

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. H. Beckmann

**Potentielle genetische Marker für die sporadische Form der  
Demenz vom Alzheimer-Typ**

**Inaugural - Dissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

**Alexander Harsányi**

aus

Veitshöchheim

Würzburg, Mai 2003

Referent:	Prof. Dr. P. Riederer
Koreferent	Prof. Dr. J. Böning
Dekan	Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 25. November 2003

Der Promovend ist Arzt

Für meinen Vater und für Christel

# Inhalt

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Demenz vom Alzheimer-Typ als gesellschaftliche Herausforderung .....	1
1.2 Genetische Veränderungen als Risikofaktoren für die Entwicklung einer DAT .....	2
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>6</b>
2.1 Material.....	6
2.1.1 Nukleinsäuren.....	6
2.1.1.1 Patienten-DNA .....	6
2.1.1.2 PCR-Nukleotidmix (dNTP).....	7
2.1.1.3 DNA-Längenstandards .....	7
2.1.1.4 Primersequenzen.....	9
2.1.2 Enzyme .....	10
2.1.3 Lösungen und Puffer .....	12
2.1.4 Materialien für elektrophoretische Techniken.....	13
2.1.5 Materialien für die Extraktion von genomischer DNA aus Blut.....	14
2.2 Methoden.....	15
2.2.1 DNA-Extraktion aus Vollblut.....	16
2.2.2 Polymerasenkettenreaktion (PCR) .....	17
2.2.2.1 Apolipoprotein CI (Apo CI) .....	19
2.2.2.2 $\alpha_1$ -Antichymotrypsin (ACT) .....	20
2.2.2.3 Exon 8 des LDL-Rezeptorgens (8-LDL).....	21
2.2.2.4 Exon 13 des LDL-Rezeptorgens (13-LDL).....	22
2.2.2.5 Lipoproteinlipase- <i>Hind</i> III-Genlocus (Lip- <i>Hind</i> III).....	23
2.2.2.6 Lipoproteinlipase- <i>Pvu</i> II-Genlocus (Lip- <i>Pvu</i> II).....	24
2.2.2.7 Apolipoprotein E (Apo E) .....	25
2.2.3 Spaltung der amplifizierten DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	26
2.2.3.1 Apolipoprotein CI (Apo CI) .....	26
2.2.3.2 $\alpha_1$ -Antichymotrypsin (ACT) .....	27
2.2.3.3 Exon 8 des LDL-Rezeptorgens (8-LDL).....	28
2.2.3.4 Exon 13 des LDL-Rezeptorgens (13-LDL).....	28
2.2.3.5 Lipoproteinlipase- <i>Hind</i> III-Genlocus (Lip- <i>Hind</i> III).....	29
2.2.3.6 Lipoproteinlipase- <i>Pvu</i> II-Genlocus (Lip- <i>Pvu</i> II).....	30
2.2.3.7 Apolipoprotein E (Apo E) .....	30
2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese .....	31
2.2.4.1 Apolipoprotein CI (Apo CI) .....	32
2.2.4.2 $\alpha_1$ -Antichymotrypsin (ACT) .....	33
2.2.4.3 Exon 8 des LDL-Rezeptorgens (8-LDL).....	34
2.2.4.4 Exon 13 des LDL-Rezeptorgens (13-LDL).....	34
2.2.4.5 Lipoproteinlipase- <i>Hind</i> III-Genlocus (Lip- <i>Hind</i> III).....	35
2.2.4.6 Lipoproteinlipase- <i>Pvu</i> II-Genlocus (Lip- <i>Pvu</i> II).....	36
2.2.4.7 Apolipoprotein E (Apo E) .....	36
2.2.5 Statistische Methoden.....	37

