleich zu den dNTPs wesentlich weniger ddNTP zugibt, kommt es in statistischer Verteilung zum Einbau des ddNTPs und damit zum Kettenabbruch. Die DNA-Fragmente besitzen ein durch den Primer definiertes übereinstimmendes 5'-Ende, ihre 3'-Enden sind jedoch verschieden, da abhängig vom Einbau des jeweiligen ddNTPs die Synthese zum Erliegen kommt.

Für die Sequenzierungsreaktion legt man je 2,5 μl der verschiedenen Terminationsgemische (ddG-, ddA-, ddT-, ddC-Mix) in vier unterschiedlichen Eppendorffcabs vor, die der Übersichtlichkeit halber verschiedene Farben haben und mit dem jeweiligen ddNTP beschriftet werden. Nach 5-minütiger Inkubation des Elongationsansatzes bei RT gibt man je 3,5 μl in die bei 37°C vorgewärmten Caps mit den Terminationsgemischen und inkubiert wiederum für 8 Min bei 37°C. Durch die Zugabe von je 4 μl Stop-Lösung wird die Reaktion beendet. Nach Denaturierung (1 Min bei 100°C) lädt man je 2 μl der Sequenzierungsreaktion in die Geltaschen eines 6%igen PAA-Gels in der Reihenfolge A-C-G-T und

trennt durch Elektrophorese das Gemisch unterschiedlich langer DNA-Sequenzen auf. Nach anschließender Autoradiographie lässt sich die Sequenz in 5'→3'-Richtung von unten nach oben ablesen. Beginnend mit der Bande des kleinsten Fragmentes liest man auf dem Röntgenfilm die Sequenz von unten nach oben und notiert dabei die Nukleotide der entsprechenden Banden. Man geht Bande für Bande vor und erhält so die 5'→3'-orientierte Sequenz des neu synthetisierten DNA-Stranges. Die Auswertung, Bearbeitung und Archivierung der Sequenzen erfolgte anschließend mit Hilfe von Computerprogrammen wie dem Generunner®.

2.10 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit dem Statistikprogramm SPSS Version 8.0 vorgenommen. Alle Ergebnisse dieser Arbeit wurden als SPSS-Datensätze eingegeben und anschließend statistisch ausgewertet.

Um den Ansatzpunkt der statistischen Auswertung zu verdeutlichen, sei noch einmal die der Studie zugrunde liegende Frage gestellt: Tritt bei AMD-Patienten einer der untersuchten Polymorphismen des ApoE-Gens oder des A2M-Gens oder ein bestimmter Genotyp hinsichtlich aller möglichen Allelkombinationen innerhalb eines Individuums in einer signifikant höheren Frequenz als bei den Kontrollgruppen auf oder ist die Verteilung zufällig und unabhängig von der Erkrankung? Ergäbe sich ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung in den unterschiedlichen Gruppen, könnte man auf eine Assoziation der AMD mit einem der untersuchten Polymorphismen schließen.

Vorerst seien hier noch die grundlegenden Begriffe der statistischen Auswertung mit SPSS erklärt. Ergebnisse werden mit SPSS in Form von Datensätzen erfasst, wobei alle eingehenden Daten bestimmten Variablen zugeordnet werden müssen. Die Variablen können unterschiedlich definierte Werte annehmen. Als die beiden Variablen der Studie sind die Zugehörigkeit der untersuchten DNA-Proben bzw. Individuen zu einer Gruppe und das Vorhandensein eines bestimmten Allels oder Genotyps definiert. Variable 1 wird also von den untersuchten Gruppen gebildet (AMD-Patienten, altersgemäße Kontrollen, Kontrollen aus der Normalbevölkerung), kann also insgesamt drei verschieden definierte

Werte annehmen. Variable 2 wird jeweils von den Allelen bzw. Genotypen (ApoE- ϵ 2, - ϵ 3, - ϵ 4; ApoE 3/3,2/2,4/4,2/3,2/4,3/4 bzw. A2M-1 und -2, A2M-1/A2M-1, A2M-1/A2M-2, A2M-2/A2M-2) gebildet. Variable 2 kommt also beispielsweise bei der statistischen Auswertung der absoluten Häufigkeiten der drei untersuchten ApoE-Allele in den verschiedenen Gruppen in drei definierten Werten vor, nämlich ApoE- ϵ 2, ApoE- ϵ 3 oder ApoE- ϵ 4. Bei der Untersuchung der Frequenz der Genotypen von ApoE lassen sich hingegen für Variable 2 sechs unterschiedliche Werte definieren.

Zur Klärung einer möglichen Assoziation ist es nötig, die Häufigkeitsverteilung der Allele sowie der Genotypen innerhalb der untersuchten Gruppen zu berechnen. Diese Berechnung erfolgte anhand von SPSS-Häufigkeitstabellen. Bei der Berechnung von Häufigkeiten wird nur eine Variable betrachtet, z.B. kann man eine Häufigkeitstabelle für die Verteilung der drei ApoE-Allele in der Normalbevölkerung erstellen. Möchte man nun mehrere Variablen in die Betrachtung einbeziehen, im genannten Fall neben der Normalbevölkerung noch weitere Gruppen, benutzt man in SPSS die Funktion der Kreuztabellen.

Eine Kreuztabelle dient dazu, die kombinierte Häufigkeitsverteilung zweier Variablen darzustellen. Sie bildet somit das Pendant zu einer Häufigkeitstabelle für den 2-Variablen-Fall. Erstellt man beispielsweise eine Häufigkeitstabelle für die Variable ApoE-Allel, gibt die Tabelle an, wie viele ApoE- ϵ 3, ApoE- ϵ 2 und ApoE- ϵ 4 in der betrachteten Stichprobe enthalten sind. Ebenso kann man eine Häufigkeitstabelle für eine Variable Zugehörigkeit zu einer Gruppe erstellen, aus der hervorgeht, wie viele der Allele aus der Stichprobe jeweils in der Normalbevölkerung, Patientengruppe und Kontrollgruppe vorkommen. Erstellt man nun eine Kreuztabelle für die beiden Variablen Allel und Gruppenzugehörigkeit, gibt diese Tabelle die Anzahl der ApoE- ϵ 2-Allele bzw. ApoE- ϵ 3-Allele und ApoE- ϵ 4-Allele in der Normalbevölkerung, in der Patientengruppe und der Kontrollgruppe an. Es werden also Fallgruppen - in diesem Beispiel Personengruppen - betrachtet, die durch die Kombination der Merkmale aus den beiden Variablen Allel und Gruppe definiert sind.

Die Prozedur der Kreuztabellen beschränkt sich jedoch nicht nur darauf, die gemeinsame Verteilung zweier Variablen in einer Tabelle darzustellen, sondern

sie bietet auch statistische Tests an, mit denen untersucht werden kann, ob möglicherweise ein Zusammenhang zwischen den beiden Variablen besteht. Wenn sich beispielsweise zeigt, daß in einer bestimmten Stichprobe ein Großteil der Probanden entweder Allel ApoE-ε2 oder ApoE-ε4 besitzen, während der größte Teil der Probanden einer Kontrollgruppe ApoE-ε3 besitzen, läßt dies unter Umständen den Schluß zu, daß in der entsprechenden Grundgesamtheit ein Zusammenhang zwischen dem Allelstatus und der Erkrankung einer Person besteht.

Wie bei der Häufigkeitstabelle, in der die Häufigkeitsverteilung einer einzelnen Variablen dargestellt wird, können auch bei der Kreuztabelle nicht nur die absoluten Häufigkeiten, sondern auch verschiedene relative Häufigkeiten und zudem so genannte erwartete Häufigkeiten angegeben werden. Die Idee von erwarteten Häufigkeiten bildet die Grundlage für einen Signifikanztest zur Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen den Variablen.

Der in der Arbeit verwendete Signifikanztest ist der Chi-Quadrat-Test. Er überprüft, ob zwei Variablen vollkommen unabhängig voneinander verteilt sind, oder ob ein Zusammenhang zwischen den Variablen besteht. Bei der Prozedur werden Chi-Quadrat-Tests nach unterschiedlichen Methoden berechnet.

Damit der Chi-Quadrat-Test durchgeführt werden kann, müssen bestimmte Anforderungen von den Daten erfüllt sein. Eine dieser Anforderungen besteht darin, dass die erwarteten Häufigkeiten in den einzelnen Tabellenfeldern nicht zu gering sein dürfen. Als Mindestanforderung sollte die erwartete Häufigkeit in keinem Feld kleiner als fünf sein.

Zur Durchführung des Signifikanztests wird das Prüfmaß Chi-Quadrat nach der χ^2 -Formel berechnet:

$$t = \sum_{j=1}^k \sum_{l=1}^m \frac{(o_{jl} - e_{jl})^2}{e_{jl}}$$

- t Testgröße des Chi-Quadrat-Tests
- k Anzahl der Zeilen in den Kreuztabellen
- o_{jl} beobachtete („observed“) Häufigkeit der Merkmalsausprägung (j; l); Wert in der j. Zeile und l. Spalte der Kreuztabelle
- m Anzahl der Spalten in den Kreuztabellen
- e_{jl} erwartete („expected“) Häufigkeit der Merkmalsausprägung (j; l); Wert in der j. Zeile und l. Spalte der Kreuztabelle

Dabei werden für jedes Feld der Tabelle die quadrierten Abweichungen der erwarteten von den tatsächlichen Häufigkeiten durch die erwarteten Häufigkeiten dividiert. Die Summe dieser Quotienten über allen Feldern der Kreuztabelle bildet den Chi-Quadrat-Wert. Durch das Quadrieren der Differenzen wird erreicht, dass negative und positive Abweichungen gleichermaßen in das Maß eingehen und sich nicht gegenseitig aufheben. Die Division durch die erwarteten Häufigkeiten ist erforderlich, da sich andernfalls bei insgesamt vielen Beobachtungen auch mehr Abweichungen ergeben würden. Bei 1.000 Beobachtungen wird die Summe der (quadrierten) Abweichungen unter sonst gleichen Umständen größer sein als bei 100 Beobachtungen.

Je größer die Abweichung in einem Feld der Tabelle ist, desto größer wird auch der Chi-Quadrat-Wert ausfallen. Ein großer Chi-Quadrat-Wert ist also mit großen Abweichungen verbunden und deutet auf einen Zusammenhang zwischen den beiden Variablen hin. Es ist jedoch auch möglich, dass sich die beobachteten Abweichungen zwischen zwei Variablen nur zufällig in der jeweils betrachteten Stichprobe ergeben haben, obwohl in der Grundgesamtheit aller Fälle kein Zusammenhang zwischen den Variablen besteht. Aus wahrscheinlichkeitstheo-

retischen Überlegungen lässt sich eine Verteilung für das Prüfmaß Chi-Quadrat herleiten, die in Abhängigkeit von der Anzahl der Zeilen und Spalten der Kreuztabelle angibt, mit welcher Wahrscheinlichkeit sich ein bestimmter Chi-Quadrat-Wert auch dann ergeben kann, wenn die Variablen in der Grundgesamtheit unabhängig voneinander verteilt sind. Der Zusammenhang wird mit Hilfe der *Freiheitsgrade* der Kreuztabelle dargestellt: Aus der Zeilen- und Spaltenanzahl wird die Anzahl der Felder ermittelt, denen bei gegebener Randverteilung beliebige Häufigkeiten zugeordnet werden können. Handelt es sich zum Beispiel um eine Tabelle mit 2 x 2 Feldern, so ergeben sich aus der Häufigkeit in einem der Felder bei gegebener Randverteilung unmittelbar die Häufigkeiten aller übrigen Felder. Weist das Feld links oben in der Tabelle die Häufigkeit 3 auf und ist die Gesamthäufigkeit der oberen Zeile durch die Randverteilung mit 7 angegeben, so muss das rechte obere Feld eine Häufigkeit von 4 aufweisen. Auf die gleiche Weise sind auch die Häufigkeiten der beiden anderen Felder festgelegt. In einer 2 x 2-Tabelle kann also nur die Häufigkeit eines Feldes frei gewählt werden. Die Tabelle hat daher einen Freiheitsgrad. Allgemein ergibt sich die Zahl der Freiheitsgrade einer Kreuztabelle als:

$$\text{Freiheitsgrade} = (\text{Zeilenanzahl} - 1) \times (\text{Spaltenanzahl} - 1)$$

Mit Hilfe des Wertes Chi-Quadrat und der Anzahl der Freiheitsgrade lässt sich die Wahrscheinlichkeit bestimmen, mit der sich die vorliegende Abweichung zwischen beobachteten und erwarteten Häufigkeiten bei gegebener Anzahl an Freiheitsgraden auch dann ergeben kann, wenn zwischen den Variablen in der Grundgesamtheit kein Zusammenhang besteht. Dabei gilt, dass bei gegebenem Zusammenhang zwischen den Variablen die Möglichkeit einer guten statistischen Absicherung des Ergebnisses mit wachsender Felderzahl und damit größeren Freiheitsgraden abnimmt. Das Zusammenfassen einzelner Werte einer Variablen kann daher auch dann sinnvoll sein, wenn die erwarteten Häufigkeiten in jedem Tabellenfeld ohnehin größer als fünf sind.

Neben dem üblichen Pearson'schen Chi-Quadrat-Test führt SPSS automatisch zwei weitere Tests durch. Der Likelihood-Test basiert auf der Maximum-Likelihood-Theorie und liefert bei großen Stichproben das gleiche Ergebnis wie Pearsons Chi-Quadrat-Test.

Der als *Zusammenhang linear-mit-linear* ausgewiesene Test misst den linearen Zusammenhang zwischen den Variablen und ist damit nur für Variablen geeignet, die mindestens Ordinalskalenniveau besitzen. Dieser Test ist auch als Mantel-Haenszel-Test bekannt.

Für den Pearson'schen Test wird ein Chi-Quadrat-Wert von 37,136 ausgewiesen. Der Wert hat bei den vorliegenden zwei Freiheitsgraden eine Signifikanz von 0,000 (bzw. 0,0%). Wenn kein Zusammenhang zwischen den beiden getesteten Variablen besteht, kann sich ein Chi-Quadrat-Wert der Größe 37,136 also mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,0% ergeben. Diese Wahrscheinlichkeit ist so gering, dass eine Unabhängigkeit der beiden Variablen sehr unwahrscheinlich ist. Man sagt, die Nullhypothese, derzufolge kein Zusammenhang zwischen den Variablen besteht, kann zurückgewiesen werden. Wenn man nun diese Nullhypothese zurückweist und davon ausgeht, es bestehe ein Zusammenhang zwischen den Variablen, begeht man mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit von 0,00000086% einen Irrtum. Diese Wahrscheinlichkeit wird auch als Irrtumswahrscheinlichkeit bezeichnet und häufig mit dem im englischen Sprachgebrauch üblichen p-value bzw. p-Wert gleichgesetzt. Je geringer diese Irrtumswahrscheinlichkeit, desto größer ist umgekehrt die Wahrscheinlichkeit, dass in der Grundgesamtheit ein Zusammenhang zwischen den Variablen besteht. Im Rahmen einer Stichprobenbetrachtung kann jedoch auch mit Hilfe eines Signifikanztests nie mit Sicherheit geklärt werden, ob ein solcher Zusammenhang vorliegt oder nicht. Oft wird als Richtwert angegeben, dass bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (syn. asymptotische Signifikanz, p-Wert) von 5% und weniger das Vorliegen eines Zusammenhangs angenommen werden kann. Dieser Grenzwert besitzt jedoch keine allgemeine Gültigkeit, sondern ist stets vor dem Hintergrund der untersuchten Fragestellungen sowie der jeweiligen Datenlage zu bewerten.

Deutet der Signifikanztest darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen den betrachteten Variablen besteht, lässt dies keine Rückschlüsse auf eine Kausalität zu. Es besagt lediglich, dass bestimmte Werte der einen Variablen tendenziell gemeinsam mit bestimmten Werten der jeweils anderen Variablen auftreten. Die Ursache davon kann allein mit statistischen Verfahren nicht ermittelt

werden. Vielmehr sind hierzu entsprechende theoretische Überlegungen erforderlich, die der statistischen Analyse im Allgemeinen vorausgehen. Führen diese Überlegungen zu der Hypothese, es bestehe ein Zusammenhang zwischen den Variablen, kann die Vereinbarkeit dieser Hypothese mit der empirischen Beobachtung durch statistische Verfahren wie dem Chi-Quadrat-Test untersucht werden.

Der Chi-Quadrat-Test liefert nicht unter allen Bedingungen zuverlässige Ergebnisse. Die folgenden Einschränkungen sind bei der Anwendung des Tests zu beachten:

Die erwartete Häufigkeit sollte in jedem Feld der Kreuztabelle mindestens fünf betragen. Andernfalls ist das Testergebnis nicht mehr zuverlässig.

Nach Möglichkeit sollten die Tabellen mehr als fünf Felder umfassen. Bei 2 x 2-Tabellen mit geringer Fallzahl können sich Einschränkungen in der Zuverlässigkeit des Tests ergeben. Beinhaltet eine 2 x 2-Tabelle ein Feld mit erwarteter Häufigkeit unter fünf, berechnet SPSS zusätzlich Fishers exakten Test. Dieser basiert auf einer hypergeometrischen Verteilung und ist für kleine Stichproben mit geringen erwarteten Häufigkeiten der genaueste Test. Für alle 2 x 2-Tabellen wird zum Pearson'schen Test zusätzlich Yates' Korrektur ausgewiesen. Die Korrektur besteht darin, dass bei der Berechnung des Chi-Quadrat-Wertes vor dem Quadrieren die absoluten Abweichungen der beobachteten von den erwarteten Häufigkeiten um 0,5 verringert werden. Dadurch ergibt sich ein kleineres Chi-Quadrat und somit ein schlechteres Signifikanzniveau. Diese Korrektur ist jedoch umstritten.

2.11 Puffer und Lösungen

DNA-Auftragspuffer (TAE-Gele)	(10x) 200 µl 50x TAE 500 µl Glycerin (87%) 300 µl ddH ₂ O + 1 Spatelspitze Bromphenolblau/ Xylencyanol
DNA-Auftragspuffer (TBE-Gele)	(10x) 50 % Saccharose 10x TBE 1 M Harnstoff 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol
Ethidiumbromidstammlösung Ethidiumbromidfärbelösung.	5 mg/ml in A. bidest. 1 l Laufpuffer (TAE oder TBE)
50 x TAE	400 µl Ethidiumbromidstammlsg 242,0 g Tris 18,6 g EDTA Dinatriumsalz A. bidest. ad 1000 ml, autoklavieren
10 x TBE	0,9 M Tris 0,9 M Borsäure 0,025 M EDTA pH 8,2-8,5
1 x TE	10 mM Tris/HCl, pH 7,6 1 mM EDTA Dinatriumsalz, autoklavieren

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Apolipoprotein E Allelhäufigkeiten

Die genomische Sequenz des APOE wurde 1985 von Paik et al. (1985) publiziert. Seither wurden mehrere Einzelnukleotid-Polymorphismen innerhalb der vier Exone des APOE beschrieben, die drei häufigsten sind die beiden bereits erwähnten Polymorphismen an Position 112 und 158 im Exon 4.

Die in der Arbeit verwendeten genomischen Sequenzen stammen alle aus der Online Datenbank für genomische Sequenzen des The National Human Genome Research Institute (<http://www.nhgri.nih.gov>).

3.1.1 PCR -Amplifikation des APOE Exons 4

Mit Hilfe der PCR wurde das die beiden Einzelnukleotid-Polymorphismen enthaltende Exon 4 des APOE amplifiziert. Die gewählten Primer ApoE-Forward und ApoE-Reverse amplifizieren eine 219 bp große DNA Sequenz, die beide Polymorphismen beinhaltet. Die Sequenz und die Lage der verwendeten Primer-Paare zeigt Abbildung 11.

a**Exon 4 (859bp):**

GGCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAATCGGAACTGG
 AGGAACAACGACCCCGGTGGCGGAGGAGACGCGGGCACGGCTG
(Apo E - Forward) TCCAAGGAGCTGCAGGGCGGCGCA
 GGCCCGGCTGGGCGCGGACATGTGAGGACGTG**CGC**GGCCGCCTGGTGCAG
 TACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGG
 GTGCGCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATG
 CCGATGACCTGCAGAAG**CGCC**
TGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCC (Apo E - Reverse)
 CGCGAGGGCGCCGAGCGCGGCCCTCAGCGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCC
 CCTGGTGGAAACAGGGCCGCGTGCGGGCCGCCACTGTGGGCTCCCTGGCCGG
 CCAGCCGCTACAGGAGCGGGCCAGGCCCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGC
 GGATGGAGGAGATGGGCAGCCGGACCCGCGACCCGCTGGACGAGGTGAAGG
 AGCAGGTGGCGGAGGTGCGCGCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATAC
 GCCTGCAGGCCGAGGCCCTCCAGGCCCGCCCTCAAGAGCTGGTTCGAGCCCCT
 GGTGGAAGACATGCAGCGCCAGTGGCCGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGC
 TGCCGTGGGCACCAGCGCCGCCCTGTGCCAGCGACAATCACTGAACGCCG
 AAGCCTGCAGCCATGCGACCCACGCCACCCGTCCTCCTGCCTCCGCGCA
 GCCTGCAGCGGGAGACCCTGTCCCCGCCCCAGCCGTCCTCCTGGGGTGGAC
 CCTAGTTAATAAAGATTACCAAGTTTCACGC

b

Primer ApoE-Forward: 5'-TCCAAGGAGCTGCAGGGCGGCGCA-3'

Primer ApoE-Reverse: 5'-GGCCCGGCCTGGTACTGCCA-3'

Abbildung 11

a, Lage der ApoE-Primer im Exon 4 des ApoE. Die Primer rahmen die beiden untersuchten Polymorphismen (rot hervorgehoben) ein. Das PCR-Produkt hat eine Länge von 219bp.

b, Primersequenzen ApoE-Forward und ApoE-Reverse

Bevor die PCR an den Patienten- und Kontrollgruppen durchgeführt werden konnte, wurden die optimalen Bedingungen der PCR durch eine Reihe von Test-PCRs bestimmt. Hierbei wurden die Annealing-Temperatur, die $MgCl_2$ – Konzentration, die Zugabe von Formamid sowie die Anzahl der Zyklen variiert. Ausgewählt wurden die Reaktionsbedingungen, bei denen die Produkte in der Agarose-Gelelektrophorese eine definierte Bande mit einer Größe von 219bp zeigten. Dies entsprach dem erwarteten PCR-Produkt. Die Test-PCRs ergaben eine optimale T_A von $60\text{ }^\circ\text{C}$, eine $MgCl_2$ –Konzentration von 10M, die Zugabe

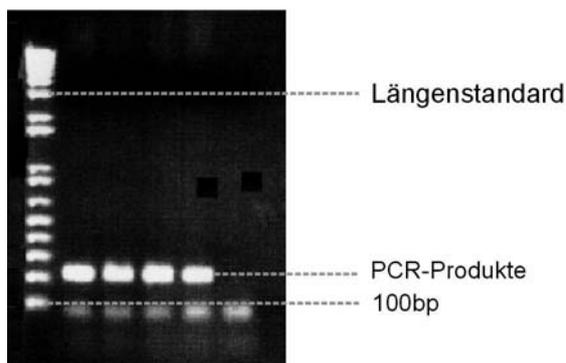
von 1 µl Formamid und eine Zyklenzahl von 33. Der Ansatz für die PCR des APOE ist zusammen mit den PCR-Bedingungen in Tabelle 5 dargestellt.