<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>43</b>
4.1 Das Apolipoprotein-E-Allel 4 als etablierter Risikofaktor für die DAT .....	43
4.2 Apolipoprotein CI als potentieller Suszeptibilitätsmarker .....	46
4.3 $\alpha_1$ -Antichymotrypsin als Kandidatengen für die DAT .....	47
4.4 Das LDL-Rezeptor-Gen und mögliche Assoziation der DAT mit dem Fettstoffwechsel .....	48
4.5 Das Lipoproteinlipase-Gen zeigt keine Korrelation zur DAT.....	50
4.6 Methodische Schwierigkeiten .....	50
4.7 Die prädiktive Bedeutung genetischer Marker und genetischer Risikofaktoren bei der DAT .....	51
4.8 Bedeutung eines Risikomodells für die DAT .....	52
4.9 Weitere für die Entwicklung einer DAT möglicherweise relevante Gene.....	53
4.9.1 Das Präsenilin-1-Gen.....	53
4.9.2 Das Amyloid-Precursor-Protein-Gen .....	53
4.9.3 Das Butyrylcholinesterase-Gen .....	54
4.9.4 Das $\alpha_2$ -Makroglobulin-Gen .....	54
4.9.5 Das Bleomycin-Hydrolase-Gen.....	54
4.9.6 Das Stickoxid-Synthase-Gen.....	55
4.10 Ausblick.....	55
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>56</b>
<b>6. Literatur .....</b>	<b>58</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1 Die Demenz vom Alzheimer-Typ als gesellschaftliche Herausforderung**

Seit der Beschreibung der „Dementia senilis“ durch Aloys Alzheimer 1907 entwickelte sich die später nach ihm benannte Demenz vom Alzheimer Typ (DAT) in den letzten Jahrzehnten zu einem globalen und gesellschaftlich relevanten Problem.

Mit der steigenden Lebenserwartung, den sinkenden Geburtenraten und der damit verbundenen Überalterung der Populationen in den westlichen Industrienationen wird für uns die DAT, abgesehen von den Einzelschicksalen, auch unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten (Sou tre et al., 1999) in der Zukunft eine große Herausforderung darstellen.

In den letzten Jahren durchgeführte Meta-Analysen von Längsschnittstudien aus Europa, Nordamerika und Asien zur Abschätzung der Verteilung des Erkrankungsrisikos in der Bevölkerung ergaben einen Anstieg der Inzidenz der Demenzen pro tausend Personen und Jahr von 0,33 Neuerkrankungen in der Altersgruppe 55-59 Jahre bis auf 86,79 Neuerkrankungen in der Altersgruppe über 90 Jahre (Gao et al., 1998). Grundlage der Bewertung waren dabei die DSM-III-Kriterien (Zaudig et al., 1991). Eine weitere Meta-Analyse nach Jorm und Jolley (1998) kommt für den europäischen Raum zu ähnlichen Ergebnissen. Der Anteil der DAT an allen Demenzformen beläuft sich hinsichtlich der Zahl der Neuerkrankungen in den westlichen Industrieländern auf mehr als 70% (Ott et al., 1998; Rocca et al., 1998). Dabei steigt der Anteil der DAT mit zunehmendem Alter immer deutlicher an. Nach Jorm und Jolley (1998) stieg in den europäischen Studien die Inzidenz mittelschwerer und schwerer Demenzen von 3,6 pro 1.000 im Jahr in der Gruppe der 65-69j hrigen bis auf 66,1 pro 1.000 im Jahr unter den 90-94j hrigen.. Unter Einbeziehung der leichten Demenzformen kommt es sogar zu einer Verdreifachung der Inzidenzraten in allen Alterstufen. So stieg die Inzidenz von 9,1 pro 1.000 im Jahr in der Gruppe der 65-69j hrigen auf 179,8 pro 1.000 unter den 90-94j hrigen.

Angesichts der ausgeprägten Altersabhängigkeit hinsichtlich des Erkrankungsrisikos der Demenzen muss man also davon ausgehen, dass infolge der Überalterung der Bev lke-

rung in den betrachteten Populationen auch die Demenzen und damit insbesondere die DAT immer häufiger auftreten und noch auftreten werden.

Aufgrund des progredienten Charakters kommt es im Verlauf der Erkrankung zu einem zunehmenden Grad an Hilflosigkeit sowie einem Verlust der Selbständigkeit, welcher häufig in eine Aufnahme in ein Alten- oder Pflegeheim mündet. Nach Bickel (1995) trifft dies in mehr als 50% der Demenz-Fälle zu. Umgekehrt leiden ca. 17% bis 36% der Altenheim- und 50% bis ca. 70% der Pflegeheimbewohner an einer Demenz, was wiederum mit einer deutlichen Intensivierung der Pflegemaßnahmen verbunden ist. Diese Entwicklung ist bei wahrscheinlich steigender Tendenz mit hohen gesamtwirtschaftlichen Kosten verbunden. Nach Ernst und Hay (1994) ergaben sich im Zeitraum von 1983 bis 1991 in den Vereinigten Staaten jährliche Gesamtkosten für die DAT von 67,3 Mrd. US-Dollar, die Kosten pro Patient betragen im Jahr 47.581 US-Dollar. In skandinavischen Ländern ergaben sich nach Winblad et al. (1996) ähnlich hohe Aufwendungen.

Unter diesen Aspekten wird die Bedeutung der Demenz vom Alzheimer Typ in der Zukunft als gesellschaftlich und volkswirtschaftlich relevantes Problem deutlich. Im Hinblick darauf muss neben der Entwicklung von therapeutischen Ansätzen, die derzeit lediglich einen palliativen Charakter haben, vor allem die Klärung der Ätiopathogenese im Vordergrund stehen. Verbunden damit ist aber auch die Erfassung von Risikofaktoren, die das Auftreten der Erkrankung insbesondere in Bezug auf das Erkrankungsalter beeinflussen, und deren Kenntnis letztlich der Erarbeitung weiterführender Therapiekonzepte bzw. präventiver Maßnahmen dienen kann.

## **1.2 Genetische Veränderungen als Risikofaktoren für die Entwicklung einer DAT**

Neben dem Lebensalter als Hauptrisikofaktor gelten derzeit genetische Risikofaktoren als die bedeutsamsten, wohingegen beispielsweise Lebensstil (Alkohol-, Nikotinkonsum, Ernährungsgewohnheiten), Umwelteinflüsse, berufliche Exposition gegenüber Schadstoffen, Medikamente und Nebenerkrankungen oder Unfallfolgen einerseits noch unzureichend untersucht sind, sich aber andererseits auch bereits als eher unwahrscheinliche Risiken herauskristallisiert haben.

In Bezug auf die Erbllichkeit der DAT konnte durch Familienstudien gezeigt werden, dass bei der sporadischen Form der DAT, Verwandte ersten Grades ein zwei- bis dreifach erhöhtes Erkrankungsrisiko im Vergleich zu Kontrollen haben (Mayeux et al. 1991; Henderson et al., 1992; Silverman et al., 1994 a, b). Weiterhin konnten genetische Marker als Grundlage zur Identifizierung krankheitsrelevanter Gene gefunden werden. Kopplungsstudien zahlreicher chromosomaler Merkmale in DAT-Stammbäumen konnten das Gen für das Amyloid-Precursor-Protein (APP) auf Chromosom 21 (z.B. Levy et al., 1990; Goate et al., 1991; Murrell et al., 1991), das Präsenilin-1-Gen (PS1) auf Chromosom 14 (z.B. Cruts et al., 1995; Perez-Tur et al., 1995; Sherrington et al., 1995), sowie das Präsenilin-2-Gen (PS2) auf Chromosom 1 (Levy-Lahad et al., 1995; Rogaev et al., 1995) als relevante Gene für die früh beginnende, familiäre Form der Demenz vom Alzheimer-Typ in den hoch belasteten Familien identifizieren. Die Zahl der dabei gefundenen Mutationen in den verschiedenen Exons ist aufgrund des großen Forschungsinteresses, und -bedarfs immer noch stetig im Steigen begriffen.

Assoziationsstudien schließlich zeigten ein gehäuftes Auftreten spezifischer genetischer Marker bei Patienten mit sporadischen Formen der DAT mit spätem Erkrankungsbeginn (late onset) im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden.