	Endkonzentration	Volumen
ddH ₂ O		add 25µl
10x Reaktionspuffer (10 mM MgCl ₂)	1x	2,5µl
Formamid 100%	4%	1,0µl
dNTPs (je 1,25 mM)	100µM	2,0µl
ApoE-Forward-Primer (10 pmol/µl)	10 pmol	1,0µl
ApoE-Reverse-Primer (10 pmol/µl)	10 pmol	1,0µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	1U	0,2µl
DNA (ca. 100ng/µl)	100ng	1,0µl
Annealing bei 61°C, 33 Zyklen		

Tabelle 5

Tabellarische Auführung aller Komponenten für den Ansatz der PCR des ApoE sowie die anhand von Test-PCRs ermittelten optimalen PCR-Bedingungen für die Amplifizierung des ApoE Exon 4 - Ausschnitts.

Nach Ermittlung der geeigneten PCR-Bedingungen wurde aus den DNAs der Patienten und Kontrollpersonen die Zielsequenz im ApoE Exon 4 amplifiziert. Bei allen Patienten und Kontrollpersonen ergab sich ein spezifisches Signal in der erwarteten Größe von 219 bp (Abbildung 12).

**Abbildung 12**

Überprüfung der ApoE-PCR einiger Probanden-DNAs

Nach abgeschlossener PCR wurden 10µl des Reaktionsansatzes mit 2µl Ladepuffer vermischt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Nach 20-minütiger Elektrophorese bei 120V sieht man unter dem UV-Tisch die zu erwartenden DNA-Banden mit einer Größe von 219bp.

3.1.2 DGGE

Zu Beginn der Studie wurde für die Charakterisierung der ApoE-Genotypen die DGGE-Methode gewählt, um neben den bekannten häufigen Polymorphismen zusätzlich mögliche, seltene oder bisher unbekannte Polymorphismen in Exon 4 detektieren zu können. Die hierfür verwendeten Primer unterscheiden sich von den Primern der herkömmlichen PCR durch eine an das Ende eines Primers angehängte repetitive GC-Sequenz, den GC-clamp. Aufgrund der Berechnung des Schmelzprofils erwies sich das 5'-Ende des ApoE-Reverse Primers als das geeignete Ende für den GC-clamp. Die Lage der Primer ist identisch mit der bereits beschriebenen PCR zur Amplifikation des Exon 4, das PCR-Produkt ist allerdings durch das Anhängen des GC-clamps 259bp lang, zeigt also eine um 40bp größere Bande bei der Agarose-Gelelektrophorese. Die Primersequenzen und die durch Test-PCRs ermittelten Bedingungen der Amplifikation lassen sich aus der Abbildung 13 entnehmen.

a

	Endkonzentration	Volumen
ddH ₂ O		add 25µl
10x Reaktionspuffer (10 mM MgCl ₂)	1x	2,5µl
Formamid 100%	4%	1,0µl
dNTPs (je 1,25 mM)	100µM	2,0µl
ApoE-Forward-Primer (10 pmol/µl)	10 pmol	1,0µl
ApoE-Reverse-Primer (10 pmol/µl)	10 pmol	1,0µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	1U	0,2µl
DNA (ca. 100ng/µl)	100ng	1,0µl

Touch-Down-PCR, Annealing beginnend bei 68°C, 3 Zyklen, 65°C, 3 Zyklen, 62°C, 33 Zyklen, insg. 36 Zyklen

b

Primer ApoE-Forward:

5'-TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCA -3'

Primer ApoE-GC_Reverse:

5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCGCGCG(GC-clamp)
GGCCCGGCCTGGTACTACTGCCA-3'

c

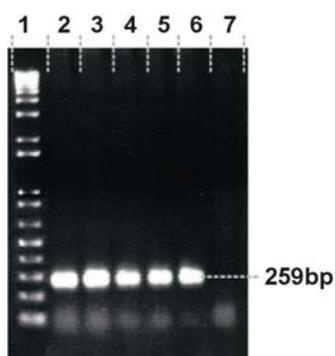


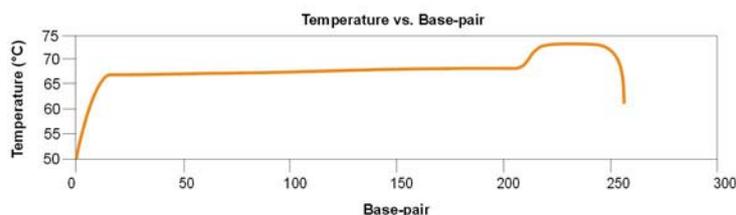
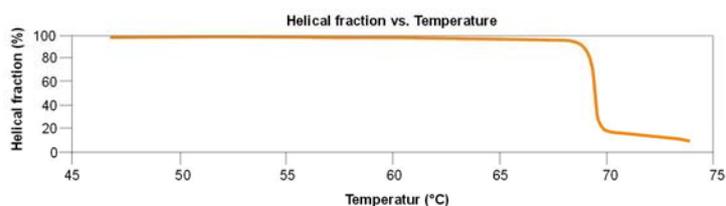
Abbildung 13

a, Bedingungen für die DGGE-ApoE-PCR. Optimale Ergebnisse wurden hier durch eine sog. Touch-Down-PCR erzielt, bei der die Annealingphase bei drei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt wird.

b, Sequenzen der Primer für die DGGE: Am 5'-Ende des ApoE-Reverse Primers befindet sich der 40bp lange GC-clamp.

c, Auftrennung verschiedener ApoE-PCR-Produkte auf einem Agarosegel, (1) 100kb+ DNA-Längenstandard, (2)-(6) PCR-Produkte unterschiedlicher Probanden mit deutlicher Bande bei 259bp, (7) Negativkontrolle

Das mit der MacMelt® Software erstellte Schmelzprofil für die amplifizierte DNA-Sequenz ist in Abbildung 14 zu sehen. Dem Schmelzprofil nach erwartet man ein Aufschmelzen des Doppelstranges im Bereich von 70°C.

a**b****Abbildung 14**

Die MacMelt® Software erstellt anhand der eingegebenen DNA-Sequenz des ApoE PCR-Produkts ein Schmelzprofil über das zu erwartende Aufschmelzen des Doppelstranges im denaturierenden Milieu.

a, Dargestellt ist das sequenzabhängige Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges, also welcher Bereich des Strangs bei welcher spez. T aufschmilzt. Der GC-clamp am Ende hat die höchste Schmelz- bzw. Denaturierungstemperatur.

b, Verhältnis von doppelsträngig vorliegender DNA bei Temperaturen von 45-75°C°, leider schmilzt der DNA-Strang größtenteils in einem sehr engen Bereich um 70°C auf.

Es wurde zuerst versucht, mit einem 30%-100%igen Perpendikulargel den Schmelzbereich experimentell zu überprüfen und genau zu bestimmen. Dabei zeigte sich nur ein undeutliches Aufschmelzen der DNA-Banden (Abb. 15).

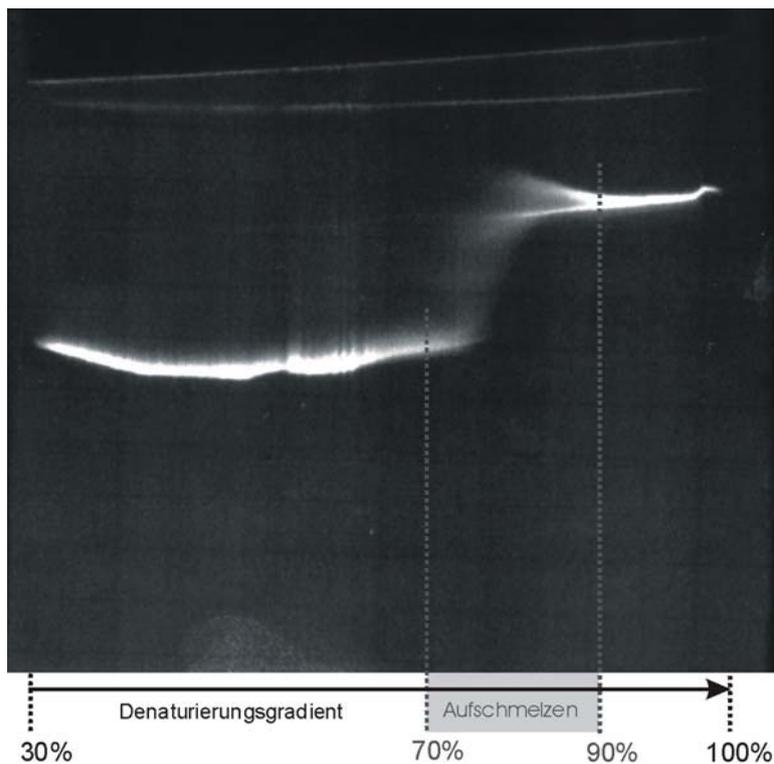


Abbildung 15

Ein 6% Perpendikulargel mit einem horizontalen Denaturierungsgradienten von 30-100%. Es wurden 30 μ l PCR-Produkt einer heterozygoten Person (ApoE 2/3) über die gesamte Breite des Gels aufgetragen. Die Laufzeit betrug 3h. Im Denaturierungsbereich von 70-90% schmilzt die DNA-Bande auf.

Der Denaturierungsbereich wurde deshalb weiter eingeschränkt. Bei einem denaturierenden Milieu von 70-90% ließ sich eine Trennung durch Aufschmelzen erkennen (Abb.16).

Die anschließenden Versuche, die PCR-Produkte auf einem Travelgel aufzutrennen, waren trotz mehrmaliger Variation der verschiedenen Gelkomponenten (Acrylamidgehalt, Harnstoffgehalt) nicht zufriedenstellend. Es zeigte sich zwar ein Aufschmelzen der Banden, einzelne Genotypen der sechs möglichen Allelkombinationen konnten aber nicht sicher bestimmt werden (Abb.17). Somit wurde die DGGE als Methode zur Bestimmung des jeweiligen Allelstatus an den 753 DNA-Proben ausgeschlossen.

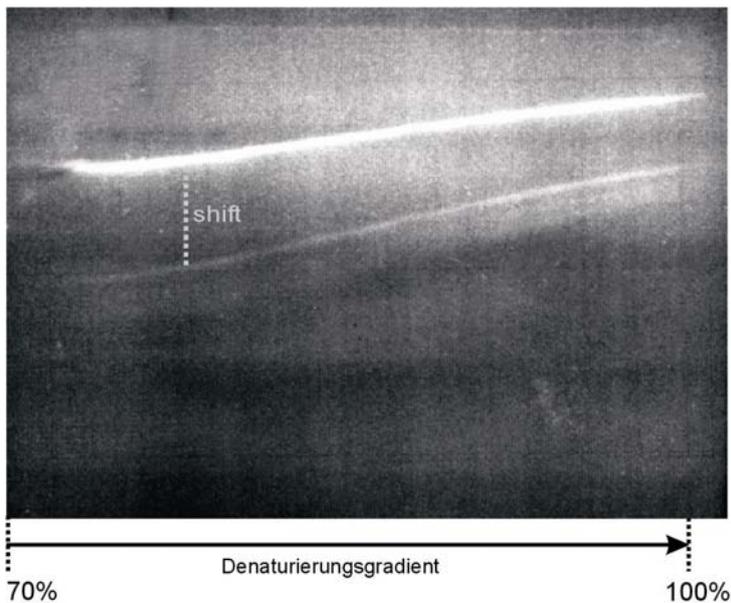


Abbildung 16

Ein Perpendikulargel mit einem enger gefasstem horizontalen Denaturierungsgradienten von 70-100% und einem PAA-Gradienten von 4-6%

Es wurden 30 µl PCR-Produkt einer heterozygoten Person (ApoE 2/3) aufgetragen. Die Laufzeit betrug 2h. Über die gesamte Breite des Gels ist ein deutliches Aufschmelzen der DNA-Bande sichtbar, ein so genannter "Shift".

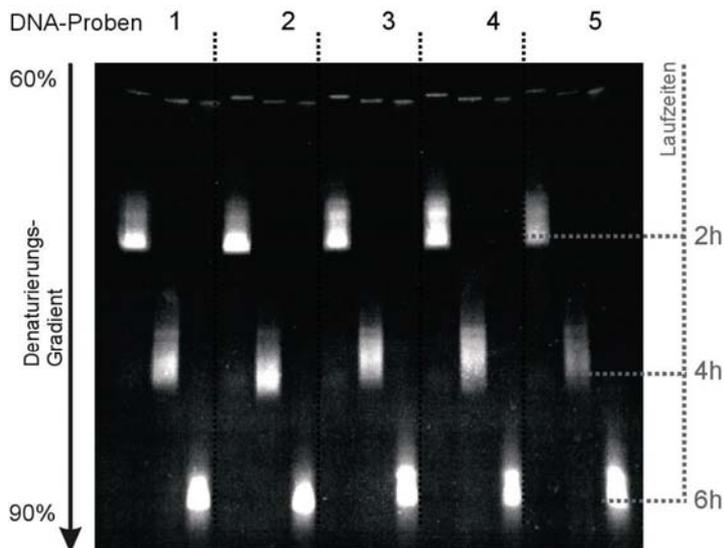


Abbildung 17

Beispiel für ein Travelgel: Es wurden fünf verschiedene DNA-Proben aufgetragen, jede dreimal im Abstand von je 2h. Der Denaturierungsgradient wurde von 60-90% gewählt. Nach einer Laufzeit von 4h schmelzen die Banden auf, differenzierte Banden sind jedoch nicht zu erkennen.

3.1.3 SSCP

Gleichzeitig zur Erprobung der DGGE wurde auch versucht, die ApoE-Genotypen mittels SSCP zu bestimmen. Mit den bereits erwähnten Primern ApoE-forward und Apo-E-reverse wurde eine PCR mit radioaktiv markierten Nukleotiden durchgeführt. Abbildung 18 zeigt das Ergebnis der SSCP, das eine eindeutige Unterscheidung der einzelnen Genotypen nicht ausreichend zulässt und somit für eine schnelle Analyse aller DNA-Proben ungeeignet ist. Deshalb wurde auf die Bestimmung des Allelstatus mittels SSCP ebenfalls verzichtet.

Abbildung 18



Beispiel für eine SSCP-Analyse der 6 verschiedenen ApoE-Polymorphismen. Es handelt sich hierbei um ein SSCP-Gel ohne Glycerolzusatz.

Die Proben wurden bei 100°C denaturiert, sofort auf Eis inkubiert und anschließend auf des Gel aufgetragen. Die Laufzeit betrug 220 Min bei einer Temperatur von 4°C.

In der ersten Tasche (1) läuft zur Kontrolle doppelsträngige DNA. Die Taschen (2) bis (7) enthalten in Reihenfolge radioaktiv markierte PCR-Produkte der bekannten Genotypen ApoE 2/2, 3/3, 4/4, 2/3, 2/4, 3/4.

Das Gel wurde getrocknet und für 3d bei 80°C auf einem Röntgenfilm exponiert. Die Banden zeigen zwar unterschiedliches Laufverhalten, z.B. ein Bandenshift in (6) und (7), eine wirklich eindeutige Identifizierung 6 unterschiedlicher Genotypen ist jedoch nicht sicher möglich.

3.1.4 Enzymatische Restriktionsspaltung

Nachdem die ApoE-Polymorphismen im Exon 4 mittels der erprobten Methoden DGGE und SSCP nicht zufriedenstellend nachgewiesen werden konnten, wurde für die Analyse der Genotypen die Spaltung durch Restriktionsenzyme gewählt. Die untersuchten Polymorphismen stellen Punktmutationen von C nach T

bzw. T nach C dar und liegen in Codon 112 und 158 an den jeweils ersten Positionen des Codons (3745 und 3883) (Weisgraber et al., 1988). Durch die Mutation T nach C codieren die Codons anstatt für Cystein (TGC) für Arginin (CGC), führen also zu einem Aminosäureaustausch, der aber laut bisheriger Publikationen keine Auswirkung auf die Funktion des Proteins hat. Die Polymorphismen werden als Cys112-to-Arg112 und Arg 158-to- Cys bezeichnet. Das am häufigsten vorkommende Wildtyp-Allel ApoE-ε3 trägt an Position 112 der Polypeptidkette ein Cystein und an Position 158 ein Arginin. Dies wird definitionsgemäß als Cys112-Arg158 angegeben. Je nach Allel befinden sich an den Positionen 112 oder 158 spezifische Schnittstellen für das Restriktionsenzym *CfOI* und dessen Isoenzym *Hhal* immer dort, wo ein Cystein durch ein Arginin ausgetauscht wurde. *CfOI* und *Hhal* spalten spezifisch die DNA-Sequenz GC[↓]GC. Beispielsweise schneiden die Enzyme das Wildtyp-Allel ApoE-ε3 an Position 158, nicht aber an Position 112. Abbildung 19 zeigt detailliert diese polymorphen Restriktionsschnittstellen der drei Allele.

Verdaut man nun die ApoE PCR-Produkte mit *Hhal*, entstehen je nach Allel spezifische Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge. Neben den variablen Schnittstellen der drei Allele existieren noch 4 weitere, nicht polymorphe Schnittstellen, so dass jeder Genotyp nach dem Verdau zwischen 8 und 12 Fragmente aufweist (Abb.20).

Für den Restriktionsverdau wurde ein 25 µl Ansatz aus 10 µl PCR-Produkt, 0,5 µl *Hhal*, 2,5 µl 10xReaktionspuffer und 12 µl H₂O hergestellt und für 3h bei 37 C° inkubiert.

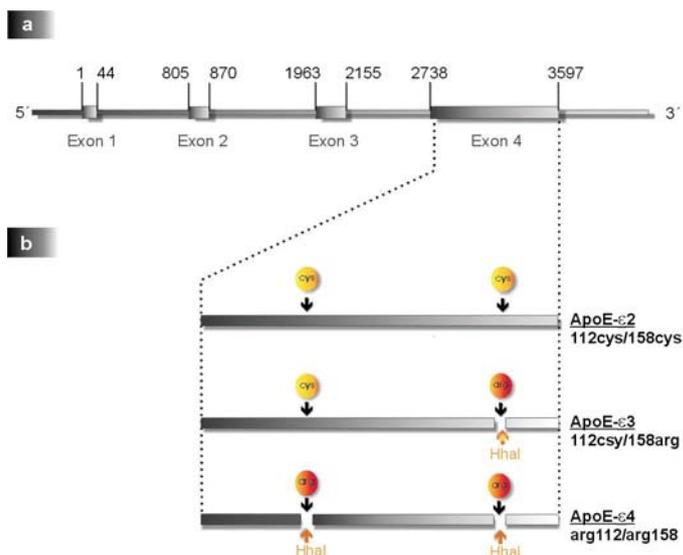


Abbildung 19

a, Exon-Intron-Struktur des APOE, die beiden untersuchten Polymorphismen liegen an Position 112 und 158 im Exon 4.

b,
 ApoE-ε2 ist als 112cys/158cys,
 ApoE-ε3 als 112cys/158arg,
 ApoE-ε4 als 112arg/158arg festgelegt.

Durch Punktmutation T nach C erfolgt ein AS-Austausch (arg statt cys), damit ergibt sich eine neue Restriktionsschnittstelle für *HhaI*.

3.1.5 Auftrennung der verdauten PCR-Produkte

Trennt man die verdauten PCR-Produkte nun auf einem Polyacrylamidgel durch Gel-Elektrophorese auf, erhält man ein für den jeweiligen Genotyp spezifisches Muster von Restriktionsfragmenten unterschiedlicher Größe, das in Abbildung 20 schematisch dargestellt wurde. Für die Auftrennung wurden 20%ige Polyacrylamidgelle verwendet. Von den verdauten Produkten wurden jeweils 4µl mit 1µl Laufpuffer vermischt und in die Geltaschen geladen. Auf einem großen Gel (40x35 cm) wurden insgesamt 40 verdaute PCR-Produkte aufgetragen. Die Laufzeit betrug 90 Min. bei 75W. Zur Bestimmung der Größe der DNA-Banden lief 3µl einer 10bp DNA-Leiter als Längenstandard mit. Anschließend wurde das

Gel in einem 2%igen Ethidiumbromidbad für 20 Minuten eingefärbt und danach unter dem UV-Schirm zur Dokumentation fotografiert.