Im Hinblick auf genetische Risikofaktoren für die DAT darf diesbezüglich der mittlerweile gut untersuchte Polymorphismus des Apolipoprotein E als gesichert gelten. In einer Assoziationsstudie von Corder et al. konnte 1993 beim Vergleich von Patienten mit einer familiär gehäuft aufgetretenen DAT und einer Kontrollgruppe, ein potentiell krankheitsrelevantes Gen auf Chromosom 19 lokalisiert werden, welches später als das Apolipoprotein-E-Gen identifiziert wurde. Ein vermehrtes Auftreten des Apolipoprotein-E4-Allels bei DAT-Patienten konnte in der Folge sowohl bei familiär gehäuften, als auch bei sporadischen Fällen nachgewiesen werden (Saunders et al., 1993 a, b; St. Clair et al., 1995). Weiterhin wurde gezeigt, dass homozygote Träger des Apo-E4-Allels ein maximales Erkrankungsrisiko besitzen, während heterozygote Träger gegenüber Individuen in der gleichen Altersgruppe ohne dieses Allel immer noch ein deutlich erhöhtes Risiko aufweisen. Wie erwähnt, gilt das Apo E4-Allel nicht nur als Risikofaktor für das Auftreten einer sporadischen DAT, sondern auch als Prädiktor für das familiär gehäufte Auftreten der DAT. Neben dem Apo E4-Allel gibt es Hinweise für weitere genetische Risikofaktoren (Farrer et al., 1995; Houlden et al., 1994). Nahe liegend erscheint eine



Assoziation mit weiteren Proteinen des Fettstoffwechsels. So sind Proteine wie Apolipoprotein E und CI als Bestandteile fast aller Typen von Lipoproteinen mitbeteiligt am Transport von Lipiden wie Phospholipiden, Glycolipiden und Cholesterin, den Hauptbestandteilen von Zellmembranen, die in die Pathogenese der DAT eindeutig involviert sind (Ginsberg et al., 1993; Roth et al., 1995; McLaurin and Chakrabartty, 1996). So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass verschiedene Apolipoproteine sich in ihrer Bindungsfähigkeit an  $\beta$ -Amyloid untereinander vertreten und somit die Ablagerung von  $\beta$ -Amyloid-Aggregaten beeinflussen können (Harr et al., 1996). Dies lässt die Untersuchung weiterer Apolipoproteine notwendig erscheinen.

In der letzten Zeit wurde u.a. auch das Gen des Proteaseinhibitors Alpha-1-Antichymotrypsin, der in den Amyloid-Plaques vermehrt exprimiert wird und möglicherweise bei der Polymerisation des  $\beta$ -Amyloidpeptids beteiligt ist, hinsichtlich der sporadischen Form der DAT untersucht (Altstiel et al., 1995; Kamboh et al., 1995; Thome et al., 1995; DeKosky et al., 1996; Gabriel et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden neben dem bereits anerkannten Apolipoprotein-E-Allel 4 und dem häufiger diskutierten Gen des Apolipoprotein CI und des Alpha-1-Antichymotrypsin weitere Genvarianten von Proteinen aus dem Fettstoffwechsel untersucht, und zwar die Exons 8 und 13 des LDL-Rezeptor-Gens, sowie die Introns 6 und 8 des Lipoproteinlipase-Gens.

Hinsichtlich der Untersuchung des Gewichtes von potentiell krankheitsrelevanten Genpolymorphismen für das Auftreten der DAT kommt sog. Assoziationsstudien besondere Bedeutung zu. Dies erklärt sich aus der Tatsache, dass Kopplungsuntersuchungen bislang nur bei den früh beginnenden Formen der DAT erfolgreich waren, während jedoch die spät beginnenden Formen deutlich häufiger sind. Die statistische Wahrscheinlichkeit, hoch belastete Familien mit spätem Erkrankungsbeginn und genügend lebende Probanden zur Untersuchung zu finden, sind äußerst gering. Da aber auch bei den spät beginnenden Formen der DAT eine erhöhte familiäre Belastung mit erhöhtem Erkrankungsrisiko für Angehörige ersten Grades besteht, liegt die Relevanz genetischer Faktoren auf der Hand. Als Werkzeug zur Ermittlung von krankheitsrelevanten Genen dienen in diesem Fall die Assoziationsstudien. Hierbei wird - wie auch in der vorliegenden Arbeit - die Häufigkeit eines auftretenden Merkmals (in diesem Fall eines genetischen

Polymorphismus) mit der Häufigkeit der Erkrankung in derselben Stichprobe und bei Kontrollprobanden verglichen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

Die aufgeführten Chemikalien waren von der Qualitätsstufe *pro analysi*. Die Bezugsquelle war, soweit nicht anders angegeben, die Firma Sigma, Deisenhofen.