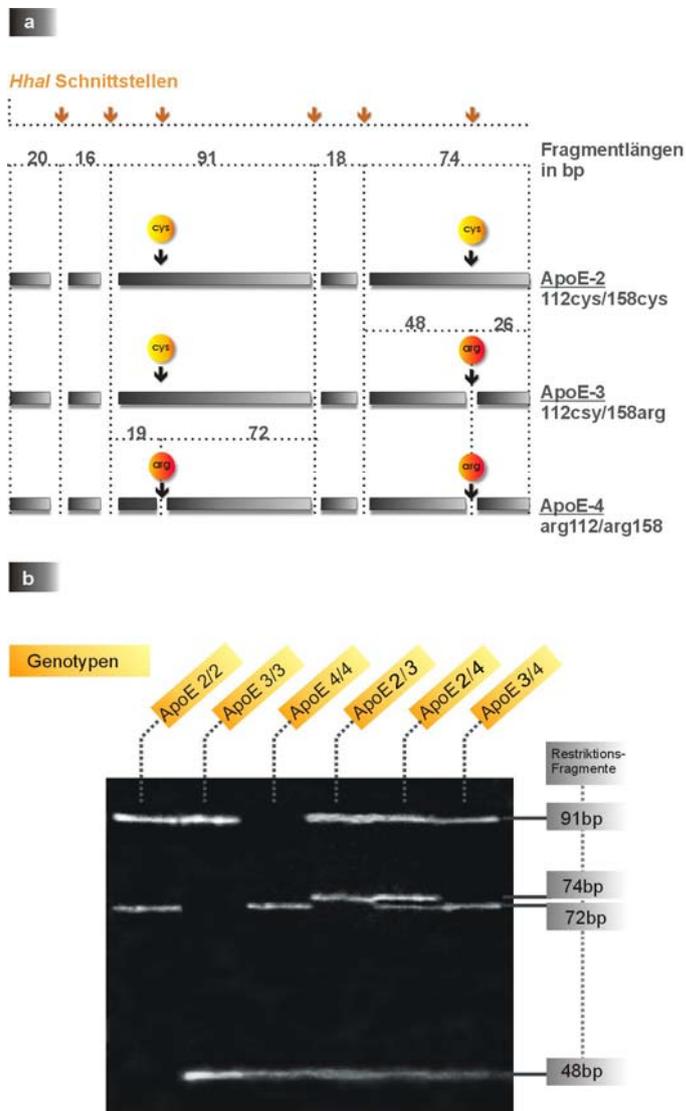


Abbildung 20

a, Übersicht über die allelspezifischen *Hha*I-Schnittstellen und die bei Restriktionsverdau entstehenden Fragmente
b, Auftrennung der Restriktionsfragmente aller sechs Genotypen

3.1.6 Bestimmung der unterschiedlichen Genotypen

Abbildung 20 zeigt die Auftrennung mit dem spezifischen Bandenmuster für die 6 möglichen Genotypen. Anhand des Bandenmusters konnten die Genotypen aller 400 Patienten und 353 Kontrollpersonen bestimmt werden. Bei nicht eindeutigen Ergebnissen wurden PCR, Verdau und Gelelektrophorese erneut durchgeführt. Zur Überprüfung wurden die 6 unterschiedlichen Bandenmuster noch sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte die durch Verdau und Auftrennung ermittelten Genotypen.

Insgesamt wurden die Genotypen für APOE an 400 AMD-Patienten und 353 Kontrollpersonen bestimmt. Abbildung 21 gibt ein Beispiel für die Auftrennung der verdauten PCR-Produkte der DNA-Proben auf einem Polyacrylamidgel.

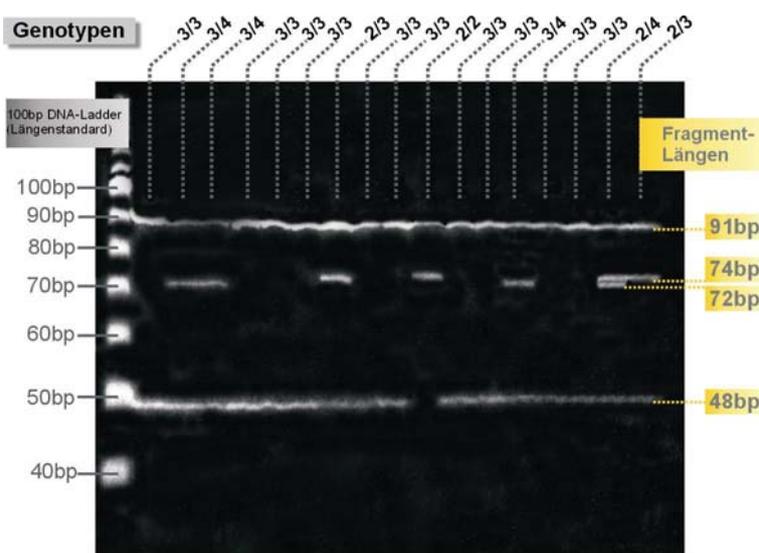


Abbildung 21

Beispiel für die Auftrennung der *HhaI* verdauten ApoE-PCR-Produkte. Die Auftrennung erfolgt auf einem 20%igen PAA-Gel bei einer Laufzeit von 100 Min bei 75 W. Die jeweiligen Genotypen ergeben sich aus der Kombination unterschiedlich langer DNA-Fragmente, die man durch den Vergleich mit dem DNA-Längenstandard bestimmt.

3.1.7 Auswertung der Allelhäufigkeiten

Für die APOE-Genotypen und die Häufigkeit der Allele zeigten sich zwischen Patienten- und Kontrollgruppen nur geringe, nicht signifikante Unterschiede. Es wurden sowohl die Häufigkeit der einzelnen Genotypen APOE 2/2, 3/3, 4/4, 2/3, 2/4, 3/4 als auch die Frequenz der Allele ApoE- ϵ 2, ApoE- ϵ 3 und ApoE- ϵ 4 in den unterschiedlichen Gruppen statistisch ausgewertet. Hierfür wurde das Statistikprogramm SPSS verwendet. Für die Häufigkeit der einzelnen Allele sowie der Häufigkeit der 6 unterschiedlichen Allelkombinationen innerhalb der Gruppen wurde der χ^2 -Test, oder auch „Test nach Pearson“, angewendet. Bei sehr kleinen Werten, beispielsweise beim Genotyp ApoE 2/2 mit sehr geringer Häufigkeit, wurde der exakte Test nach Fischer angewendet.

Die Gesamtsumme der Allele und Genotypen, sowie die prozentuale Verteilung sind in der Tabelle 6 für alle untersuchten Gruppen dargestellt. Die Tabellen 7-11 zeigen die Ergebnisse der statistischen Auswertungen.

Beim Vergleich der Allelfrequenzen und Häufigkeit der Genotypen zwischen der Patientengruppe und der Gruppe der altersgemäßen Kontrollen zeigten sich keinerlei signifikanten Unterschiede (Tabelle 8). Der Vergleich der Patientengruppe mit der die Normalbevölkerung repräsentierenden Kontrollgruppe (Tabelle 9) weist signifikante Unterschiede in der Verteilung des Allels ApoE- ϵ 4 auf. In der Patientengruppe tritt das Allel ApoE- ϵ 4 mit einer Häufigkeit von 0,09 auf, bei der Normalbevölkerung dagegen beträgt die Häufigkeit des Allels ApoE- ϵ 4 0,16. Hierbei handelt es sich um signifikante Unterschiede: Der χ^2 -Wert für den Vergleich der Häufigkeit des ApoE- ϵ 4 liegt bei 14,3 und ist damit hoch signifikant. Allerdings ergeben sich diese signifikanten Schwankungen in der Häufigkeit des Allels und des Genotyps ebenfalls, wenn man die Kontrollgruppe der Altersgemäßen mit der Kontrollgruppe „Normalbevölkerung“ vergleicht (Tabelle 10). Es ließen sich somit keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe der AMD-Patienten und den Kontrollgruppen nachweisen, sondern eigentlich nur eine signifikant unterschiedliche Verteilung des ApoE- ϵ 4-Allels im Hinblick auf das Durchschnittsalter der Gruppen. ApoE- ϵ 4 kommt in den Gruppen mit

hohem Durchschnittsalter deutlich seltener vor als in der Gruppe der Normalbevölkerung mit geringerem Altersdurchschnitt.

ApoE Genotypen	Patienten (n=400)		Kontrollgruppen (n=353)			
	absolut	Frequenz %	age-matched (n=153)		Allgemeinbevölkerung (n=200)	
			absolut	Frequenz %	absolut	Frequenz %
ε 2/ε 2	5	1,25	0		0	
ε 2/ε 3	72	18,0	31	20,26	26	13,0
ε 2/ε 4	21	5,25	9	5,88	12	6,0
ε 3/ε 3	249	62,25	94	61,44	107	53,5
ε 3/ε 4	51	12,75	19	12,42	54	27,0
ε 4/ε 4	2	0,5	0		1	0,5
ApoE Allele						
ε 2	103	12,88	40	13,07	38	9,5
ε 3	621	77,62	237	77,45	296	74,0
ε 4	76	9,5	29	9,48	66	16,5

Tabelle 6

Übersicht über die absoluten und relativen Häufigkeiten der ApoE-Allele und die Verteilung der Genotypen innerhalb der Gruppen

a

	Allel			Gesamt
	ApoE-ε2	ApoE-ε3	ApoE-ε4	
AMD-Patienten	103	621	76	800
Kontrollen	78	533	95	706
Gesamt	181	1156	171	1506

b

	Wert	Freiheitsgrad	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	6,486	2	0,39
Likelihood-Quotient	6,478	2	0,39
Zusammenhang linear-mit linear	3,146	1	0,76
Anzahl gültiger Fälle	1506		

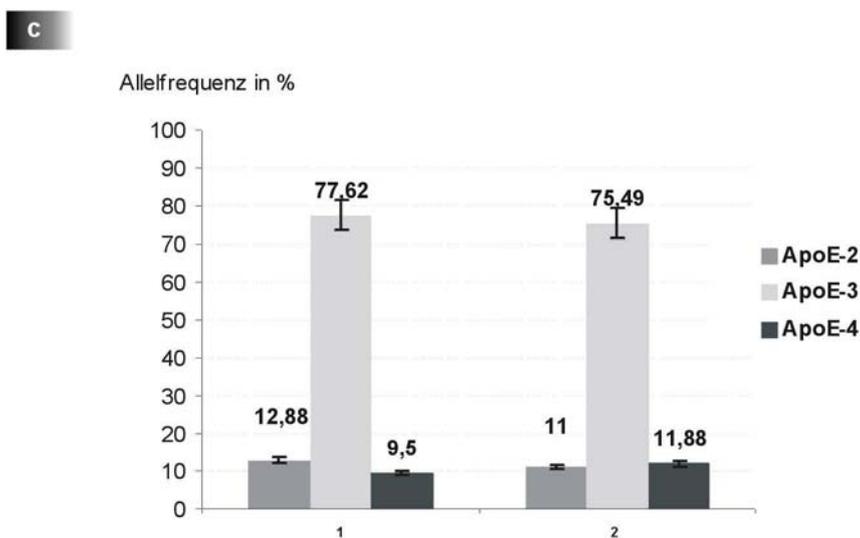


Tabelle 7

a, Kreuztabelle für die Auswertung der Häufigkeit der drei ApoE-Allele in der Gruppe der AMD-Patienten verglichen mit der gesamten Kontrollgruppe.

b, Ergebnisse der statistischen Auswertung. Der Chi-Quadrat-Wert ist mit 6,486 signifikant.

c, Das Diagramm zeigt die prozentuale Verteilung (y-Achse) der ApoE-Allele innerhalb der Gruppen: 1=AMD-Patienten, 2=Kontrollen gesamt (x-Achse)

a	Allel			Gesamt
	ApoE-ε2	ApoE-ε3	ApoE-ε4	
AMD-Patienten	103	621	76	800
age-matched K.	40	237	29	306
Gesamt	143	858	105	1106

b	Wert	Freiheitsgrad	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	0,005	2	0,998
Likelihood-Quotient	0,005	2	0,998
Zusammenhang linear-mit linear	0,000	1	0,998
Anzahl gültiger Fälle	1106		

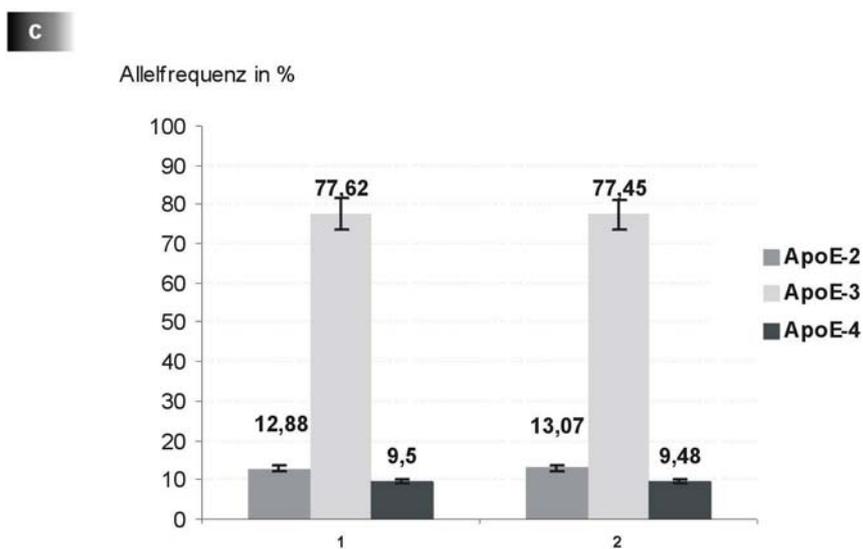


Tabelle 8

a, Kreuztabelle für die Auswertung der Häufigkeit der drei ApoE-Allele in der Gruppe der AMD-Patienten verglichen mit der Gruppe der altersgemäßen Kontrollen (age-matched)

b, Ergebnisse der statistischen Auswertung. Der Chi-Quadrat-Wert ist mit 0,005 nicht signifikant. Keines der ApoE-Allele tritt in der Patientengruppe im Vergleich zu den altersgemäßen Kontrollen ohne AMD-Anzeichen in signifikant höherer oder niedrigerer Frequenz auf.

c, Das Diagramm zeigt die prozentuale Verteilung (y-Achse) der ApoE-Allele innerhalb der Gruppen: 1=AMD-Patienten, 2=age-matched Kontrollen (x-Achse)

a	Allel			Gesamt
	ApoE-ε2	ApoE-ε3	ApoE-ε4	
AMD-Patienten	103	621	76	800
Allgemeinbevölk.	38	296	66	400
Gesamt	141	917	142	1200

b	Wert	Freiheitsgrad	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	14,316	2	0,001
Likelihood-Quotient	13,837	2	0,001
Zusammenhang linear-mit linear	6,807	1	0,009
Anzahl gültiger Fälle	1200		

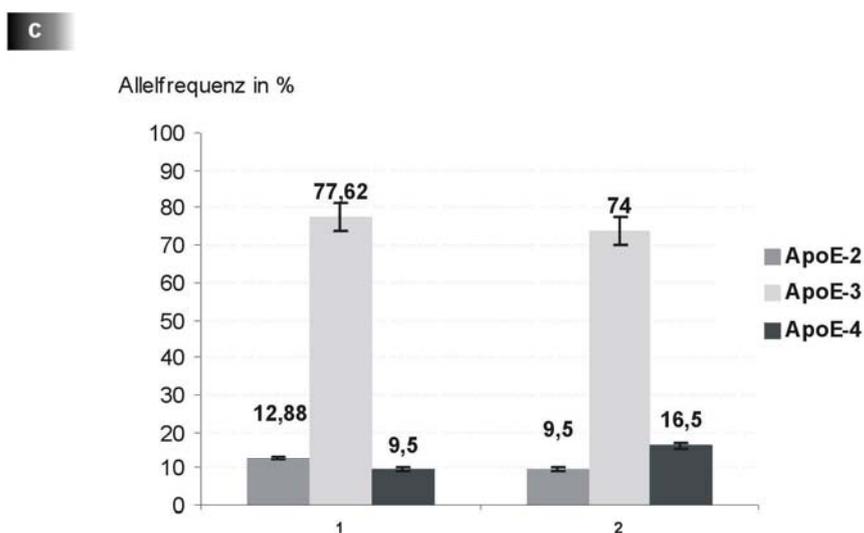


Tabelle 9

a, Kreuztabelle für die Auswertung der Häufigkeit der drei ApoE-Allele in der Gruppe der AMD-Patienten verglichen mit der Gruppe "Allgemeinbevölkerung".

b, Ergebnisse der statistischen Auswertung. Der Chi-Quadrat-Wert ist mit 14,316 deutlich signifikant.

c, Das Diagramm zeigt die prozentuale Verteilung (y-Achse) der ApoE-Allele innerhalb der Gruppen: 1=AMD-Patienten, 2=Kontrollen Allgemeinbevölkerung (x-Achse)

a	Allel			Gesamt
	ApoE-ε2	ApoE-ε3	ApoE-ε4	
age-matched	40	237	29	306
Allgemeinbevöl.	38	296	66	400
Gesamt	78	533	95	706

b	Wert	Freiheitsgrad	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	8,807	2	0,012
Likelihood-Quotient	9,031	2	0,011
Zusammenhang linear-mit linear	4,079	1	0,43
Anzahl gültiger Fälle	706		

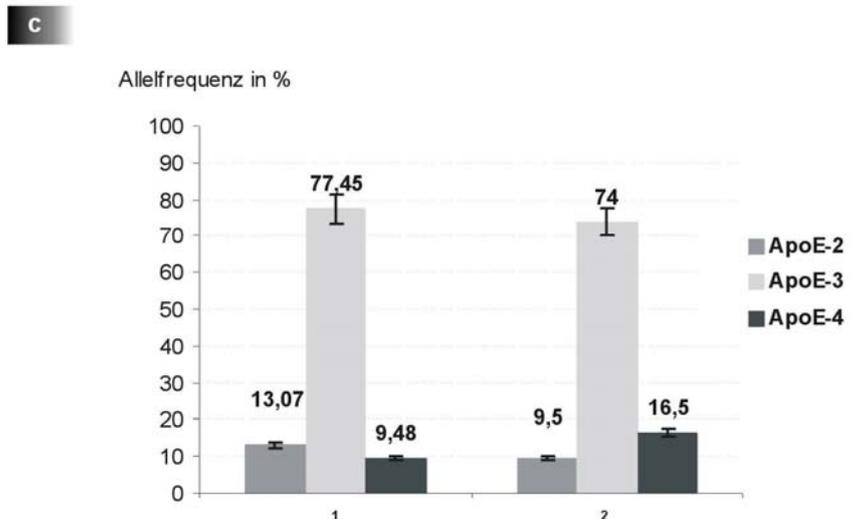


Tabelle 10

a, Kreuztabelle für die Auswertung der Häufigkeit der drei ApoE-Allele in der Gruppe der altersgemäßen Kontrollen (age-matched controls) verglichen mit der Gruppe "Allgemeinbevölkerung"

b, Ergebnisse der statistischen Auswertung: Der Chi-Quadrat-Wert ist mit 8,807 deutlich signifikant.

c, Das Diagramm zeigt die prozentuale Verteilung (y-Achse) der ApoE-Allele innerhalb der Gruppen: 1=age-matched Kontrollen, 2=Allgemeinbevölkerung (x-Achse).

Das ApoE-ε4-Allel kommt in der Gruppe der altersgemäßen Kontrollen in signifikant geringerer Frequenz vor als in der Gruppe "Allgemeinbevölkerung" (9,48% vs. 16,5%; $\chi^2=8,8$).

a

	Genotyp						Gesamt
	$\epsilon 2/\epsilon 2$	$\epsilon 3/\epsilon 3$	$\epsilon 4/\epsilon 4$	$\epsilon 2/\epsilon 3$	$\epsilon 2/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 4$	
AMD-Patienten	5	249	2	72	21	51	400
Kontrollen	0	201	1	57	21	73	353
Gesamt	5	450	3	129	42	124	753

b

	Wert	Freiheitsgrad	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	13,303	5	0,021
Likelihood-Quotient	15,220	5	0,009
Zusammenhang linear-mit linear	5,794	1	0,016
Anzahl gültiger Fälle	753		

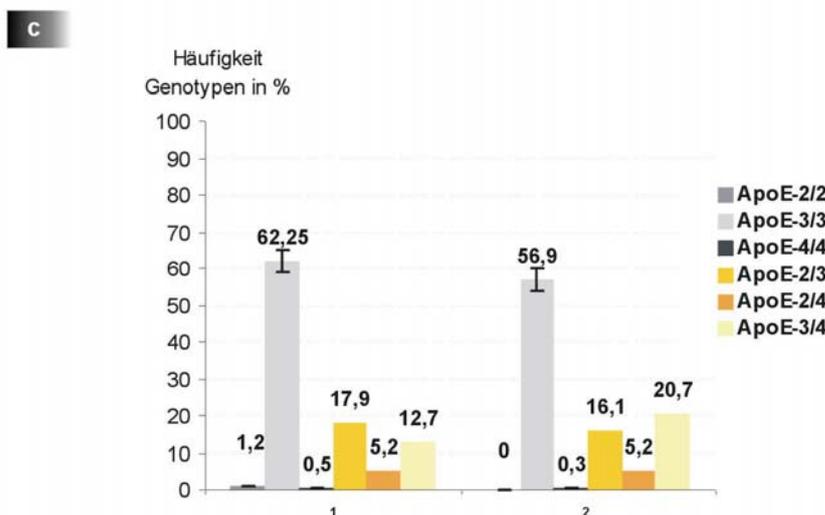


Tabelle 11

a, Kreuztabelle für die Auswertung der Häufigkeit der sechs möglichen Genotypen in der Gruppe der AMD-Patienten verglichen mit der gesamten Kontrollgruppe.

b, Die Tabelle zeigt das Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests, der mit einem Wert von 13,303 signifikant ist.

c, Das Diagramm zeigt die prozentuale Verteilung (y-Achse) der ApoE-Genotypen innerhalb der Gruppen: 1=AMD-Patienten, 2=Kontrollen gesamt (x-Achse). Auffällig hierbei ist die leicht erhöhte Frequenz des Genotyps ApoE- $\epsilon 3/\epsilon 4$ in der Kontrollgruppe von 20,7 vs. 12,7 in der Patientengruppe.

3.2 Analyse der Alpha-2-Makroglobulin Allelhäufigkeiten

Parallel zur Bestimmung der ApoE-Allelfrequenzen wurden an den untersuchten Gruppen auch die Bestimmung der Häufigkeiten der beiden Allele A2M-1 und A2M-2 des Alpha-2-Makroglobulins durchgeführt.

3.2.1 PCR-Amplifikation des A2M Polymorphismus

Grundlage für die Bestimmung der Allelverteilungen von A2M-1 und A2M-2 war die Amplifikation des genomischen Abschnitts, der den Deletions-Insertions-Polymorphismus enthält. Die Lage der Primer wurde in Anlehnung an eine Publikation von Dow et al. (1999) gewählt (Abb.22).

Wie schon für die PCR des ApoE-Polymorphismus beschrieben, wurden auch bei den Primern A2M-Forward und A2M-Reverse mittels GeneRunner® die Lage und Sequenzen hinsichtlich ihrer Eignung (gleiche T_A und Ausschluss palindromer Sequenzen) überprüft und die T_A berechnet. Bei der Optimierung in Test-PCRs ergab sich eine optimale T_A von 54 °C, eine Zyklenzahl von 33 und die Zugabe von 1 µl Formamid pro 25 µl PCR-Ansatz. Die PCR-Produkte zeigten bei der Agarose-Gelelektrophorese eine Bande in der zu erwartenden Größe von 138bp (Abbildung 23).

a**Intron 17/Exon 18 (115bp):**

...ggttttttttttgggtggcaactattaca(A2M_Forward)**ttctctcataagctttatctgtatg**tttattgt
aatgtcttctcactc**ACCAT**agAGTCAGATGTAATGGGAAGAGGCCATGCAC
GCCTGGTGCATGTTGAAGAGCCTCAC**CGGAGACCGTACGAAAGTACT**
T(A2M_Reverse)CCCTGAGACATGGATCTGGGATTTGGTGGTGGTAAA

b**Primer A2M-Forward: 5'-TTCTCTCATAAGCTTTATCTGTATG-3'****Primer A2M-Reverse: 5'-AAGTACTTTCGTACGGTCTCCG-3'****Abbildung 22**

a, Lage der A2M-Primer am 5'-splice-Ende des Exons 18. Die Primer rahmen den untersuchten Polymorphismus (ACCAT hervorgehoben) ein. Das PCR-Produkt hat eine Länge von 138bp.

b, Primersequenzen A2M-Forward und A2M-Reverse

a	Endkonzentration	Volumen
ddH ₂ O		add 25µl
10x Reaktionspuffer (15 mM MgCl ₂)	1x	2,5µl
Formamid 100%	4%	1,0µl
dNTPs (je 1,25 mM)	100µM	2,0µl
A2M-Forward-Primer (10 pmol/µl)	10 pmol	1,0µl
A2M-Reverse-Primer (10 pmol/µl)	10 pmol	1,0µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	1U	0,2µl
DNA (ca. 100ng/µl)	100ng	1,0µl
Annealing bei 54°C, 33 Zyklen		

b

Längenstandard



Abbildung 23

a, Tabellarische Aufführung aller Komponenten für den Ansatz der PCR des A2M sowie die anhand von Test-PCRs ermittelten optimalen PCR-Bedingungen für die Amplifizierung der Zielsequenz.

b, A2M-PCR-Produkte nach Auftrennung auf Agarosegel: die Bande bei 138bp entspricht dem erwarteten PCR-Produkt.

3.2.2 Auftrennung der PCR-Produkte auf Polyacrylamidgelen

Wie bereits erwähnt handelt es sich bei dem untersuchten Polymorphismus des A2M um einen Insertions-Deletions-Polymorphismus am 5'-Splice-Ende des Exons 18, also in einer nicht kodierenden Region. Das häufigere Allel A2M-1 enthält die Sequenz 5'-cggag-3', die dem selteneren Allel A2M-2 fehlt. Folglich sind PCR-Produkte unterschiedlicher Allele in ihrer Länge verschieden. Dieser Basenunterschied von 5bp lässt sich sehr einfach durch Auftrennung des PCR-Produkts auf einem Polyacrylamidgel detektieren.

Hierfür wurden 6%ige, nicht denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Die Laufzeit betrug 4 h bei 120 V. Nach 1 ½ h wurden erneut PCR-Produkte aufgetragen, wodurch das Gel zweimal genutzt wurde und sich somit das Arbeiten effizienter gestaltete. Insgesamt liefen pro Gel zweimal 19 Proben. Das Gel wurde anschließend für 20 Min. in einem 2% Ethidiumbromidbad gefärbt und dann unter dem UV-Schirm fotografiert (Abbildung 24a).

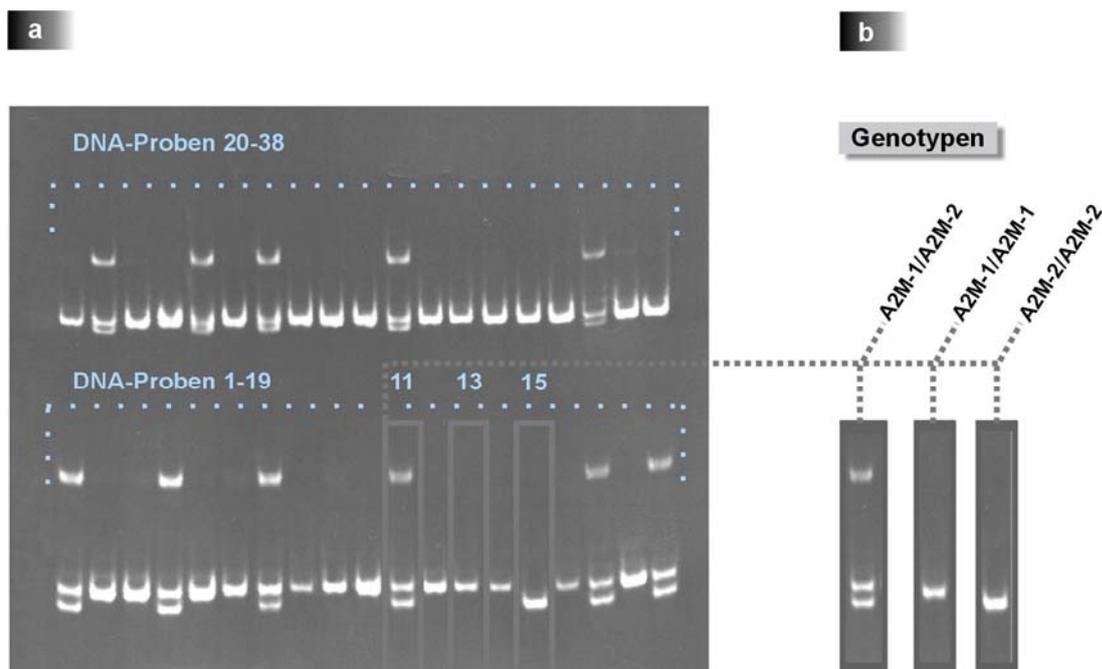


Abbildung 24

a, Auftrennung der A2M PCR-Produkte auf 6% igem Polyacrylamidgel bei 120 V. Es wurden insgesamt 38 DNA-Proben aufgetragen, die Laufzeit betrug 4h. 1½ h nach Laden der ersten 19 Proben wurde das Gel mit 19 weiteren Proben beladen. Person 11 ist heterozygot A2M-1/A2M-2, Person 13 homozygot für A2M-1 und Person 15 homozygot für die Deletion A2M-2.

b, Die drei möglichen Genotypen: Eine Auftrennung der DNA Bande erfolgt bei einer für A2M heterozygoten Person. DNA-Stränge mit A2M-2 Deletion sind um 5bp kürzer, wandern deshalb im Gel schneller und damit weiter. Die zusätzliche Bande bei allen Heterozygoten stellt ein Artefakt dar, das vermutlich durch Ausbildung von Heteroduplexen entsteht.

3.2.3 Bestimmung der unterschiedlichen Genotypen

Da sich die beiden Allele A2M-1 und A2M-2 durch einen Längenunterschied von 5bp auszeichnen, lässt sich der Allelstatus einer DNA-Probe leicht nach Auftrennung des PCR-Produkts anhand der Größe der DNA-Banden ermitteln. Homozygote Personen für A2M-1 zeigen eine Bande bei 138bp, homozygote Personen für A2M-2 eine im Gel weiter gelaufene Bande bei 133bp. Bei heterozygoten Personen A2M-1/A2M-2 sieht man nach Auftrennung zwei Banden, sowohl eine bei 138bp für das Allel A2M-1 als auch eine bei 133bp, die dem Allel A2M-2 entspricht. Die drei unterschiedlichen Genotypen lassen sich Abbildung 24b entnehmen. Bei allen heterozygoten Personen trat eine zusätzliche

Bande bei ca. 190bp auf, die vermutlich als Artefakt bei der Elektrophorese entsteht. Zur Überprüfung wurden die drei Muster der Auftrennung des A2M-PCR-Produkts sequenziert. Hierbei stimmten die durch Auftrennung ermittelten Genotypen mit der sequenzierten Basensequenz überein.

3.2.4 Auswertung der Allelfrequenzen

Die Analyse der A2M-Allelhäufigkeiten wurde ebenfalls an den beschriebenen Patienten (n=400) und Kontrollgruppen (n=353) durchgeführt. Wie bereits bei ApoE handelt es sich auch hier um die Häufigkeit eines Merkmals in unterschiedlichen Gruppen. Deshalb wurden die statistischen Auswertungen mit den bereits beschriebenen Tests der Software SPSS durchgeführt: dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson und bei kleinen Zahlen mit dem exakten Test nach Fischer.

Wie sich aus den Tabellen 12-14 entnehmen lässt, gab es weder für die Frequenz der einzelnen Allele, noch für die Häufigkeitsverteilung der Genotypen signifikante Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppen.

Die bei ApoE beschriebenen signifikanten Unterschiede zwischen Personen aus der Normalbevölkerung und Personen höheren Alters, egal ob AMD-Patienten oder Nicht-Betroffene, wurden bei A2M nicht beobachtet.

	Patienten (n=400)		Kontrollgruppen (n=353)			
	absolut	Frequenz %	age-matched (n=153)		Allgemeinbevölkerung (n=200)	
			absolut	Frequenz %	absolut	Frequenz %
A2M Genotypen						
A2M-1/1	273	68,25	96	62,75	145	72,5
A2M-1/2	125	31,25	55	35,95	49	24,5
A2M-2/2	2	0,50	2	1,3	6	3,0
A2M Allele						
A2M-1	671	83,88	247	80,72	339	84,75
A2M-2	129	16,12	59	19,28	61	15,25

Tabelle 12

Übersicht über die absoluten und relativen Häufigkeiten der A2M-Allele und die Verteilung der Genotypen innerhalb der Gruppen

	Allel		Gesamt
	A2M-1	A2M-2	
AMD-Patienten	671	129	800
Kontrollen	586	120	706
Gesamt	1257	249	1506

	Wert	Freiheitsgrad	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	0,207	1	0,649		
Kontinuitätskorrektur	0,148	1	0,700		
Likelihood-Quotient	0,207	1	0,649		
Exakter Test nach Fisher				0,677	0,350
Zusammenhang linear-mit linear	0,207	1	0,649		
Anzahl gültiger Fälle	1506				

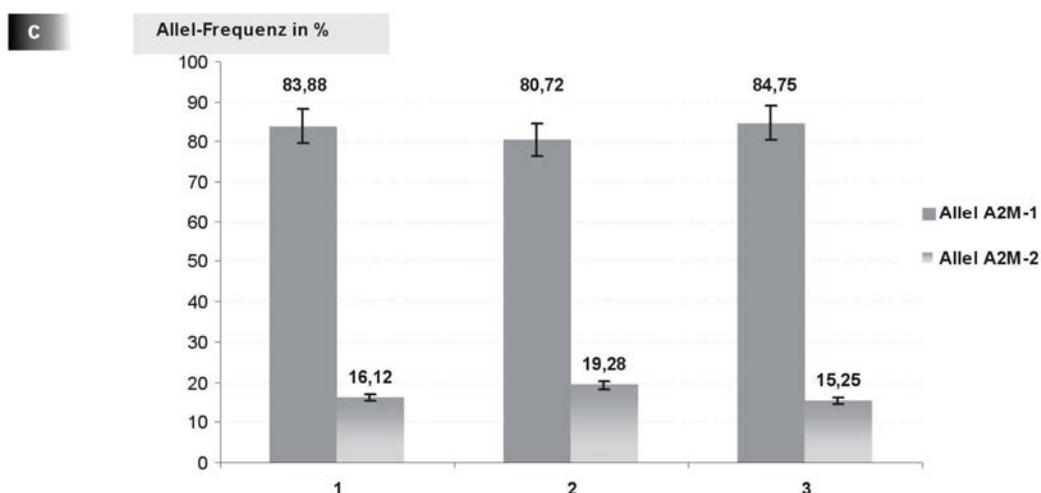


Tabelle 13

a, Kreuztabelle für die Auswertung der Häufigkeit der zwei A2M-Allele in der Gruppe der AMD-Patienten verglichen mit der gesamten Kontrollgruppe.

b, Ergebnisse der statistischen Auswertung. Der Chi-Quadrat-Wert ist mit 0,207 nicht signifikant. Außerdem sind weitere, von SPSS standardmäßig durchgeführte Testwerte angegeben, die ebenfalls keine Signifikanz aufweisen.

c, Das Diagramm zeigt die prozentuale Verteilung (y-Achse) der Allele innerhalb der drei Gruppen: 1=AMD-Patienten, 2=altersgemäße Kontrollen, 3=Normalbevölkerung (x-Achse)

a	Genotyp			Gesamt
	A2M-1/1	A2M-1/2	A2M-2/2	
AMD-Patienten	273	125	2	400
Kontrollen	241	104	8	353
Gesamt	514	229	10	753

b	Wert	Freiheitsgrad	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	4,602	2	0,100
Likelihood-Quotient	4,841	2	0,89
Zusammenhang linear-mit linear	0,230	1	0,632
Anzahl gültiger Fälle	753		

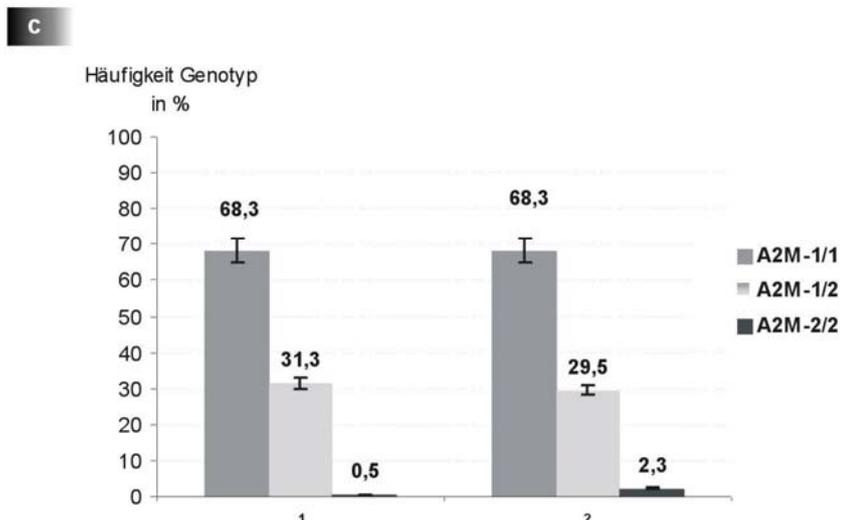


Tabelle 14

a, Kreuztabelle für die Auswertung der Häufigkeit der drei möglichen A2M-Genotypen in der Gruppe der AMD-Patienten verglichen mit der gesamten Kontrollgruppe.
 b, Ergebnisse der statistischen Auswertung. Der Chi-Quadrat-Wert ist mit 4,602 nicht signifikant.
 c, Das Diagramm zeigt die prozentuale Verteilung (y-Achse) der Genotypen innerhalb der Gruppen: 1=AMD-Patienten, 2=Kontrollen gesamt (x-Achse)

4 Diskussion

4.1 Studiendesign

4.1.1 Komplexität der AMD – Hinweise auf eine genetische Ursache

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung einer möglichen Assoziation von Varianten im ApoE- und A2M-Gen mit der AMD. Damit soll ein Beitrag zur Aufklärung der genetischen Ursachen der AMD geleistet werden. Bereits im einleitenden Kapitel wurde die Schwierigkeit eines solchen Unterfangens kurz angesprochen. Bereits die Annahme, bei AMD handele es sich um eine komplexe, von unterschiedlichen Pathogenitätsfaktoren beeinflusste Erkrankung, ist gegenwärtig hypothetisch.

Deshalb soll hier zuerst erörtert werden, welche Anhaltspunkte es überhaupt für eine genetische Ursache der AMD und damit auch ihrer Komplexität gibt. Ein erster Anhaltspunkt für eine genetische Ursache ist der Nachweis einer erhöhten Prävalenz bei verwandten Individuen. AMD-Studien zur Prävalenz der Erkrankung innerhalb einer Population ergaben Unterschiede hinsichtlich verschiedener Rassen und ethnischen Gruppen. So ist beispielsweise ein schwerer Visusverlust häufiger bei Kaukasiern, Asiaten und Grönländern anzutreffen und seltener bei Afro-Amerikanern (Sommer et al., 1991).

Der erste Bericht über eine familiäre Häufung einer zentralen retinochoroidalen Erkrankung stammt aus dem Jahre 1876. Hutchinson beschrieb damals den Fall dreier Schwestern, die eine Erkrankungsfolge von gelbweißen Flecken über Hämorrhagien bis hin zu einer atrophischen Retinanarbe zeigten. Erst hundert Jahre später wurde dieser Aspekt einer familiären Häufung wiederentdeckt. 1983 beschreibt Hyman et al. eine erhöhte Prävalenz der AMD bei Verwandten von Erkrankten im Vergleich zu Verwandten von nicht erkrankten Kontrollpersonen. Inzwischen gibt es zahlreiche Hinweise auf eine genetische Komponente: Segregations-Analysen an verschiedenen Populationen wie die Beaver Dam Studie (Heiba et al., 1994) und die Framingham Studie (Ferris et al. 1983) sowie familiäre Aggregationsstudien wie die Rotterdam Eye Studie (Klaver et al.,

1998) und die Boston Studie (Seddon et al., 1997). Überzeugend sind auch die zur genetischen Grundlage der AMD durchgeführten Zwillingsstudien: Klein et al. (1994) fanden hohe Konkordanzraten bei monozygoten Zwillingen (100%, wenn CNV bei einem Zwilling und konfluierende Drusen bei dem anderen Zwilling ebenfalls als konkordant betrachtet werden). Interessant ist vor allem die Tatsache, dass die Konkordanzraten bei monozygoten Zwillingen deutlich über denen dizygoter Zwillinge liegen. Unklar bei Geschwister- und Zwillingsstudien ist noch immer der Einfluss von Umweltfaktoren, denen Geschwister meist in gleicher Weise ausgesetzt sind. Eine erhöhte Prävalenz der AMD bei Geschwistern könnte also durchaus auch durch gemeinsame exogene Risikofaktoren erklärt werden. Geht man aber davon aus, dass sowohl die monozygoten als auch die dizygoten Zwillinge dieser Studie etwa gleichen Umwelteinflüssen ausgesetzt waren, geben die Unterschiede in der Erkrankungskonkordanz einen deutlichen Hinweis auf eine genetische Grundlage.

Zwillingsstudien von Meyers et al. (1994; 1995) zeigten ähnliche Ergebnisse mit variabler Expression und unterschiedlichem Erkrankungsbeginn, wobei hier verschiedene Stadien der AMD untersucht wurden.

All diese Studien belegen, dass AMD eine Erkrankung mit einer deutlichen, wenn auch bisher unbekanntem genetischen Komponente ist.

4.1.2 Genetische Analyse der AMD

Ausgangspunkt einer genetischen Analyse sollten zuverlässig diagnostizierte Patientengruppen sein. Es ist nicht sicher, ob nicht unterschiedliche Formen der AMD auch unterschiedliche genetische Faktoren zur Ursache haben. Deshalb ist es sinnvoll, die Patientengruppe nach diagnostischen Kriterien möglichst einzugrenzen, beispielsweise nur AMD-Patienten zur Analyse heranziehen, die an der exsudativen Form der AMD erkrankt sind. Die Kontrollgruppe sollte idealerweise aus Individuen bestehen, die ein möglichst hohes Alter aufweisen und fundoskopisch keine Anzeichen einer AMD haben. Wegen des späten Krankheitsbeginns und einer eventuell unvollständigen Penetranz der AMD ist die Auswahl einer solchen Kontrollgruppe in der Praxis schwierig.

Die folgenden Abschnitte beschreiben die unterschiedlichen Methoden zur Suche nach genetischen Ursachen:

Parametrische Kopplungsanalysen (positional cloning approaches) suchen unter Annahme eines Vererbungsmodells nach einem genetischen Marker innerhalb einer Familie, der mit der Vererbung bzw. Erkrankung korreliert. Sie dienen somit der Identifikation von Krankheitsloci. Da für die Analyse entsprechend große Familien benötigt werden, ist diese Methode für die Untersuchung bei der AMD schwierig.

Nichtparametrische Kopplungsanalysen (allele-sharing-methods) suchen mittels Mikrosatellitenmarkern nach der gehäuften Vererbung chromosomaler Abschnitte (sog. „sharing“) bei erkrankten Verwandten, um so Rückschlüsse auf mögliche Genloci ziehen zu können. Hierfür ist kein Vererbungsmodell erforderlich und die Methode ist unabhängig von der Penetranz. Es ist jedoch eine große Anzahl von Familien und eine entsprechend große Kontrollpopulation notwendig. Solche genomweiten, para- und nichtparametrischen Kopplungsanalysen an AMD-Familien wurden bisher von Klein et al. (1998), Weeks et al. (2001), Majewski et al. (2003) und Iyengar et al. (2004) durchgeführt. Die dabei gefundenen Krankheitsloci stimmen teilweise miteinander überein, wie es beispielsweise für den Locus 1q25-31 der Fall ist, der von drei Studien identifiziert wurde (Klein et al. 1998, Weeks et al. 2001, Majewski et al. 2003). Andererseits fand jede Studie neue Loci, teilweise spezifisch in nur einer Familie auftretend – ein Hinweis auf die komplexen, genetischen Ursachen der AMD.

Die Kandidatenkopplungsanalyse (candidate linkage analysis) untersucht, ob zwischen einem vermuteten Krankheitslocus und der Erkrankung eine Assoziation besteht. Ansatzpunkte bieten hier beispielsweise die Loci erblicher Netzhautdegenerationen. Mit hochpolymorphen Mikrosatellitenmarkern, die sich in der Nähe eines bekannten chromosomalen Locus befinden, wird die Kandidatenkopplungsanalyse durchgeführt. Vor allem die Heterogenität der AMD stellt das Problem bei dieser Methode dar.