#### 2.1.1 Nukleinsäuren

##### 2.1.1.1 Patienten-DNA

Die Untersuchung wurde an 63 DAT-Patienten (43 Frauen, 20 Männern) mit einem Durchschnittsalter von  $73,7 \pm 9,3$  Jahren durchgeführt, die dem Patientengut der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Würzburg entstammten. Die Untersuchung wurde von der Ethikkommission genehmigt, die Probanden und die Angehörigen waren über die Ziele der Studie aufgeklärt. Die Einwilligung erfolgte entweder durch den Probanden selbst oder deren Angehörige bzw. den gesetzlichen Betreuer. Für die Untersuchung wurde dabei genomische DNA, die aus EDTA-Blut nach Standard-Methoden gewonnen wurde, verwendet. Die klinische Diagnose DAT wurde anhand standardisierter diagnostischer Verfahren unter Berücksichtigung der Anamnese, einer psychiatrischen und neurologischen Untersuchung, neuropsychologischer Untersuchungen und Bluttests (Blutbild, Elektrolyte, Leberfunktionstests, Schilddrüsenhormone, Vitamin B<sub>12</sub>, Folsäure, harnpflichtige Substanzen, Blutfette, HIV-Serologie) zum Ausschluss anderer Demenzformen gestellt. Alle der DAT-Gruppe zugehörigen Patienten erfüllten die NINCDS-ADRDA und ICD-10-Kriterien für eine als wahrscheinlich anzunehmende Demenz vom Alzheimer-Typ (McKhann et al., 1984; Dilling et al., 1991). Alle Patienten wurden einer cranialen Computertomographie unterzogen, um differentialdiagnostisch strukturelle cerebrale Veränderungen, die mit der Diagnose DAT nicht vereinbar sind, auszuschließen. Fälle mit Territorialinfarkten oder mit mehr als einem lakunären Infarkt wurden nicht mit aufgenommen. Zum klinischen Ausschluss der Multiinfarkt-Demenz wurde nur Patienten zugelassen, die nach der modifizierten Hachinski Ischämie-Skala einen Wert  $< 4$  (Hachinski et al., 1975; Rosen et al., 1980) erzielten. Das Erkrankungsalter lag bei  $66,6 \pm 11,9$  Jahren. Vierundzwanzig Patienten wurden der DAT mit frühem Krankheitsbeginn ('early

onset', also < 65 Jahre), 39 Patienten der DAT mit spätem Krankheitsbeginn ('late onset', also  $\geq$  65 Jahre) zugeordnet. Zum Vergleich der gewonnenen Daten wurden die genetischen Polymorphismen ebenso an einer Kontrollgruppe, bestehend aus 162 psychiatrischen Patienten (100 Frauen, 62 Männer) mit einem mittleren Alter von  $70,6 \pm 8,2$  Jahren bestimmt. Die Probanden der Kontrollgruppe litten dabei unter affektiven Störungen, Psychosen, Persönlichkeitsstörungen, Entwicklungsstörungen und Demenzen bei M. Parkinson. Um die Spezifität der Befunde zu gewährleisten, wurden die Kontrollpersonen bewusst aus einem psychiatrischen Kollektiv gewählt.

#### **2.1.1.2 PCR-Nukleotidmix (dNTP)**

Es wurde ein vorgefertigter Nukleotidmix von Boehringer Mannheim, bestehend aus den Natriumsalzen von dATP, dCTP, dGTP und dTTP in einer Konzentration zu je 10 mmol/l, pH 7,0 verwendet, der direkt einer Polymerase-Kettenreaktion beigemischt werden kann.