Die Kandidatengenanalyse erfordert die Charakterisierung eines spezifischen Krankheitsgens und vergleicht dann die Sequenz bei Patienten und Kontrollen. AMD-relevante Gene für die Kandidatenkopplungs- und Kandidatengenanalyse

sind die retinaspezifischen Gene ABCR, RPE 65 (Retinal pigment epithelium-specific protein 65kDa), TIMP-3 (Tissue inhibitor of metalloproteinases-3) und EFEMP-1 (Epithelium-growth-factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1).

Zu den interessanten nicht-retinaspezifischen Genen zählen das ApoE, A2M und CST3 (Cystatin-3) (OMIM-Datenbank unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Kritische Punkte sind wieder die Heterogenität der AMD und die sorgfältige Auswahl einer Kontrollgruppe. Selbst eine signifikante Assoziation ist aber bei dieser Methode noch kein Beweis einer Kausalität.

4.1.3 AMD und Alzheimer- gemeinsame Phänomene?

Speziell die sporadische Alzheimer-Erkrankung (AD), die im höheren Lebensalter auftritt (sog. Sporadic late-onset Alzheimer Disease), zeigt im Rahmen der Suche nach genetischen Ursachen Ähnlichkeiten zur AMD. Diese Parallelen wurden in Publikationen mehrfach diskutiert (Klaver et al., 1998; Anderson et al., 2001; Zurdel et al., 2002).

Bei beiden Erkrankungen spielen neurodegenerative Prozesse eine Rolle, histologische Ähnlichkeiten wurden in der Einleitung bereits kurz angesprochen. Die Schlüsselphänomene bei AD sind senile Plaques und Amyloidangiopathie. Die erkrankungstypischen Ablagerungen enthalten β -Amyloid, Mikroglia und Reste untergegangener Neurone, die ihrerseits wiederum zu neuronaler Dysfunktion und zu weiterem Zelluntergang führen (Giannakopoulos et al., 1997). Im Frühstadium der AMD lassen sich ebenfalls Ablagerungen in Form von Drusen innerhalb der verdickten Bruchmembran nachweisen, die ihren Ursprung in unvollständig abgebauten Bestandteilen der Neuroretina haben. Diese Ablagerungen führen zu einem Verlust von Photorezeptoren (Curcio et al., 1996). Bei der exsudativen Form der AMD finden sich Amyloidablagerungen in den subretinalen Neovaskularisationsmembranen. Das Amyloid findet sich im bindegewebigen Stroma dieser Membranen, steht offenbar nicht in Beziehung zu RPE-Zellen und deutet somit darauf hin, dass es sich – ähnlich wie bei der Amyloidangiopathie bei der AD – auch bei AMD um Ablagerungen handelt, die im

Rahmen einer lokalen Entzündungsreaktion entstehen und aus kleinen Gefäßen dieser CNV-Membranen stammen (Johnson et al., 2002).

Epidemiologische Untersuchungen legen sogar eine Komorbidität zwischen der Alzheimer Erkrankung und AMD nahe. In einer Studie von Klaver et al. im Rahmen der Rotterdam Eye Study (Klaver et al., 1999) wurden über 1400 Personen über 75 Jahre auf Zeichen von AD und AMD untersucht. Personen mit fortgeschrittener AMD hatten ein erhöhtes Risiko für beginnende AD mit einem relativen Risiko (odds ratio) von 2,1 (95%, CI 1,1-4,3). Nach Korrektur der Daten hinsichtlich der Risikofaktoren Rauchen und Arteriosklerose belief sich das relative Risiko immerhin noch auf 1,5 (95%, CI 0,6-3,5). Man könnte also vermuten, dass Personen, die eine AMD entwickeln, auch anfälliger für weitere neurodegenerative Erkrankungen sind.

Genetische Daten bei AD und AMD bezüglich des ApoE- ϵ 4-Allels in der Literatur ergeben allerdings ein widersprüchliches Bild. In den Studien von Klaver et al. sowie Souied et al. scheint das ApoE- ϵ 4 das Risiko, an AMD zu erkranken, zu senken. In den Gruppen von AMD-Patienten war die Häufigkeit des Allels signifikant geringer als in den Kontrollgruppen (bei Klaver et al. OD= 0,43, 95% CI 0,21-0,88; 0,073 vs 0,149, $p < 0,006$ bei Souied et al.). Beide Studien bezeichnen deshalb das ApoE- ϵ 4 als eine Art protektiven Faktor für AMD. Für die Alzheimer Erkrankung dagegen stellt das Allel einen gesicherten Risikofaktor dar, der sowohl das Risiko zu erkranken erhöht als auch dosisabhängig das Alter bei Erkrankungsbeginn beeinflusst. Homozygote Träger des ApoE- ϵ 4 erkranken früher und mit höherer Wahrscheinlichkeit als heterozygote, und diese wiederum wahrscheinlicher als Nichtträger (Tsai et al. 1994). Angesichts dieser Ergebnisse scheint es wenig wahrscheinlich, dass der APOE-Genotyp zu einer Assoziation von AMD und AD beiträgt.

Die Mechanismen jedenfalls, durch die ApoE beide Erkrankungen beeinflussen soll, sind nicht genau bekannt. Eine ApoE- ϵ 4 dosisabhängige Zunahme von Amyloidablagerungen bei der AD wurde beschrieben (Rebeck et al., 1993). Bei AMD nimmt man an, dass die ApoE-Isoformen einen Einfluss auf die Transportmechanismen durch die Bruch-Membran ausüben. ApoE- ϵ 4 zeichnet sich durch eine geringere Neigung zur Dimerbildung im Vergleich zu den anderen

ApoE-Isoformen aus. Somit bilden die an das ApoE- ϵ 4-Protein gebundenen Cholesterinester und ungesättigten Fettsäuren kleinere Lipidpartikel als die ApoE- ϵ 2- und ApoE- ϵ 3-Komplexe. Dies könnte beim Transport durch die Bruch-Membran von Vorteil sein und Ablagerungen epithelialer Zellreste und der Entstehung von Drusen vorbeugen (Souied et al., 1998). Stützend für diese Theorie sind auch die histologischen Nachweise von ApoE in spezifischen AMD-Ablagerungen im RPE, nämlich den basilar laminären Ablagerungen und den weichen Drusen. Harte Drusen dagegen, die als normale altersbedingte und somit AMD-unspezifische Veränderungen gelten, zeigen keine ApoE-Immunreaktivität (Klaver et al., 1998).

Die Überlegung, dass es aufgrund der Ähnlichkeiten von AD und AMD auch mögliche gemeinsame genetische Risikofaktoren gibt, bildete die Grundlage für die vorliegende Assoziationsstudie. Für das Apolipoprotein E existieren mittlerweile eine ganze Reihe von Studien, die eine Assoziation dieses Risikofaktors für Alzheimer mit der AMD untersuchen. Die Ergebnisse dieser Studien sind widersprüchlich. Diese Arbeit konnte die von Klaver et al. 1998 bzw. Souied et al. 1998 veröffentlichten Ergebnisse einer Assoziation mit der AMD nicht reproduzieren. Eine Untersuchung des A2M-Polymorphismus hinsichtlich eines genetischen Risikos für AMD wurde bislang nicht publiziert. Dass der in dieser Arbeit gewählte Ansatzpunkt theoretisch dennoch erfolgreich sein kann, beweist eine erst kürzlich erschienene Studie. Zurdel et al. (2002) fanden eine Assoziation von Allelvarianten des Cystatin C Gens CST3 mit der exsudativen Form der AMD. Einer der untersuchten Polymorphismen stellt ebenfalls einen Risikofaktor für die late-onset AD dar. Auch Zurdel et al. stellten im Vorfeld funktionelle Überlegungen an. Cystatin C ist ein Cysteinprotease-Inhibitor, der die Aktivität von Cathepsin S reguliert, einer Protease, die wiederum wichtige regulatorische Funktionen in Zellen des RPEs innehat.

Die Assoziation des CST3 mit der AD wurde leider erst nach dem Beenden des experimentellen Teils dieser Arbeit veröffentlicht. CST3-Polymorphismen waren zu Beginn der Arbeit auch noch nicht als AD-Risikofaktoren untersucht worden, so dass das Gen nicht in die Auswahl der möglichen AMD-Kandidatengene aufgenommen wurde. Diese neuen Ergebnisse zeigen jedoch, dass die gewähl-

te Vorgehensweise, nämlich genetische Risikofaktoren für AD auch bei AMD Patienten zu untersuchen, gerechtfertigt ist und wie im Falle des CST3 erfolgreich sein kann.

4.2 Methodenauswahl

4.2.1 Bestimmung des ApoE-Allelstatus

Wie bereits im Ergebnisteil erwähnt, wurden zur Bestimmung des ApoE-Allelstatus unterschiedliche Methoden getestet. Die zu Beginn der Studie getesteten Methoden der DGGE und der SSCP hätten den Vorteil geboten, dass neben den drei häufigen Polymorphismen ApoE- ϵ 2, ApoE- ϵ 3 und ApoE- ϵ 4 auch eventuell im untersuchten DNA-Abschnitt liegende seltene Polymorphismen aufgefallen wären. Da trotz Veränderung sämtlicher Variablen der Methoden die Auftrennungen der PCR-Produkte nicht zufriedenstellend zu erreichen waren, wurden sowohl die DGGE als auch die SSCP als Methoden zur Bestimmung des ApoE-Status als ungeeignet verworfen. In der Literatur finden sich auch keine Hinweise darauf, dass eine der beiden Methoden bisher zur Feststellung des ApoE-Allelstatus angewandt wurde. Eine mögliche Erklärung für das Nichtgelingen mag der hohe GC-Gehalt der untersuchten Sequenz sein. GC-reiche Sequenzen besitzen einen höheren Schmelzpunkt als GC-arme Sequenzen. Dies kann für die unzureichende Auftrennung der PCR-Produkte während der DGGE und SSCP verantwortlich sein.

Der ApoE-Allelstatus wurde bei allen untersuchten Personen mittels der gängigen Methoden der PCR, dem *Hha*I-Verdau und anschließender Auftrennung auf Polyacrylamidgelen bestimmt. Durch diese einfache und schnell durchführbare Methode konnte der ApoE-Allelstatus der 753 Studienprobanden zuverlässig festgestellt werden.

4.2.2 Bestimmung des A2M-Allelstatus

Die parallel durchgeführte Bestimmung des A2M-Allelstatus erfolgte von Beginn an durch Auftrennung der PCR-Produkte auf Polyacrylamidgelen. Aufgrund der

einfachen Detektion dieses Deletions-Insertions-Polymorphismus wurden andere Methoden nicht in Erwägung gezogen. PCR-Primer und Bedingungen wurden in Anlehnung an die von Blacker et al. 1998 veröffentlichte Studie etabliert.

4.3 Bewertung der Ergebnisse

Ausgangspunkt einer genetischen Studie sollte eine einheitliche Krankheitsdefinition sein. Doch allein die Diagnostik der AMD stellt die ophthalmologische Forschung vor Probleme. So ist es beispielsweise immer noch fraglich, ob es überhaupt einen spezifischen Phänotyp einer AMD gibt. Einige Erkrankungen der Retina haben ähnliche Muster im Endstadium: die Atrophie des RPE sowie die chorioretinale Vernarbung. Diese Erkrankungen können eine AMD vortäuschen und durchaus zu einer Fehldiagnose führen. Somit kann man nicht sicher davon ausgehen, dass alle als AMD diagnostizierten Fälle tatsächlich AMD-Fälle sind.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob das Bemühen um eine einheitliche Klassifikation in der Diagnose, wie es von Alan Bird (Bird et al., 1995) oder in der ARED-Studie (Sackett et al., 2002) unternommen wurde, Patientenkollektive hervorbringt, die für eine genetische Analyse geeignet sind. Diagnostische Kriterien mögen für epidemiologische Studien sinnvoll sein, doch eignen sich diese Kriterien auch für genetische Analysen? Kann man davon ausgehen, dass der phänotypischen Heterogenität der AMD eine genetische Heterogenität zugrundeliegt, und wenn ja, korrelieren diese Heterogenitäten miteinander? Sinnvoll wäre es, eine Studie auf einen klar definierten Phänotyp zu beschränken, der bei den Patienten eindeutig diagnostiziert werden kann.

Insofern muss man bei jeder Studie zuerst die Zuverlässigkeit der untersuchten Patienten- und Kontrollgruppe bewerten, bevor man die eigentlichen Ergebnisse diskutiert. Die vorliegende Arbeit verlässt sich auf die Diagnosekriterien der Augenkliniken in Münster, Würzburg, Tübingen und Heidelberg. Diese Diagnosen erhielten jedoch keinen näheren Informationen über das Vorliegen von Drusen bzw. deren Morphologie. Deshalb konnten die in der Souied-Studie (1998) veröffentlichten Ergebnisse eines protektiven Effekts des ApoE- ϵ 4 be-

zöglich drusiger AMD-Formen nicht am Patientenkollektiv nachvollzogen werden.

4.3.1 Assoziation der untersuchten ApoE-Allele mit der AMD

Den Ergebnissen der vorliegenden Studie zufolge gibt es zumindest im untersuchten Patientenkollektiv keine Assoziation eines der drei häufigen ApoE-Polymorphismen mit der AMD.

Hinsichtlich einer Assoziation mit speziellen Formen der AMD zeigten die Studien von Klaver et al. (1998) und Schmidt et al. (2000) keinerlei Unterschiede in der Allelverteilung. Beide Studien analysierten die Allelverteilung bei Patienten mit trockener AMD und im Vergleich dazu bei Patienten mit der feuchten Form der AMD und schlossen anhand der Ergebnisse eine Korrelation zwischen klinischem Bild einer AMD und genetischer Ursache zumindest für das ApoE- ϵ 4 aus. Allerdings zeigen die Ergebnisse der Studie von Souied et al. (1998) eine Assoziation des ApoE- ϵ 4-Allels mit der exsudativen Form der AMD (ApoE- ϵ 4 Frequenz AMD-Gruppe exsudativ vs. Kontrollen: 12,1% vs. 28,6%, $p < 0,0009$). Bei der Auswertung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde auf eine Differenzierung des Patientenkollektivs in feuchte und trockene AMD-Fälle verzichtet, da nicht von allen AMD-Patienten gesicherte Aussagen über das jeweilige AMD-Stadium vorlagen. Eine solche Unterteilung ist außerdem recht willkürlich: Wie bereits in der Einleitung erwähnt kann sich auch aus den Formen einer im Anfang trockenen AMD eine exsudative Verlaufsform entwickeln.

Hinzu kommt das bei einer statistischen Auswertung von Ergebnissen auftretende Problem der Mehrfachtestung. Je mehr Tests an ein und derselben Gruppe von Studienobjekten durchgeführt werden, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse. Im Falle einer genetischen Assoziationsstudie würden solche falsch positiven Ergebnisse eine signifikante Assoziation vortäuschen. Streng genommen muss man den p-Wert (=Irrtumswahrscheinlichkeit) deshalb immer durch die Anzahl der statistischen Tests teilen (so genannte „Bonferri-Korrektur“). Selbst im einfachsten Betrachtungsfall, z.B. Auswertung der Verteilung von ApoE- und A2M-Allelen in den untersuchten Gruppen, muss man die p-Werte bereits halbieren. Bei zusätzlicher

Betrachtung der Genotyp-Verteilung und der Differenzierung in unterschiedliche AMD-Formen erhöht sich die Zahl der durchgeführten statistischen Tests schon auf sechs.

Rückblickend muss aufgrund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse gesagt werden, dass es sinnvoller gewesen wäre, das AMD-Patientenkollektiv enger einzugrenzen. Der Ansatzpunkt der strengen Krankheitsdefinition wurde bereits erwähnt. Möglicherweise liegen den unterschiedlichen Formen der AMD tatsächlich verschiedene genetische Faktoren zugrunde, so dass die klinische Heterogenität mit einer genetischen Heterogenität korreliert. Hypothetisch wäre es möglich, dass nur eine bestimmte Form der AMD mit einem der untersuchten ApoE-Polymorphismen assoziiert ist. Eine solche genetische Assoziation würde aber bei der Untersuchung von Patientenkollektiven mit allen Formen der AMD unentdeckt bleiben oder erst bei zahlenmäßig sehr großen Untersuchungsgruppen auffällig werden.

Deshalb kann trotz der nicht signifikanten Studienergebnisse eine Assoziation der AMD mit ApoE- ϵ 4 nicht ausgeschlossen werden. Sicherlich ist das ApoE- ϵ 4 bzw. das nicht Vorhandensein des Allels kein AMD-Risikofaktor von großem Einfluss. Die Isoformen des ApoE beeinflussen aber möglicherweise den Verlauf einer AMD. Erforderlich zur Klärung dieser fraglichen Assoziation wären künftige Untersuchungen an diagnostisch exakt definierten Patientengruppen einer spezifischen AMD-Form.

4.3.2 Signifikante Unterschiede des ApoE-4-Allels in verschiedenen Altersgruppen

Das einzig signifikante Ergebnis dieser Studie zeigte die Verteilung des ApoE- ϵ 4-Allels. Sowohl in der Gruppe der AMD-Patienten als auch in der Gruppe der altersgemäßen Kontrollen war der Anteil der ApoE- ϵ 4-Allelträger bzw. das Vorkommen des Allels signifikant geringer als in der Gruppe der Normalbevölkerung (Häufigkeit: 0,09 vs. 0,09 vs. 0,16). Das Ergebnis ist mit einem χ^2 -Wert von 14,316 und einer Irrtumswahrscheinlichkeit (= p-Wert) von 0,001 signifikant. Hingegen war die Allelverteilung unter AMD-Patienten und altersgemäßen Kontrollpersonen nahezu identisch. Möglicherweise besteht eine Korrelation zwi-

schen dem Durchschnittsalter der drei untersuchten Gruppen und der jeweiligen Allelhäufigkeit. Das Durchschnittsalter liegt in der Gruppe der AMD-Patienten bei 80,3 Jahren, bei den altersgemäßen Kontrollen etwas höher bei 82,3 Jahren und in der Gruppe der Normalbevölkerung bei 35,7 Jahren.

Erklärungsmöglichkeiten bleiben jedoch rein spekulativ. Denkbar wäre, dass das ApoE- ϵ 4-Allel nicht nur ein Risikofaktor für die Alzheimer Erkrankung, sondern auch für andere degenerative Erkrankungen darstellt. Dies könnte durchaus mit einer geringeren Lebenserwartung korrelieren und würde eine Abnahme der ApoE- ϵ 4-Allelhäufigkeit in hohen Altersklassen plausibel machen. In der Literatur findet sich hierzu eine Studie aus dem Jahre 1994, die eine Abnahme der ApoE- ϵ 4-Frequenz bei gleichzeitiger Zunahme der ApoE- ϵ 2-Frequenz im höheren Lebensalter beschreibt (Schachter et al., 1994). Trotz der nur geringen Anzahl von 338 untersuchten Personen sind die Ergebnisse deutlich signifikant ($p=0,001$ für die ApoE- ϵ 4-Verteilung und $p=0,01$ für ApoE- ϵ 2). Auch hier wird die unterschiedliche Verteilung dahingehend interpretiert, dass die Isoformen des ApoE einen Einfluss auf die Lebenserwartung haben. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen zahlreicher Studien, die ApoE- ϵ 4 als Risikofaktor für erhöhte Serumcholesterinspiegel und koronarer Herzkrankheit identifiziert haben, beides Faktoren bzw. Erkrankungen die sich durchaus lebensverkürzend auswirken (Smith et al., 2000).

Interessant wäre in diesem Zusammenhang eine breit angelegte, epidemiologische Studie, die die ApoE- ϵ 4-Häufigkeit in unterschiedlichen Altersklassen der Bevölkerung analysiert.

4.3.3 Studienvergleich

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den bisher publizierten Studien zur AMD-Assoziation der ApoE-Polymorphismen verglichen und diskutiert.

4.3.3.1 Vergleich mit der Klaver-Studie

Die 1998 publizierte Studie von Klaver et al. wurde im Rahmen der Rotterdam Eye Study durchgeführt und bildete den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Die Klaver-Studie untersuchte 88 Fälle von AMD, die nach der international anerkannten Bird-Klassifikation (Bird et al., 1995) diagnostiziert wurden. Die Patientengruppe enthielt sowohl Fälle von geographischer Atrophie als auch Fälle exsudativer AMD. Es fand also keine Differenzierung in spezielle Formen der AMD statt. Die Kontrollgruppe setzte sich aus 901 Personen zusammen, die keine Zeichen einer AMD hatten. Diese Gruppe von Kontrollpersonen lag mit einem Durchschnittsalter von 69 Jahren 11 Jahre unter dem durchschnittlichen Alter der in dieser Studie verwendeten Kontrollgruppe und außerdem auch unter dem Durchschnittsalter der Patientengruppe. In einer solchen Kontrollgruppe können sich durchaus Personen befinden, die erst ab dem 80. Lebensjahr Zeichen einer AMD entwickeln.

Die Häufigkeit des ApoE- ϵ 4-Allel in der Gruppe der AMD-Fälle war signifikant geringer als die Häufigkeit in der Kontrollgruppe (Patienten/Kontrollen: 0,068 vs. 0,156; $p=0,002$). Klaver et al. fanden außerdem eine erhöhte ApoE- ϵ 2-Frequenz unter den AMD-Fällen, die allerdings nicht statistisch signifikant war (Patienten/Kontrollen: 0,125 vs. 0,09; $p=0,17$) und demnach zu vernachlässigen ist. Die Schlussfolgerung von Klaver et al., dass es sich bei dieser geringen Erhöhung möglicherweise um einen Hinweis auf eine Rolle des ApoE- ϵ 2 als AMD-Risikofaktor handele, ist nach statistischen Bewertungskriterien rein spekulativ und bei der geringen Größe der Patientengruppe keineswegs nachvollziehbar.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Unterschiede der ApoE- ϵ 4-Verteilung innerhalb unterschiedlicher Altersgruppen traten in der Klaver-Studie nicht auf. Um einen "selection bias" zu vermeiden, teilten Klaver et al. sowohl AMD-Fälle als auch Kontrollgruppe in drei Altersklassen ein (Klasse 1: 55-75 Jahre, Klasse 2: 75-85 Jahre, Klasse 3: 85+ Jahre) und fanden keine Unterschiede in der ApoE- ϵ 4-Verteilung. Bei den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Häufigkeitsverteilungen fand sich dagegen eine deutliche Abnahme der ApoE- ϵ 4-Frequenz mit zunehmendem Alter. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Resultaten der bereits erwähnten Studie von Schachter et al. (1994), die

häufige Polymorphismen an einem Populationskollektiv hinsichtlich einer Assoziation mit der Lebenserwartung untersuchte. Diese Studie berichtet von einer signifikanten Abnahme der ApoE- ϵ 4-Frequenz und einer deutlichen Zunahme von ApoE- ϵ 2 bei Personen höheren Alters. Widersprüchlich ist, dass Klaver et al. die altersabhängige Abnahme von ApoE- ϵ 4 trotz der insgesamt großen Personengruppe nicht fanden.

4.3.3.2 Vergleich mit der Souied-Studie

Ebenfalls 1998 veröffentlichten Souied et al. eine ähnliche Studie. Sie untersuchten 116 AMD-Patienten mit unilateraler, exsudativer AMD und harten oder weichen Drusen am anderen Auge, die ebenfalls nach der Bird Klassifikation diagnostiziert wurden. Die Kontrollgruppe bestand in der Souied-Studie aus 168 Personen ohne Anzeichen einer AMD. Die Studie zeichnet sich im Vergleich zur Klaver-Studie durch eine sehr präzise Diagnosestellung aus. Die Durchschnittsalter der beiden Gruppen lagen mit 71,0 Jahren bei den AMD-Fällen und 74,9 Jahren bei den Kontrollpersonen allerdings fast 10 Jahre unter den in der vorliegenden Studie untersuchten Gruppen und auch unter denen der Klaver-Studie. Auch Souied und seine Mitarbeiter fanden eine signifikant geringere Häufigkeit des ApoE- ϵ 4-Allels innerhalb der Patientengruppe (0,073 vs. 0,149 in der Kontrollgruppe, $P=0,006$) und interpretierten deshalb das Allel ebenfalls als eine Art protektiven Faktor für die Entwicklung einer AMD. Vor allem in der Gruppe der Patienten mit weichen Drusen am Partnerauge waren die Ergebnisse deutlich signifikant (0,045 in der Patientengruppe vs. 0,149 in der Kontrollgruppe, $P=0,0009$). Interessant ist die beschriebene Erklärungsmöglichkeit der Assoziation mit ApoE- ϵ 4. Souied et al. diskutieren die Proteinfunktion des ApoE- ϵ 4, das im Gegensatz zu den zwei weiteren häufigen Isoformen ApoE- ϵ 2 und ApoE- ϵ 3 keine Dimere bildet. Möglicherweise beeinflusst das ApoE- ϵ 4 den Stoffaustausch zwischen Retina, RPE und Choroidea günstig. Dies könnte protektiv hinsichtlich einer Ablagerung in Form von Drusen wirken.

Die Ergebnisse dieser Studie belegen somit die Assoziation des ApoE- ϵ 4 mit einer spezifisch phänotypischen Form der AMD, nämlich der exsudativen AMD

und dies insbesondere in Verbindung mit weichen Drusen. Ein Schwachpunkt dieser Studie ist wiederum das eher geringe Durchschnittsalter der untersuchten Gruppen.

4.3.3.3 Vergleich mit der Pang-Studie

Im Jahr 2000 veröffentlichten Pang et al. (Pang et al., 2000) eine in Hongkong durchgeführte Studie mit identischem Studiendesign. Sie untersuchten 98 AMD Patienten auf eine Assoziation mit dem ApoE- ϵ 4-Allel. Pang et al. fanden zwar eine geringere Häufigkeit des Allels in der Patientengruppe, jedoch ohne statistische Signifikanz (0,11 vs. 0,15 in der Kontrollgruppe, $p=0,52$). Auch unter den Patienten mit exsudativer AMD fanden sich keine signifikanten Ergebnisse. Pang und seine Mitarbeiter führten dies auf die in der chinesischen Population generell geringere Frequenz des ApoE- ϵ 4 zurück. Somit schließt die Studie eine Assoziation des ApoE- ϵ 4 als protektiven AMD-Faktor zumindest für die untersuchte, chinesische Population aus.

4.3.3.4 Vergleich mit der Schmidt-Studie

Schmidt et al. publizierten 2000 eine weitere Studie zur Assoziation des Apolipoprotein E mit der AMD (Schmidt et al., 2000). Auch hier wurden die AMD-Patienten nach der Bird Klassifikation ausgewählt, wobei sowohl Fälle von geographischer Atrophie als auch exsudative AMD-Formen in die Studie aufgenommen wurden. Die Patientengruppe bestand aus 230 Personen (Altersdurchschnitt 74,0 Jahre), bei denen AMD entweder sporadisch ($n=101$) oder aber familiär ($n=129$) gehäuft auftrat. Die Kontrollgruppe ($n=372$) setzte sich aus Alzheimer-Patienten und gesunden Personen zusammen (durchschnittliches Alter 68,1 Jahre). Auch hier ist das Durchschnittsalter der Kontrollgruppe deutlich geringer. Außerdem wurden die Personen der Kontrollgruppe zum Teil nicht ophthalmologisch untersucht, sondern nur befragt, ob eine AMD bei ihnen bekannt sei - ein gewisser Schwachpunkt, der in der Publikation von Seiten der Autoren in der Diskussion zugegeben wird.

Schmidt et al. berichten über eine geringere Frequenz des ApoE- ϵ 4-Allels bei den AMD Patienten, die aber keine statistische Signifikanz aufweist (Patien-

ten/Kontrollen: 0,117 vs. 0,146, $p=0,35$). Auch die Verteilung der Genotypen zeigte mit einem p -Wert von 0,68 keine Signifikanz. Die Arbeitsgruppe differenzierte die AMD-Fälle weiterhin nach Alter und Geschlecht und fand auch hier keine signifikant unterschiedlichen Allelverteilungen.

Signifikante Ergebnisse allerdings zeigte eine Unterscheidung in sporadische und familiäre AMD-Fälle. Schmidt et al. belegen, dass es keine Assoziation des ApoE- ϵ 4 mit den sporadischen AMD-Fällen gibt. Dafür beschreiben sie aber eine signifikant geringere Frequenz an ApoE- ϵ 4-Trägern in der Gruppe jüngerer AMD-Patienten (Alter < 70) mit familiär gehäuft auftretender AMD (0,0036 bei Frauen und 0,273 für Männer vs. 0,309 und 0,314 bei weiblichen bzw. männlichen Kontrollpersonen, $p=0,004$). Allerdings wurden die untersuchten AMD-Gruppen durch eine Differenzierung in sporadische und familiäre Fälle und darüberhinaus in Alter und Geschlecht teilweise sehr klein. Beispielsweise bestand die Gruppe der familiären, männlichen AMD-Fälle mit Alter > 79 Jahren nur noch aus 6 Patienten. Hier war die ApoE- ϵ 4-Frequenz sogar höher als in der Kontrollgruppe. Die Gruppe der AMD-Patienten, in der sich eine signifikant geringere ApoE- ϵ 4-Frequenz zeigte, umfasste 39 Patienten. Trotz Anwendung des exakten Tests nach Fischer bei der Auswertung sind solche geringen Gruppenstärken im Rahmen einer genetischen Assoziationsstudie sicherlich nicht geeignet, um eine deutlich genetische Komponente aufzudecken.

Schwachpunkt dieser Differenzierung ist außerdem wieder die Fragwürdigkeit der Diagnose "familiäre AMD", da auch hier nur anhand von Patientenaussagen verfahren wurde und die angeblich betroffenen Familienmitglieder nicht untersucht wurden.

Der in der Klaver-Studie beschriebene Verdacht, das ApoE- ϵ 2-Allel könnte ein Risikofaktor für die AMD darstellen, da es häufiger innerhalb der AMD-Patientengruppe vorkam, wurde in der Schmidt-Studie nicht erhärtet. Auch hier ist die Frequenz des ApoE- ϵ 2 zwar leicht erhöht, aber nicht signifikant (0,09 vs. 0,08, $P=0,97$). Die Ergebnisse der Schmidt-Studie decken sich somit weitgehend mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Eine generelle Assoziation des ApoE- ϵ 4 bzw. ApoE- ϵ 2-Allels mit der AMD konnte nicht bestätigt werden.

Schmidt und ihre Mitarbeiter kommen ebenfalls zu dem Schluss, dass Studien an größeren Patientengruppen nötig sind, um die Assoziation des ApoE- ϵ 4-Allels mit der AMD weiter zu charakterisieren, vor allem aber, um aussagekräftige Ergebnisse an differenzierten AMD-Untergruppen zu erhalten. Die Schmidt-Studie legt hierbei mehr Wert auf die Differenzierung in Alter, Geschlecht und familiäre Anamnese als auf eine Unterscheidung in trockene und exsudative AMD-Formen.

4.3.3.5 Vergleich mit der Simonelli-Studie

Im Jahr 2001 veröffentlichten Simonelli et al. eine Assoziationsstudie mit AMD-Patienten und Kontrollpersonen italienischer Abstammung. Sie untersuchten 87 AMD-Patienten mit einem Durchschnittsalter von 71,8 Jahren. Die Diagnose AMD wurde anhand der Bird-Klassifikation gestellt. Die altersgemäße Kontrollgruppe umfasste 47 Personen, die im Durchschnitt 70 Jahre alt waren und keine Anzeichen einer AMD aufwiesen. Als weitere Kontrollgruppe diente eine 1235 Probanden starke Gruppe aus der Allgemeinbevölkerung, die auf AMD nicht untersucht wurde. Das Durchschnittsalter wird von den Autoren nicht angegeben. Simonelli et al. kommen zu folgenden Ergebnissen: Das ApoE- ϵ 2-Allel tritt in der Gruppe der AMD-Patienten mit einer signifikant höheren Frequenz auf als in der Gruppe der altersgemäßen Kontrollen (0,098 vs. 0,061, $p=0,031$). Die ApoE- ϵ 4-Allel-Frequenz ist in der Gruppe der AMD-Patienten jedoch nicht signifikant geringer als in den altersgemäßen Kontrollen ($p=0,168$). Nur im Vergleich AMD-Patienten vs. Normalbevölkerung ist die ApoE- ϵ 4 signifikant niedriger (0,029 vs. 0,105, $p=0,002$). Dieses Ergebnis brachte auch die vorliegende Arbeit. Vergleicht man dieses Ergebnis jedoch mit der Studie von Schachter et al. (1994), wird offensichtlich, dass es sich hierbei um ein bereits beschriebenes Verteilungsphänomen des ApoE- ϵ 4 in unterschiedlichen Altersgruppen handelt. Die ApoE- ϵ 4-Allel-Frequenz ist in Personengruppen höheren Alters geringer, unabhängig davon, ob sie an AMD erkrankt sind oder nicht. Trotz dieses "selection bias" interpretieren die Autoren in der Simonelli-Studie

das ApoE- ϵ 4-Allel als protektiven Faktor für die AMD – ein Schluss, der anhand der Ergebnisse nicht nachvollziehbar ist.

4.3.3.6 Vergleich mit der Schultz-Studie

Im Jahr 2003 erschien eine weitere Studie (Schultz et al., 2003) zur Assoziation des ApoE mit der AMD. Die Autoren untersuchten hier innerhalb einer nord-amerikanischen Population 56 Familien, in denen AMD gehäuft auftrat. Aus den Familien gingen 259 AMD-Patienten (Durchschnittsalter 73,2 Jahre) und 207 gesunde Individuen (Durchschnittsalter 59,0 Jahre) in die Studie ein. Als Kontrollgruppen dienten außerdem 104 nicht-verwandte AMD-Patienten (Durchschnittsalter 78,4 Jahre) und 113 gesunde, nicht-verwandte Kontrollpersonen (Durchschnittsalter 72,5). Die Diagnose „AMD“ wurde anhand klinischer Untersuchungen und Fundusaufnahmen gestellt.

Schultz et al. fanden trotz Anwendung von vier verschiedenen, statistischen Testverfahren, darunter auch dem Chi-Quadrat-Test, keine signifikanten Unterschiede in der Allelfrequenz. Weder das ApoE- ϵ 4-Allel noch ApoE- ϵ 2-Allel zeigten signifikante Verteilungsunterschiede. Allel- und Genotypfrequenzen waren sowohl in den Familien als auch in der Gruppe der nicht-verwandten AMD-Patienten im Vergleich mit den Kontrollgruppen (verwandte Individuen ohne AMD und nicht verwandte, gesunde Kontrollen) nicht signifikant erhöht oder erniedrigt. Es ergab sich kein Hinweis auf eine Assoziation eines ApoE-Allels mit der AMD.

Somit stützt die Studie von Schultz et al. die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

4.3.3.7 Vergleich mit der Baird-Studie

Erst kürzlich wurde eine neue Studie zur Assoziation des Apolipoproteins E mit der AMD von Baird et al. (2004) veröffentlicht. In die Studie wurden 322 nicht verwandte AMD-Patienten und 123 Kontrollpersonen aufgenommen. Alle Probanden sind Australier aus der Umgebung von Melbourne mit anglo-keltischem

Ursprung. Die Diagnosestellung erfolgte anhand von Fundusaufnahmen, wobei sowohl atrophische als auch feuchte AMD-Fälle in die Studie eingingen (n=252, Durchschnittsalter 77,6 Jahre). Die Autoren führen weiterhin eine Population von Fällen früher AMD auf, die in der Fundoskopie nur weiche Drusen aufweisen (n=70, Durchschnittsalter 72 Jahre). Die Analyse erfolgte hinsichtlich früher und später Formen der AMD, außerdem wurde nach Geschlecht und zwischen Fällen mit familiärem AMD-Hintergrund und sporadischen AMD-Fällen unterschieden.

Eine signifikant geringere ApoE- ϵ 4-Allelfrequenz wies die Gruppe der späten AMD-Formen im Vergleich mit den Kontrollpersonen auf (11,5% vs. 17,9%, p-Wert= 0,037). Eine Differenzierung dieser Gruppe in feuchte und trockene AMD-Formen zeigte hochsignifikante Ergebnisse für die Gruppe der AMD-Patienten mit atrophischer AMD, nicht aber für die Gruppe der späten AMD-Formen mit Neovaskularisation (Gruppe späte, trockene AMD ϵ 4-Allelfrequenz=8,7%, p-Wert=0,018; Gruppe späte, feuchte AMD ϵ 4-Allelfrequenz=12,3%, p-Wert=0,091). Der Vergleich der Gruppe „frühe AMD“ mit den Kontrollpersonen erbrachte keinen signifikanten Unterschied in der ApoE- ϵ 4-Verteilung. Die Differenzierung nach Geschlecht zeigte signifikante Unterschiede für männliche Probanden: Die Gruppe männlicher Individuen mit später AMD wies eine geringere ApoE- ϵ 4-Frequenz im Vergleich mit den Kontrollpersonen auf (ApoE- ϵ 4-Frequenz 10,3% vs. 23,6%; p-Wert=0,01). Bei weiblichen AMD-Patienten trat dieser Allelunterschied nicht auf. Allerdings wurden bei diesen Differenzierungen die Probandengruppen relativ klein, so dass der exakte Test nach Fischer angewendet wurde und die statistische Aussagekraft damit nur begrenzt ist.

Das ApoE- ϵ 2-Allel wies keine signifikanten Verteilungsunterschiede auf. Die Studie belegt somit eine Assoziation des ApoE- ϵ 4-Allels mit der späten, atrophischen Form der AMD im Sinne eines protektiven Faktors. Dieses Ergebnis belegt die Hypothese, dass das ApoE- ϵ 4 nur mit bestimmten AMD-Formen assoziiert ist, die klinische Heterogenität der Erkrankung also mit einer genetischen Heterogenität korreliert.

4.3.3.8 Vergleich mit der Zareparsi-Studie

Zeitgleich mit der Studie von Baird et al. (2004) erschien eine weitere Assoziationsstudie von Zareparsi et al. (2004), die eine Gruppe nicht verwandter Patienten von 632 Individuen und eine Kontrollgruppe von 206 Personen, alle kaukasischer Abstammung, umfasst. Dabei lag das Durchschnittsalter der AMD-Patienten bei 79,2 Jahren, das der Kontrollpersonen bei 74,6 Jahren.

In die Studie gingen sowohl Fälle atrophischer als auch neovaskulärer AMD ein. Zareparsi et al. differenzierten hinsichtlich verschiedener AMD-Formen, positiver Familienanamnese und Nikotinkonsum.

Das ApoE- ϵ 4-Allel zeigte unter AMD-Patienten im Vergleich mit den Kontrollen eine signifikant geringere Frequenz (10 % vs. 14 %, p-Wert= 0,02).

Um eine Assoziation zwischen ApoE-Allelen mit einer speziellen Form der AMD zu untersuchen, wurde in vier verschiedene Gruppen differenziert: Patienten mit atrophischer AMD, Patienten mit CNV, Patienten mit großen Drusen und solchen mit sowohl atrophischer als auch neovaskulärer AMD. Diese Differenzierung erbrachte für alle Gruppen eine signifikante Erniedrigung der ApoE- ϵ 4-Allelhäufigkeit (ApoE- ϵ 4-Frequenz in Gruppen 1-4: 11 % vs. 9 % vs. 10 % vs. 10 %; Kontrollen 14 %). Im Gegensatz zur Baird-Studie (2004) ergaben sich keine hochsignifikanten Ergebnisse für die Gruppe "atrophische AMD".

Eine Unterscheidung zwischen Patienten mit positiver Familienanamnese für AMD und Patienten ohne betroffene Angehörige, zeigte keine signifikanten Abweichungen der ApoE- ϵ 4-Häufigkeit. Allerdings hatten AMD-Patienten mit positiver Familienanamnese einen signifikant früheren Erkrankungsbeginn, gemessen am Alter bei Erstdiagnose (ED) der AMD, als Patienten ohne weitere AMD-Fälle in der Familie (Alter bei ED im Durchschnitt 69,9 Jahre vs. 73,4 Jahre, p-Wert=0,0001). Interessanterweise war in der Gruppe "AMD mit positiver Familienanamnese" das Alter bei Erstdiagnose unabhängig vom ApoE-Allelstatus.

Weiterhin wurde eine mögliche Assoziation des für AMD nachgewiesenen Risikofaktors "Nikotinabusus" mit dem ApoE-Allelstatus untersucht. Eine Differenzierung der AMD-Patienten in "Raucher" und "Nichtraucher" zeigte jedoch keine

signifikante Assoziation zu einem bestimmten ApoE-Allelstatus. Die ApoE- ϵ 4-Allelfrequenz schwankte zwischen diesen beiden Gruppen kaum.

Diese Studie belegt wiederum den protektiven Effekt des ApoE- ϵ 4-Allels hinsichtlich des Risikos, an AMD zu erkranken. Außerdem zeigen die Studienergebnisse, dass bei Patienten mit positiver Familienanamnese für AMD unabhängig vom ApoE-Allelstatus die Erstdiagnose früher gestellt wird und der Erkrankungsprozess scheinbar eher beginnt – ein Hinweis darauf, dass bisher unidentifizierte Gene das Alter bei Beginn der AMD beeinflussen.

4.3.3.9 Übersicht Studienvergleich

Tabelle 15 stellt die Ergebnisse sämtlicher Studien zur Assoziation von ApoE-Polymorphismen mit der AMD im Vergleich dar.

Interessant ist vor allem der Vergleich unter Berücksichtigung von Altersdurchschnitt der untersuchten Gruppen sowie Beschränkung auf bestimmte, phänotypische AMD-Formen.

Klaver et al. (1998) finden eine Assoziation der AMD mit dem ApoE- ϵ 4-Allel, die Allelhäufigkeit ist unter den AMD-Patienten signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. In die Studie gingen Patienten mit sowohl exsudativer als auch atrophischer AMD ein. Allerdings haben hier Patienten- und Kontrollgruppe einen Altersunterschied von 12 Jahren. Souied et al. (1998) belegen ebenfalls eine Assoziation des ApoE- ϵ 4-Allels mit der AMD und zwar mit der exsudativen Form. Diese Studie beschränkte sich bei der Auswahl der Patientengruppe auf diesen genau definierten Phänotyp der AMD. Baird et al. (2004) zeigen in ihrer Studie ebenfalls eine signifikante Assoziation des ApoE- ϵ 4-Allels mit einer speziellen AMD-Form, nämlich der späten, atrophischen Form der AMD im Sinne eines protektiven Faktors. Interessanterweise zeigen die Formen der späten, exsudativen AMD bei Baird et al. (2004) im Gegensatz zu Souied et al. (1998) keine Assoziation zum ApoE- ϵ 4-Allel.

Zareparsari et al. (2004) belegen in ihrer Studie ebenfalls eine signifikante Assoziation des ApoE- ϵ 4-Allels mit der AMD und zwar für sowohl atrophische als auch exsudative AMD-Formen. Hier zeigt sich im Gegensatz zu den Studien

von Baird et al. (2004) und Souied et al. (1998) keine Assoziation des ApoE- ϵ 4-Allels zu einem bestimmten AMD-Phänotyp.

Die übrigen Studien fanden keine Assoziation des ApoE- ϵ 4-Allels mit der AMD. Zwar beschreiben Simonelli et al. (2001) ihre Ergebnisse der ApoE- ϵ 4-Allel-Verteilung als signifikant, diese Signifikanz tritt aber nur im Vergleich von Patientengruppen mit der Normalbevölkerung auf, nicht im Vergleich mit den altersgemäßen Kontrollen.

Insgesamt lässt sich also festhalten: Vier Studien belegen eine Assoziation des ApoE- ϵ 4-Allels mit der AMD (Klaver et al., 1998; Souied et al., 1998; Baird et al., 2004; Zarepari et al., 2004), hingegen weisen die übrigen Assoziationsstudien (Pang et al., 2000; Schmidt et al., 2000; Simonelli et al., 2001; Schultz et al., 2003; Ziegler et al., 2000) keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung des ApoE- ϵ 4-Allels nach.