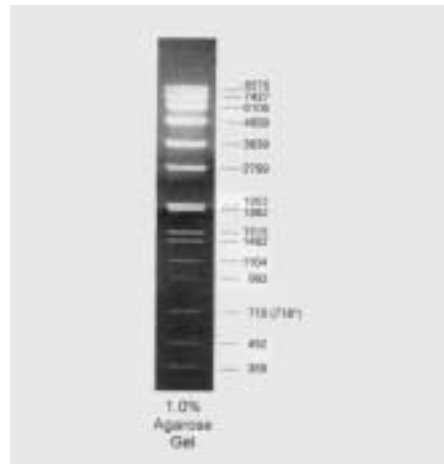
#### **2.1.1.3 DNA-Längenstandards**

##### *DNA molecular weight marker VII*

Es wurde ein DNA-Fragmentgemisch aus Spaltung von SPP1-DNA mit Restriktionsendonuklease *EcoRI* verwendet. Das Gemisch enthält 17 Fragmente mit folgender Anzahl von Basenpaaren (1 Basenpaar = 660 Dalton) in Tris-HCl, 10 mmol/l; EDTA, 1 mmol/l; pH 8,0:

8576, 7427, 6106, 4899, 3639, 2799, 1953, 1882, 1515, 1482, 1164, 992, 710, 492, 359.

Das DNA-Fragmentgemisch zeigt in der Agarose-Gelelektrophorese ein typisches Muster mit 15 Banden.



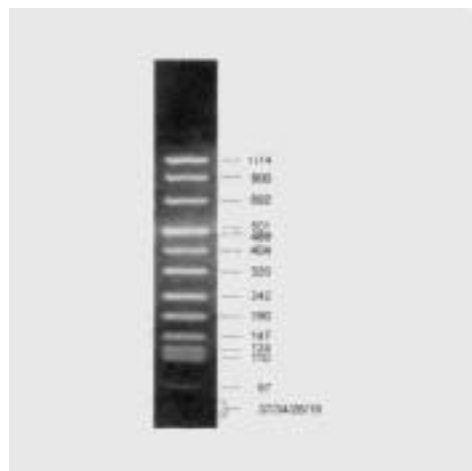
**Abb. 2-1** Auftrennung von 1 µg DNA-Längenstandard VII auf einem 1 %-igen Agarosegel. Ethidiumbromid-Färbung.

*DNA molecular weight marker VIII*

Zusätzlich wurde ein DNA-Fragmentgemisch aus Spaltung von pUCBM21-DNA mit der Restriktionsendonuklease *HpaII* und mit den Restriktionsendonukleasen *DraI* plus *HindIII* benutzt. Das Gemisch enthält 17 Fragmente mit folgender Anzahl von Basenpaaren in Tris-HCl, 10 mmol/l; EDTA, 1 mmol/l; pH 8,0:

1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67, 37,34, 26, 19.

Das DNA-Fragmentgemisch zeigt in der Agarose-Gelelektrophorese ein typisches Muster mit 13 Banden.



**Abb. 2-2** Auftrennung von 1 µg DNA-Längenstandard VIII auf einem 1,8 %-igen Agarosegel. Ethidiumbromid-Färbung.

**2.1.1.4 Primersequenzen**

Zur PCR-Genotypisierung wurden die in Tab. 2.1 dargestellten Primer verwendet

Gene Sequenz 5'-3' (je ein forward und reverse Primer)

---

Apolipoprotein E  
(Apo E) TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCA  
ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACTACTGCCA

Apolipoprotein CI  
(Apo CI) TTTGAGCTCGGCTCTTGAGACAGGAA  
GGTCCCGGGCACTTCCCTTAGCCCCA