	Ethnische Gruppe	Patienten (mean age)	Kontrollen (mean age)	AMD-Phänotyp	Allelfrequenzen in % Patienten/Kontrollen			Signifikante Assoziation mit AMD
					ε2	ε3	ε4	
Klaver et al., 1998	K	88 (81)	901 AB (69)	E und A	12,5/9,0	80,6/75,3	6,8/15,6	ε4 Protektives Allel
Souied et al., 1998	K	116 (73,8)	168 am (74,9)	E	9,9/6,2	82,8/78,9	7,3/14,9	ε4 Protektives Allel
Pang et al., 2000	C	98 (71,8)	133 AB (69,7)	E und A	9,7/9,4	84,7/83,1	5,6/7,5	Keine Assoziation
Schmidt et al., 2000	K	129 ¹ (73,9) 101 ² (75,5)	372 AB (68,1)	E und A	7,4/8,1 10,4/8,1	83,7/77,3 74,3/77,3	8,9/14,6 15,4/14,6	Keine Assoziation Keine Assoziation
Simonelli et al., 2001	K	87 (71,8)	1235 AB (k.A.) 49 am (70)	E und A	9,8/6,1 9,8/2	87,3/83,4 87,3/90,9	2,9/10,5 2,9/7,1	ε4 Protektives Allel Keine Assoziation
Schultz et al., 2003	K	104 (78,2)	113 am (72,5)	E und A	9,1/8,0	81,7/79,6	9,1/12,4	Keine Assoziation
Ziegler et al., 2000 ³	K	400 (82,3)	153 am (80,3) 200 AB (39,8)	E und A	12,9/13,1 12,9/9,5	77,9/78,1 77,9/73,5	9,5/9,5 9,5/16,5	Keine Assoziation ε4 Protektives Allel
Baird et al., 2004	K	252 (77,6)	123 am (76,6)	E und A	9,9/6,9	78,6/75,2	11,5/17,9	ε4 Protektives Allel
Zareparsari et al., 2004	K	632 (79,2)	206 am (74,6)	E und A	9,0/8,0	81,0/78,0	10,0/14,0	ε4 Protektives Allel

Tabelle 15

Studienvergleich Assoziation von ApoE-Polymorphismen mit der AMD

- 1, familiäre AMD-Fälle
- 2, sporadische AMD-Fälle
- 3, Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

Abkürzungen:

K= Kaukasier; C=Chinesen; AB=Allgemeinbevölkerung; am=age-matched (gleichaltrige Kontrollen)
E=exsudative AMD; A=atrophische AMD

4.3.3.10 Interpretation

Der Studienvergleich ergibt ein widersprüchliches Bild. Die beiden der Arbeit vorausgegangenen Studien von Klaver et al. (1998) und Souied et al. (1998) belegen eine Assoziation des ApoE-ε4-Allels mit der AMD. Diese Studien bildeten die Grundlage für die vorliegende Arbeit. Doch weder die Ergebnisse dieser Arbeit noch die der vier nachfolgenden Studien (Pang et al., 2000; Schmidt et al., 2000; Simonelli et al. 2002; Schultz et al., 2003) konnten eine solche Assoziation reproduzieren. Die beiden zuletzt erschienenen Studien zeigen wiederum signifikante Ergebnisse in der ApoE-ε4-Allelverteilung (Baird et al., 2004; Zareparsari et al., 2004). Wie lassen sich diese Widersprüche erklären?

Eine mögliche Erklärung ist folgende: Das ApoE- ϵ 4-Allel stellt zwar einen protektiven Faktor dar, der Effekt ist aber in verschiedenen Populationen unterschiedlich stark ausgeprägt. In Populationen mit schwächerer Ausprägung sind große Studiengruppen notwendig, um bei einer Assoziationsstudie signifikante Frequenzunterschiede zu erhalten. Möglicherweise ist der protektive Effekt, den das ApoE- ϵ 4-Allel hinsichtlich der AMD besitzt, in der hier untersuchten Population zu gering, um eine statistische Signifikanz zu erreichen. Für das ApoE- ϵ 4-Allel gibt es nachweislich populationspezifische Frequenzunterschiede. In Westeuropa differiert die ApoE- ϵ 4-Allelfrequenz von Finnland und Schweden mit 20% bis zu einer Frequenz von 8% in Italien (Lucotte et al., 1997). Weiterhin könnte die phänotypische Heterogenität der AMD ein Problem bei Assoziationsstudien darstellen. Eventuell sind unterschiedliche Phänotypen der AMD auch mit unterschiedlichen genetischen Risikokonstellationen assoziiert. Eine mögliche Assoziation würde in einem großen Patientenkollektiv, das unterschiedliche Formen der AMD enthält, statistisch nicht auffallen. Erst Untersuchungen an ausgewählten Patientengruppen, die nur einen streng definierten Phänotyp enthalten, würden den Effekt sichtbar machen. Einen Beleg hierfür bietet u.a. die Studie von Souied et al. (1998). Die hier nachgewiesene Assoziation des ApoE- ϵ 4-Allels mit der exsudativen Form der AMD ist deutlich signifikant (ApoE- ϵ 4-Allel-Frequenz AMD-Fälle vs. Kontrollen 7,3% vs. 14,9%; $p=0.006$). Eine weitere Untergruppierung erbrachte einen Anstieg der Signifikanz: Im Vergleich von Patienten mit exsudativer AMD mit zusätzlichem Vorhandensein weicher Drusen, im Gegensatz zum Vorhandensein harter Drusen, zeigte sich folgende Allelverteilung: ApoE- ϵ 4-Allel in der Patientengruppe (exsudative AMD und weiche Drusen) 4,5% vs. Kontrollgruppe 14,9% mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (=p-Wert) von 0,0009.

Es ist beim Vergleich der Studien außerdem wichtig, den bereits erwähnten "selection bias", der sich durch die in Populationen altersabhängigen Unterschiede in der ApoE-Allelfrequenz ergibt (Schachter et al., 1994), zu berücksichtigen. Die Simonelli-Studie beispielsweise (Simonelli et al., 2001), findet keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich der Patientengruppe mit den altersgemäßen Kontrollpersonen. Nur im Vergleich Patienten vs. Allgemeinbevölkerung mit ei-

nem Unterschied im Durchschnittsalter (Alter Patienten vs. Allgemeinbevölkerung: 71,8 Jahre vs. ohne genaue Angaben der Autoren) ergibt sich eine signifikant geringere ApoE- ϵ 4-Frequenz in der Patientengruppe. Trotzdem beschreiben Simonelli et al. in der Zusammenfassung ihre Ergebnisse als signifikante Assoziation und interpretieren das ApoE- ϵ 4-Allel als protektiven Faktor für das Risiko, an AMD zu erkranken. Doch diese Schlussfolgerung ist fraglich. Würde tatsächlich ein Zusammenhang bestehen, müsste der signifikante Unterschied auch im Vergleich der Patienten mit der altersgemäßen, nicht an AMD erkrankten Kontrollgruppe auftreten.

Die von Schachter et al. (1994) beschriebene altersabhängige Abnahme der ApoE- ϵ 4-Frequenz könnte bei entsprechend unsauberem Studiendesign, das heißt Kontrollgruppen mit geringerem Altersdurchschnitt, eine Assoziation des ApoE- ϵ 4 mit der AMD oder jeder beliebigen, anderen Alterserkrankung vortäuschen.

4.3.4 Assoziation des A2M-1 und A2M-2 mit der AMD

Die Untersuchung der beiden A2M-Polymorphismen gaben keinen Hinweis auf eine mögliche Assoziation mit der AMD. Es fanden sich weder hinsichtlich der Allelverteilung (AMD-Fälle vs. Kontrollen gesamt $\chi^2=0,207$; $p=0,649$, $df=1$) noch der Verteilung der Genotypen (AMD-Fälle vs. Kontrollen gesamt $\chi^2=4,6$; $p=0,1$, $df=1$) Unterschiede. Anhand der eindeutig nicht signifikanten Ergebnisse lässt sich vermuten, dass selbst eine Untersuchung der A2M-Polymorphismen an großen Patienten- und Kontrollkollektiven keine Assoziation mit der AMD oder bestimmten Formen der Erkrankung zeigen würde. Man kann somit davon ausgehen, dass die beiden untersuchten Polymorphismen des A2M-Gens keine genetischen Risikofaktoren für die AMD darstellen. Ähnliche Studien zur Assoziation der beiden A2M-Polymorphismen mit der AMD wurden bisher nicht publiziert.

Das Gen bleibt aufgrund seiner wichtigen Funktion im neuronalen Gewebe dennoch ein interessanter Kandidat für die genetische Forschung an neurodegenerativen Erkrankungen.

4.4 Ausblick

4.4.1 Erforschung der AMD als komplexe Krankheit

Möglichkeiten der Erforschung komplexer Erkrankungen wurden sowohl in der Einleitung als auch in vorherigen Abschnitten der Diskussion besprochen. Im Falle der AMD scheinen Assoziationsstudien, trotz widersprüchlicher Ergebnisse aus bisherigen Studien, einen erfolgversprechenden Ansatzpunkt darzustellen. Von Bedeutung werden in Zukunft Assoziationsstudien an diagnostisch streng eingegrenzten Patientengruppen und ausreichend großen, altersgemäßen Kontrollgruppen sein.

Wichtig ist außerdem der Aspekt der altersbedingten Degeneration: Möglicherweise existieren pathogenetische Parallelen zwischen der AMD und anderen Degenerationsvorgängen, insbesondere an den Basalmembranen des Gefäßendothels. Proteine bzw. deren zugrunde liegenden Gene mit zentraler Rolle bei Ablagerungsprozessen sind eventuell auch an der AMD-Pathogenese beteiligt und bieten somit weitere Ansatzpunkte für die Erforschung der komplexen AMD-Ursachen.

4.4.2 Mögliche Rolle von Umweltfaktoren

Diverse epidemiologische Studien haben Umwelteinflüsse als Risikofaktoren für AMD beschrieben. Rauchen gilt als gesicherter signifikanter Risikofaktor für AMD (Seddon et al., 1996; Chan et al., 1998; Delcourt et al., 1998; Vingerling et al., 1996; Schwartz et al., 1994), verschiedene andere Studien legen einen Einfluss bestimmter Nahrungsstoffe nahe (Mares-Perlmann et al., 1995; Seddon et al.; 1994).

Auch bei der Erforschung möglicher Einflüsse von Umweltfaktoren auf die Entwicklung einer AMD bieten sich Parallelen zur Alzheimer-Forschung an. Für die Alzheimer-Erkrankung ist bekannt, dass Umweltfaktoren sowohl das Erkrankungsrisiko als auch das Alter bei Krankheitsbeginn beeinflussen. Das Risiko, an Alzheimer zu erkranken, scheint von mindestens vier Umweltfaktoren erhöht zu werden. Dies ist zum einen wie bei AMD auch der inhalative Zigarettenkonsum, darüber hinaus erhöhen die Einnahme nichtsteroidaler Antirheumatika, antioxidativer Vitamine sowie Hormontherapien die Anfälligkeit für Alzheimer. Hierfür gibt es eindrucksvolle Studien an Zwillingen und Geschwisterpaaren (Breitner et al., 1995).

Die Erforschung weiterer exogener Pathogenitätsfaktoren für AMD steht noch aus. Hinsichtlich einer möglichen Therapie der AMD in Zukunft ist aber sicherlich die genetische Forschung unerlässlich. Erst durch die Aufklärung der pathogenetischen Zusammenhänge lässt sich die AMD ursächlich therapieren.

4.4.3 Möglichkeiten der funktionellen Genetik im Hinblick auf die Erforschung der AMD-Pathogenese

Die funktionelle Genetik untersucht das Verhalten von Transkription und Expression in einzelnen Zellen oder auch Geweben in Abhängigkeit von zugrunde liegenden biologischen Veränderungen. Veränderungen auf Zellebene können bedingt sein durch: maligne Zellprozesse, pharmakologische Einflüsse oder genetische Änderungen im Sinne von krankheitsverursachenden Mutationen, Genmanipulation oder einer Infektion. Neue Technologien wie cDNA-Arrays auf Objektträgern (DeRisi et al, 1996), serielle Analyse der Genexpression (SAGE) (Lockhart et al., 1996; Cho et al., 1998; Adams et al., 1996) oder "Differential Displays" (Liang et al., 1992; Bauer et al., 1993) ermöglichen eine Untersuchung der zellulären und gewebespezifischen Antwort bei der AMD. Diese Methoden verlassen sich nicht auf die Kopplung bestimmter Genregionen an die AMD, sondern konzentrieren sich auf die tatsächlich im Gewebe stattfindenden Muster der Transkription. Ziel ist es, die molekularen Vorgänge, die im Gewebe bei AMD stattfinden, in verschiedenen Stadien einer AMD bzw. bei phänotypisch unterschiedlichen Formen zu charakterisieren. Einige dieser Arrays ma-

chen sich bereits bekannte Transkripte zu nutze, beispielsweise cDNA- und Oligonukleotid-Arrays. Andere wiederum, wie SAGE und die "Differential Displays", bieten die Möglichkeit, neue Gene innerhalb der Retina, des RPEs und der Choroidea zu entdecken. Kuehn und Hageman haben mittels "Differential Displays" und Gen-Arrays eine Vielfalt von Molekülen im RPE von AMD-Spenderaugen entdeckt, die sich in ihrer Expression deutlich von Expressionsmuster im RPE gesunder Spenderaugen unterscheiden. Diese Daten sind allerdings noch nicht publiziert.

All diese Strategien offenbaren neue Gene, die sowohl bei der AMD-Pathogenese als auch hinsichtlich der normalen Funktion und des Zusammenspiels von Retina, RPE und Choroidea eine Rolle spielen. Eine Kausalität stellen sie alleine allerdings nicht her.

AMD an sich scheint ein gewöhnlicher Degenerationsvorgang zu sein. Dies wird in ähnlicher Weise auch für die Alzheimer Erkrankung postuliert. Anhand der erwähnten funktionellen, genetischen Studien erhofft man sich die Aufklärung der Interaktionen, die auf Molekularebene diese degenerativen Vorgänge verursachen. Sobald nun AMD-spezifische Gene identifiziert worden sind, kann man damit beginnen, die komplexen Vorgänge der AMD-Pathogenese zu entschlüsseln. Der Einblick in dieses komplizierte Zusammenspiel zellulärer Prozesse wird dann neue Ansatzpunkte für eine kausale AMD-Therapie eröffnen.

5 Zusammenfassung

5.1 Ziel

Die Arbeit dient der Aufklärung genetischer Ursachen der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) – einer komplexen Erkrankung mit bisher unklarer Ätiologie. Ziel der Arbeit war die Untersuchung einer möglichen Assoziation der AMD mit Polymorphismen in den Genen für Apolipoprotein E (ApoE) und Alpha-2-Makroglobulin.

5.2 Voraussetzung

Voraussetzung für diese Arbeit waren Studien von Klaver et al. (1998) und Souied et al. (1998). Beide Studien belegen die Assoziation eines ApoE-Polymorphismus, dem ApoE- ϵ 4-Allel, mit der AMD im Sinne eines protektiven Faktors: Bei den untersuchten AMD-Patienten war die Häufigkeit des ApoE- ϵ 4-Allels signifikant geringer als in den Kontrollgruppen. Diese Assoziation sollte in der vorliegenden Arbeit an einem neuen und größeren Patientenkollektiv untersucht werden.

Das ApoE- ϵ 4-Allel ist ein Risikofaktor für Morbus Alzheimer (Corder et al, 1993). Wie AMD ist die Alzheimer Erkrankung eine neurodegenerative Erkrankung des Alters mit komplexer Ätiologie und Pathogenese. Deshalb wurde folgende Hypothese aufgestellt: Wenn das ApoE- ϵ 4-Allel sowohl mit Morbus Alzheimer als auch mit der AMD assoziiert ist, sind möglicherweise auch andere, mit Morbus Alzheimer assoziierte Polymorphismen an den pathogenetischen Vorgängen der AMD beteiligt. Ausgehend von dieser Überlegung wurden neben den ApoE-Polymorphismen zwei häufige Polymorphismen des Alpha-2-Makroglobulins (A2M) untersucht. Einer dieser A2M-Polymorphismen wurde von Blacker et al. 1998 mit Morbus Alzheimer assoziiert. Die vorliegende Arbeit untersucht erstmals eine mögliche Assoziation dieser A2M-Polymorphismen mit der AMD.

5.3 Methoden

Die Patientengruppe setzte sich aus 400 AMD-Patienten kaukasischer Abstammung zusammen (Altersdurchschnitt 82,3 Jahre). Als Kontrollgruppen dienten zum einen eine Gruppe altersgemäßer Personen ohne Zeichen einer AMD (n=153, Durchschnittsalter 80,3 Jahre) sowie eine weitere, aus der Normalbevölkerung stammende Gruppe (n=200, Durchschnittsalter 39,8 Jahre).

Alle untersuchten Polymorphismen wurden mit der PCR amplifiziert. Bei ApoE erfolgte die Detektion der Genotypen durch Restriktionsverdau und anschließender, elektrophoretischer Auftrennung auf Polyacrylamidgelen. Bei A2M genügte zur Detektion die Gelelektrophorese der PCR-Produkte auf Polyacrylamidgelen. Die Häufigkeitsverteilung der Allele und Genotypen wurden anhand von Kreuztabellen und dem Chi-Quadrat-Test statistisch ausgewertet.

5.4 Ergebnisse

Die in den Studien von Klaver et al. (1998) und Souied et al. (1998) vorbeschriebene, signifikant geringere Häufigkeit des ApoE- ϵ 4-Allels bei AMD-Patienten konnte am vorliegenden Patientenkollektiv nicht nachvollzogen werden. Die ApoE- ϵ 4-Allelfrequenz betrug in der Gruppe der AMD-Patienten 9,5% und in der Gruppe der altersgemäßen Kontrollpersonen ebenfalls 9,5% ($\chi^2 = 0,005$, $p=0,998$). Auch die beiden anderen ApoE-Polymorphismen ApoE- ϵ 3 und ApoE- ϵ 2 zeigten keine signifikante Häufigkeitsverteilung.

Ein signifikantes Ergebnis brachte nur der Vergleich der ApoE- ϵ 4-Allelhäufigkeit bei AMD-Patienten mit der Häufigkeit in der Gruppe „Normalbevölkerung“, die sich durch ein geringeres Durchschnittsalter auszeichnet (Häufigkeit ApoE- ϵ 4-Allel AMD-Patienten vs. Kontrollen Normalbevölkerung: 9,5% vs. 16,5%, $\chi^2 = 14,3$, $p= 0,001$; Altersdurchschnitt 82,3 vs. 39,8 Jahre). Hier liegt aber vermutlich ein „selection bias“ zugrunde. Eine von Schachter et al. (1994) veröffentlichte Studie belegt die generelle Abnahme der Häufigkeit des ApoE- ϵ 4-Allels in höheren Altersgruppen.

Die Untersuchung der beiden A2M-Polymorphismen ergab keinen Hinweis auf eine mögliche Assoziation mit der AMD. Weder die A2M-Allelverteilung (AMD-Fälle vs. Kontrollen gesamt $\chi^2=0,207$; $p=0,649$) noch die Verteilung der Geno-

typen (AMD-Fälle vs. Kontrollen gesamt $\chi^2=4,6$; $p=0,1$) zeigte signifikante Unterschiede.

5.5 Interpretation

Der Vergleich meiner Ergebnisse mit den bisher publizierten Studien zur Assoziation des ApoE- ϵ 4-Allels mit der AMD ergibt ein widersprüchliches Bild. Obwohl die Studien von Klaver et al. (1998) und Souied et al. (1998) eine Assoziation des ApoE- ϵ 4-Allels mit der AMD nachweisen, ist die Häufigkeitsverteilung des Allels in vier nachfolgenden Assoziationsstudien (Schmidt et al., 2000; Pang et al., 2000; Simonelli et al., 2001; Schultz et al. 2003) sowie in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant. Allerdings belegen auch neuere Studien eindeutig eine Assoziation des Allels mit der AMD (Baird et al., 2004; Zareparsari et al., 2004).

Möglicherweise stellt das ApoE- ϵ 4-Allel einen protektiven Faktor dar, der Effekt ist aber in verschiedenen Populationen unterschiedlich stark ausgeprägt. Für Populationen mit schwächerer Ausprägung sind vermutlich große Studiengruppen notwendig, um bei einer Assoziationsstudie signifikante Frequenzunterschiede zu erhalten.

Weiterhin könnte die Heterogenität der AMD ein Problem bei Assoziationsstudien darstellen. Denkbar wäre, dass unterschiedliche Formen der AMD auch mit unterschiedlichen genetischen Risikokonstellationen assoziiert sind. Eine mögliche Assoziation mit einem Polymorphismus würde in einem großen Patientenkollektiv, das unterschiedliche Formen der AMD enthält, statistisch nicht auffallen. Erst Untersuchungen an ausgewählten Patientengruppen, die nur einen streng definierten Phänotyp enthalten, würden den Effekt sichtbar machen. Einen Beleg hierfür bietet die Studie von Souied et al. (1998), die sich auf die exsudative Form der AMD beschränkt und eine deutlich signifikante Assoziation dieses Phänotyps mit dem ApoE- ϵ 4-Allel nachweist.

Der Aussagewert der bisher durchgeführten Studien zur Assoziation des ApoE- ϵ 4-Allels mit der AMD ist noch begrenzt. Dennoch können Assoziationsstudien dazu beitragen, die genetischen Ursachen der AMD zu entschlüsseln und damit

die Grundlage für neue Therapieansätze schaffen. Eine erfolgversprechende Strategie für zukünftige Assoziationsstudien ist sicherlich die Untersuchung an zahlenmäßig adäquaten und klinisch klar definierten Patientengruppen sowie einwandfreien, altersgemäßen Kontrollpersonen.

6 Literaturverzeichnis

1. *Subfoveal neovascular lesions in age-related macular degeneration. Guidelines for evaluation and treatment in the macular photocoagulation study.* Macular Photocoagulation Study Group. Arch Ophthalmol, 1991. **109**(9): p. 1242-57.
 2. *A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E and beta carotene for age-related cataract and vision loss: AREDS report no. 9.* Arch Ophthalmol, 2001. **119**(10): p. 1439-52.
 3. Adams, M.D., *Serial analysis of gene expression: ESTs get smaller.* Bioessays, 1996. **18**(4): p. 261-2.
 4. Allikmets, R., *Molecular genetics of age-related macular degeneration: current status.* Eur J Ophthalmol, 1999. **9**(4): p. 255-65.
 5. Allikmets, R., et al., *Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration.* Science, 1997. **277**(5333): p. 1805-7.
 6. Anderson, D.H., et al., *Local cellular sources of apolipoprotein E in the human retina and retinal pigmented epithelium: implications for the process of drusen formation.* Am J Ophthalmol, 2001. **131**(6): p. 767-81.
 7. Baird, P.N., et al., *The epsilon2 and epsilon4 alleles of the apolipoprotein gene are associated with age-related macular degeneration.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(5): p. 1311-5.
 8. Bauer, D., et al., *Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR).* Nucleic Acids Res, 1993. **21**(18): p. 4272-80.
 9. Bird, A., *Age-related macular disease.* Br J Ophthalmol, 1996. **80**(1): p. 2-3.
 10. Bird, A.C., *What is the future of research in age-related macular disease?* Arch Ophthalmol, 1997. **115**(10): p. 1311-3.
 11. Bird, A.C., et al., *An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group.* Surv Ophthalmol, 1995. **39**(5): p. 367-74.
 12. Blacker, D., et al., *Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease.* Nat Genet, 1998. **19**(4): p. 357-60.
-

13. Blennow, K., et al., *No association between the alpha2-macroglobulin (A2M) deletion and Alzheimer's disease, and no change in A2M mRNA, protein, or protein expression.* J Neural Transm, 2000. **107**(8-9): p. 1065-79.
 14. Breitner, J.C., et al., *Alzheimer's disease in the National Academy of Sciences-National Research Council Registry of Aging Twin Veterans. III. Detection of cases, longitudinal results, and observations on twin concordance.* Arch Neurol, 1995. **52**(8): p. 763-71.
 15. Chan, D., *Cigarette smoking and age-related macular degeneration.* Optom Vis Sci, 1998. **75**(7): p. 476-84.
 16. Cho, R.J., et al., *Parallel analysis of genetic selections using whole genome oligonucleotide arrays.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3752-7.
 17. Chong, N.H. and A.C. Bird, *Alternative therapies in exudative age related macular degeneration.* Br J Ophthalmol, 1998. **82**(12): p. 1441-3.
 18. Corder, E.H., et al., *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.* Science, 1993. **261**(5123): p. 921-3.
 19. Curcio, C.A., N.E. Medeiros, and C.L. Millican, *Photoreceptor loss in age-related macular degeneration.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996. **37**(7): p. 1236-49.
 20. De Jong, P.T., et al., *Age-related maculopathy: its genetic basis.* Eye, 2001. **15**(Pt 3): p. 396-400.
 21. De Jong, P.T., et al., *Familial aggregation of age-related maculopathy.* Am J Ophthalmol, 1997. **124**(6): p. 862-3.
 22. De La Paz, M.A., et al., *Analysis of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration.* Ophthalmology, 1999. **106**(8): p. 1531-6.
 23. Delcourt, C., et al., *Smoking and age-related macular degeneration. The POLA Study. Pathologies Oculaires Liees a l'Age.* Arch Ophthalmol, 1998. **116**(8): p. 1031-5.
 24. Dentchev, T., et al., *Amyloid-beta is found in drusen from some age-related macular degeneration retinas, but not in drusen from normal retinas.* Mol Vis, 2003. **9**: p. 184-90.
 25. DeRisi, J., et al., *Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer.* Nat Genet, 1996. **14**(4): p. 457-60.
-

26. Dow, D.J., et al., *Alpha-2 macroglobulin polymorphism and Alzheimer disease risk in the UK*. Nat Genet, 1999. **22**(1): p. 16-7; author reply 21-2.
 27. Eichner, J.E., et al., *Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review*. Am J Epidemiol, 2002. **155**(6): p. 487-95.
 28. Evans, J. and R. Wormald, *Is the incidence of registrable age-related macular degeneration increasing?* Br J Ophthalmol, 1996. **80**(1): p. 9-14.
 29. Ferris, F.L., 3rd, *Senile macular degeneration: review of epidemiologic features*. Am J Epidemiol, 1983. **118**(2): p. 132-51.
 30. Fischer, S.G. and L.S. Lerman, *DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(6): p. 1579-83.
 31. Francois, J., *The inheritance of senile macule degeneration*. Ophthalmologica, 1977. **175**(2): p. 67-72.
 32. Fullerton, S.M., et al., *Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism*. Am J Hum Genet, 2000. **67**(4): p. 881-900.
 33. Giannakopoulos, P., et al., *Cerebral cortex pathology in aging and Alzheimer's disease: a quantitative survey of large hospital-based geriatric and psychiatric cohorts*. Brain Res Brain Res Rev, 1997. **25**(2): p. 217-45.
 34. Gibson, A.M., et al., *Lack of association of the alpha2-macroglobulin locus on chromosome 12 in AD*. Neurology, 2000. **54**(2): p. 433-8.
 35. Gorin, M.B., et al., *The genetics of age-related macular degeneration*. Mol Vis, 1999. **5**: p. 29.
 36. Green, W.R., *Histopathology of age-related macular degeneration*. Mol Vis, 1999. **5**: p. 27.
 37. Halimi, G., et al., *Association of APOE promoter but not A2M polymorphisms with risk of developing Alzheimer's disease*. Neuroreport, 2000. **11**(16): p. 3599-601.
 38. Hawkins, B.S., et al., *Epidemiology of age-related macular degeneration*. Mol Vis, 1999. **5**: p. 26.
 39. Heiba, I.M., et al., *Sibling correlations and segregation analysis of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study*. Genet Epidemiol, 1994. **11**(1): p. 51-67.
-

40. Holz, F.G., *Die altersabhängige Makuladegeneration - AMD*. medgen, 2003. **2**: p. 105-110.
 41. Hope, C., et al., *Functional analysis of plasma alpha(2)-macroglobulin from Alzheimer's disease patients with the A2M intronic deletion*. Neurobiol Dis, 2003. **14**(3): p. 504-12.
 42. Hutchinson, J., *Symmetrical central choroido-retinal disease occurring in senile persons*. R Lond Ophthalmic Hosp Rep, 1876. **8**: p. 231-244.
 43. Hyman, L.G., et al., *Senile macular degeneration: a case-control study*. Am J Epidemiol, 1983. **118**(2): p. 213-27.
 44. Iyengar, S.K., et al., *Dissection of genomewide-scan data in extended families reveals a major locus and oligogenic susceptibility for age-related macular degeneration*. Am J Hum Genet, 2004. **74**(1): p. 20-39. Epub 2003 Dec 19.
 45. Johnson, L.V., et al., *The Alzheimer's A beta -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11830-5.
 46. Kessler, C., P.S. Neumaier, and W. Wolf, *Recognition sequences of restriction endonucleases and methylases--a review*. Gene, 1985. **33**(1): p. 1-102.
 47. Kirchhof, B., *Chirurgische Interventionsmöglichkeiten bei der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD)*. medgen, 2003. **2**: p. 157-160.
 48. Klaver, C.C., et al., *Incidence and progression rates of age-related maculopathy: the Rotterdam Study*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(10): p. 2237-41.
 49. Klaver, C.C., et al., *Smoking is also associated with age-related macular degeneration in persons aged 85 years and older: The Rotterdam Study*. Arch Ophthalmol, 1997. **115**(7): p. 945.
 50. Klaver, C.C., et al., *Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration*. Am J Hum Genet, 1998. **63**(1): p. 200-6.
 51. Klaver, C.C., et al., *Is age-related maculopathy associated with Alzheimer's Disease? The Rotterdam Study*. Am J Epidemiol, 1999. **150**(9): p. 963-8.
 52. Klaver, C.C., et al., *Genetic risk of age-related maculopathy. Population-based familial aggregation study*. Arch Ophthalmol, 1998. **116**(12): p. 1646-51.
-

53. Klein, M.L., W.M. Mauldin, and V.D. Stoumbos, *Heredity and age-related macular degeneration. Observations in monozygotic twins*. Arch Ophthalmol, 1994. **112**(7): p. 932-7.
 54. Klein, M.L., et al., *Age-related macular degeneration. Clinical features in a large family and linkage to chromosome 1q*. Arch Ophthalmol, 1998. **116**(8): p. 1082-8.
 55. Kornberg, T., A. Lockwood, and A. Worcel, *Replication of the Escherichia coli chromosome with a soluble enzyme system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(8): p. 3189-93.
 56. Kramer, F., et al., *Mutations in the VMD2 gene are associated with juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best disease) and adult vitelliform macular dystrophy but not age-related macular degeneration*. Eur J Hum Genet, 2000. **8**(4): p. 286-92.
 57. Krott, R. and K. Heimann, *Altersabhängige Makuladegeneration*. Dt Ärztebl, 1996. **93**: p. 1039-1042.
 58. Kuroiwa, S., et al., *ATP binding cassette transporter retina genotypes and age related macular degeneration: an analysis on exudative non-familial Japanese patients*. Br J Ophthalmol, 1999. **83**(5): p. 613-5.
 59. Lalazar, A., et al., *Site-specific mutagenesis of human apolipoprotein E. Receptor binding activity of variants with single amino acid substitutions*. J Biol Chem, 1988. **263**(8): p. 3542-5.
 60. Lander, E.S. and N.J. Schork, *Genetic dissection of complex traits*. Science, 1994. **265**(5181): p. 2037-48.
 61. Landrum, J.T. and R.A. Bone, *Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment*. Arch Biochem Biophys, 2001. **385**(1): p. 28-40.
 62. Lewis, R.A., et al., *Genotype/Phenotype analysis of a photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, in Stargardt disease*. Am J Hum Genet, 1999. **64**(2): p. 422-34.
 63. Liang, P. and A.B. Pardee, *Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction*. Science, 1992. **257**(5072): p. 967-71.
 64. Lockhart, D.J., et al., *Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays*. Nat Biotechnol, 1996. **14**(13): p. 1675-80.
 65. Lucotte, G., F. Loirat, and S. Hazout, *Pattern of gradient of apolipoprotein E allele *4 frequencies in western Europe*. Hum Biol, 1997. **69**(2): p. 253-62.
-

66. Mahley, R.W., *Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology*. Science, 1988. **240**(4852): p. 622-30.
 67. Majewski, J., et al., *Age-related macular degeneration--a genome scan in extended families*. Am J Hum Genet, 2003. **73**(3): p. 540-50. Epub 2003 Jul 25.
 68. Mares-Perlman, J.A., et al., *Serum antioxidants and age-related macular degeneration in a population-based case-control study*. Arch Ophthalmol, 1995. **113**(12): p. 1518-23.
 69. Mares-Perlman, J.A., et al., *Dietary fat and age-related maculopathy*. Arch Ophthalmol, 1995. **113**(6): p. 743-8.
 70. Matthijs, G., et al., *Structure of the human alpha-2 macroglobulin gene and its promotor*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **184**(2): p. 596-603.
 71. Matthijs, G. and P. Marynen, *A deletion polymorphism in the human alpha-2-macroglobulin (A2M) gene*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(18): p. 5102.
 72. Meyers, S.M., *A twin study on age-related macular degeneration*. Trans Am Ophthalmol Soc, 1994. **92**: p. 775-843.
 73. Meyers, S.M., T. Greene, and F.A. Gutman, *A twin study of age-related macular degeneration*. Am J Ophthalmol, 1995. **120**(6): p. 757-66.
 74. Paik, Y.K., et al., *Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(10): p. 3445-9.
 75. Pang, C.P., et al., *The apolipoprotein E epsilon4 allele is unlikely to be a major risk factor of age-related macular degeneration in Chinese*. Ophthalmologica, 2000. **214**(4): p. 289-91.
 76. Passmore, L.A., B. Kaesmann-Kellner, and B.H. Weber, *Novel and recurrent mutations in the tyrosinase gene and the P gene in the German albino population*. Hum Genet, 1999. **105**(3): p. 200-10.
 77. Pauleikhoff, D., et al., *Drusen as risk factors in age-related macular disease*. Am J Ophthalmol, 1990. **109**(1): p. 38-43.
 78. Pauleikhoff, D. and J.M. Koch, *Prevalence of age-related macular degeneration*. Curr Opin Ophthalmol, 1995. **6**(3): p. 51-6.
 79. Pauleikhoff, D., et al., *Biochemical and histochemical analysis of age related lipid deposits in Bruch's membrane*. Ophthalmologie, 1994. **91**(6): p. 730-4.
-

80. Pauleikhoff, D., et al., *A fluorescein and indocyanine green angiographic study of choriocapillaris in age-related macular disease*. Arch Ophthalmol, 1999. **117**(10): p. 1353-8.
 81. Rebeck, G.W., et al., *Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions*. Neuron, 1993. **11**(4): p. 575-80.
 82. Rivera, A., et al., *A comprehensive survey of sequence variation in the ABCA4 (ABCR) gene in Stargardt disease and age-related macular degeneration*. Am J Hum Genet, 2000. **67**(4): p. 800-13.
 83. Roberts, R.J., *Restriction enzymes and their isoschizomers*. Nucleic Acids Res, 1988. **16 Suppl**: p. r271-313.
 84. Roche, P.A., G.S. Salvesen, and S.V. Pizzo, *Symmetry of the inhibitory unit of human alpha 2-macroglobulin*. Biochemistry, 1988. **27**(20): p. 7876-81.
 85. Sackett, C.S. and S. Schenning, *The age-related eye disease study: the results of the clinical trial*. Insight, 2002. **27**(1): p. 5-7.
 86. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
 87. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
 88. Saunders, A.M., et al., *Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease*. Neurology, 1993. **43**(8): p. 1467-72.
 89. Schachter, F., et al., *Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci*. Nat Genet, 1994. **6**(1): p. 29-32.
 90. Schick, J.H., et al., *The genetic epidemiology of age-related maculopathy*. IJGH, 2001. **1**: p. 11-24.
 91. Schmidt, S., et al., *A pooled case-control study of the apolipoprotein E (APOE) gene in age-related maculopathy*. Ophthalmic Genet, 2002. **23**(4): p. 209-23.
 92. Schmidt, S., et al., *Association of the apolipoprotein E gene with age-related macular degeneration: possible effect modification by family history, age, and gender*. Mol Vis, 2000. **6**: p. 287-93.
 93. Schmidt-Erfurth, U., et al., *Photodynamic therapy with verteporfin for choroidal neovascularization caused by age-related macular degeneration: results of retreatments in a phase 1 and 2 study*. Arch Ophthalmol, 1999. **117**(9): p. 1177-87.
-

94. Schultz, D.W., et al., *Lack of an association of apolipoprotein E gene polymorphisms with familial age-related macular degeneration*. Arch Ophthalmol, 2003. **121**(5): p. 679-83.
 95. Schwartz, D., *The Beaver Dam Eye Study: the relation of age-related maculopathy to smoking*. Surv Ophthalmol, 1994. **39**(1): p. 84-5.
 96. Seddon, J.M., U.A. Ajani, and B.D. Mitchell, *Familial aggregation of age-related maculopathy*. Am J Ophthalmol, 1997. **123**(2): p. 199-206.
 97. Seddon, J.M., et al., *Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration*. Eye Disease Case-Control Study Group. Jama, 1994. **272**(18): p. 1413-20.
 98. Seddon, J.M., et al., *A prospective study of cigarette smoking and age-related macular degeneration in women*. Jama, 1996. **276**(14): p. 1141-6.
 99. Shroyer, N.F., et al., *The rod photoreceptor ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, and retinal disease: from monogenic to multifactorial*. Vision Res, 1999. **39**(15): p. 2537-44.
 100. Simonelli, F., et al., *Apolipoprotein E polymorphisms in age-related macular degeneration in an Italian population*. Ophthalmic Res, 2001. **33**(6): p. 325-8.
 101. Smith, J.D., *Apolipoprotein E4: an allele associated with many diseases*. Ann Med, 2000. **32**(2): p. 118-27.
 102. Smith, W., et al., *Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents*. Ophthalmology, 2001. **108**(4): p. 697-704.
 103. Smith, W., P. Mitchell, and C. Rochester, *Serum beta carotene, alpha tocopherol, and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study*. Am J Ophthalmol, 1997. **124**(6): p. 838-40.
 104. Snow, K.K. and J.M. Seddon, *Do age-related macular degeneration and cardiovascular disease share common antecedents?* Ophthalmic Epidemiol, 1999. **6**(2): p. 125-43.
 105. Snow, K.K. and J.M. Seddon, *Age-related eye diseases: impact of hormone replacement therapy, and reproductive and other risk factors*. Int J Fertil Womens Med, 2000. **45**(5): p. 301-13.
 106. Sommer, A., et al., *Racial differences in the cause-specific prevalence of blindness in east Baltimore*. N Engl J Med, 1991. **325**(20): p. 1412-7.
 107. Souied, E.H., et al., *The epsilon4 allele of the apolipoprotein E gene as a potential protective factor for exudative age-related macular degeneration*. Am J Ophthalmol, 1998. **125**(3): p. 353-9.
-

108. Stone, E.M., et al., *Allelic variation in ABCR associated with Stargardt disease but not age-related macular degeneration*. Nat Genet, 1998. **20**(4): p. 328-9.
 109. Strittmatter, W.J., et al., *Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(17): p. 8098-102.
 110. Tsai, M.S., et al., *Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease*. Am J Hum Genet, 1994. **54**(4): p. 643-9.
 111. Vingerling, J.R., et al., *Age-related macular degeneration and smoking. The Rotterdam Study*. Arch Ophthalmol, 1996. **114**(10): p. 1193-6.
 112. Weeks, D.E., et al., *Age-related maculopathy: an expanded genome-wide scan with evidence of susceptibility loci within the 1q31 and 17q25 regions*. Am J Ophthalmol, 2001. **132**(5): p. 682-92.
 113. Weisgraber, K.H., Y.M. Newhouse, and R.W. Mahley, *Apolipoprotein E genotyping using the polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide probes*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **157**(3): p. 1212-7.
 114. Yates, J.R. and A.T. Moore, *Genetic susceptibility to age related macular degeneration*. J Med Genet, 2000. **37**(2): p. 83-7.
 115. Zarepari, S., et al., *Association of apolipoprotein E alleles with susceptibility to age-related macular degeneration in a large cohort from a single center*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(5): p. 1306-10.
 116. Ziegler, S., et al., *Analysis of genetic association of apolipoprotein E and alpha-2 macroglobulin with age-related macular degeneration*. Medgen, 2000. **12** (1): p.99.
 117. Zurdel, J., et al., *CST3 genotype associated with exudative age related macular degeneration*. Br J Ophthalmol, 2002. **86**(2): p. 214-9.
 118. Zurdel, J. and G. Richard, *Genetic studies of age related macular degeneration*. Ophthalmologe, 2002. **99**(8): p. 636-41.
-

- 1, Fundusaufnahmen mit freundlicher Genehmigung von Dr. Claudia Keilhauer, Universitäts-Augenklinik Würzburg
- 2, in Anlehnung an eine Abbildung von Prof. Weber, Institut für Humangenetik , Universität Würzburg

Alle übrigen Abbildungen wurden selbständig entworfen und umgesetzt.

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem meinem Doktorvater Prof. Bernhard Weber, der meine Arbeit hervorragend betreute, stets den Überblick bewahrte, meine Fragen auf den Punkt brachte, verständlich beantwortete und während der langen Promotionsphase viel Geduld an den Tag legte.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern der „Arbeitsgruppe Weber“ am Institut für Humangenetik für die ständige Hilfsbereitschaft, die geduldigen Erklärungen und Einweisungen in die Laborgeheimnisse und die nette Atmosphäre, die mir in guter Erinnerung geblieben ist.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Grehn für die unkomplizierte Übernahme des Koreferats dieser Arbeit.

Zuletzt möchte ich Frau Dr. Keilhauer und Herrn PD Dr. Schrader für Ihre spontane Hilfsbereitschaft danken.

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich diese Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation nicht, weder vollständig noch teilweise, an einer anderen Fakultät mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erwerben, vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich keine früheren akademischen Grade erworben habe und dies auch nicht versucht habe. Mir wurde außerdem kein akademischer Grad entzogen.

Ein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder ein Disziplinarverfahren wurde noch nie gegen mich eingeleitet.

Regensburg, den 24. Oktober 2004

ZUR PERSON

- Geboren am 29. Februar 1976 in Schweinfurt
- Eltern: Ursula Ziegler, Volksschullehrerin
Dr.rer.nat. Rolf Ziegler, Studiendirektor
- Familienstand: ledig



AUSBILDUNG

- 1982-1986 Grundschule Volkach
- 1986-1995 Gymnasium Frankenlandschulheim Schloß Gaibach
- 1995-1996 Studium der Kunstgeschichte, Philosophie und Germanistik an der der Julius Maximilians Universität Würzburg
- 1996-2003 Studium der Humanmedizin an der Julius Maximilians Universität Würzburg

FAMULATUREN

- Allgemein Chirurgie im Kreiskrankenhaus Gerolzhofen, April 2000
 - Institut für Rechtsmedizin der Charité, Humboldt Universität Berlin, August 2000
 - Praxis für Allgemeinmedizin Dr.Kircher/Dr.Reiche, Prichsenstadt, März 2001
 - Moorfields Eye Hospital, London, August 2001
 - Psychiatrische Klinik Bamberg, September 2001
-

PRAKTISCHES JAHR

- Chirurgische Universitätsklinik Würzburg
- Augenklinik der Universität Würzburg
- Zürcher Höhenklinik Wald, Schweiz

ÄRZTIN IM PRAKTIKUM

- 08-12/2003 Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Innenstadt
- 01-09/2004 Klinik und Poliklinik für Herz-Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie der Universität Regensburg

ASSISTENZZEIT

seit 10/2004 Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Herz-Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie der Universität Regensburg

PUBLIKATION

Die vorliegende Arbeit wurde als Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik mit dem Titel:

„Analysis of genetic association of apolipoprotein E and alpha-2-macroglobulin with age-related macular degeneration“

im März 2000 in Lübeck vorgestellt.