$\alpha_1$ -Antichymotrypsin  
(ACT) CAGAGTTGAGAATGGAGA  
TTCTCCTGGGTCAGATTC

LDL-Rezeptor  
(Exon 8) AATGTCGACCAAGCCTCTTTCTCTCTCTTC  
AAGTCGACCCACCCGCCGCTTCCCGTGC

LDL-Rezeptor  
(Exon 13) GTCATCTTCCTTGCTGCCTGTTA  
GTTTCCACAAGGAGGTTTCAAGGTTC

Lipoproteinlipase  
(Intron 6) ATGGCACCCATGTGTAAGGTG  
GTGAACTTCTGATAACAATCTC

Lipoproteinlipase  
(Intron 8) TGAAGCTCAAATGGAAGAGT  
TACAAGCAAATGACTAAA

---

**Tab. 2-1 PCR : Sequenzen der verwendeten Primer**

## 2.1.2 Enzyme

### DNA-Polymerase

Folgende DNA-Polymerase wurde bei allen PCR-Untersuchungen eingesetzt  
Taq 2000™ DNA Polymerase ultra pur thermostabile DNA-Polymerase  
(Stratagene Heidelberg, 5 U/μl, 200 U),

### Restriktionsendonukleasen

Zur Digestion der PCR-Produkte wurden folgende Restriktionsendonukleasen benutzt

#### *CfoI (HhaI)*

Restriktionsendonuklease aus *Clostridium formicoaceticum* von Boehringer Mannheim (1000 U; 10 U/μl); erkennt die Sequenz GCG/C und erzeugt Fragmente mit 3'-kohäsiven Enden; *CfoI* ist ein Isoschizomer von *HhaI*; gelagert in Tris-HCl, 20 mM; NaCl, 100 mM; EDTA, 1 mM; 2-Mercaptoethanol, 10 mM; Glycerin, 50% (v/v); pH ca. 7,5 (bei 4° C); Inkubationspuffer **L** im SuRE /Cut 5-Puffer-System von Boehringer Mannheim

#### *HpaI*

Restriktionsendonuklease aus *Haemophilus parainfluenzae* von Boehringer Mannheim (500 U, 3-10 U/μl, 50 - 166 μl); erkennt die Sequenz GTT/AAC und erzeugt Fragmente mit glatten Enden; gelagert in Tris-HCl, 20 mM; KCl, 50 mM; EDTA, 0,5 mM; 2-Mercaptoethanol, 5 mM; Glycerin, 50 % (v/v); pH ca. 7,5 (bei +4°C); Inkubationspuffer **A** im SuRE /Cut 5-Puffer-System von Boehringer Mannheim

#### *MvaI (Bst NI)*

Restriktionsendonuklease aus *Micrococcus varians* RFL 19 von Boehringer Mannheim (5000 U; 8-12 U/μl; 416-621μl); erkennt die Sequenz CC(<sup>A</sup><sub>T</sub>)GG und erzeugt Fragmente mit 5'-kohäsiven Enden; gelagert in Kaliumphosphat, 10 mM; KCl, 400 mM; EDTA, 0,1 mM; Dithiothreit, 1 mM; Rinderserumalbumin, 200 μg/ml; Glycerin, 50 % (v/v); pH 7,0 (bei +4°C); Inkubationspuffer **H** im SuRE /Cut 5-Puffer-System von Boehringer Mannheim

*StuI*

Restriktionsendonuklease aus *Streptomyces nodosus* von Boehringer Mannheim (2500 U; 40 U/ $\mu$ l; 62,5  $\mu$ l); erkennt die Sequenz AGG/CCT und erzeugt Fragmente mit glatten Enden; gelagert in Tris HCl, 20 mM; NaCl, 100 mM; EDTA, 0,1 mM; 2-Mercaptoethanol, 10 mM; Triton®X-100 (v/v), 0,01%; Glycerin (v/v), 50 %; pH ca. 7,5 (bei +4°C); Inkubationspuffer **B** im SuRE /Cut 5-Puffer-System von Boehringer Mannheim

*AvaII*

Restriktionsendonuklease aus *Anabaena variabilis* von Boehringer Mannheim (500 U; 5 U/ $\mu$ l; 100  $\mu$ l); erkennt die Sequenz G/G(<sup>A</sup><sub>T</sub>)CC und erzeugt Fragmente mit 5'-kohäsiven Enden; gelagert in Tris-HCl, 20 mM; NaCl, 100 mM; EDTA, 0,1 mM; 2-Mercaptoethanol, 10 mM; Triton®X-100 (v/v), 0,01%; Glycerin (v/v), 50 %; pH ca. 8,0 (bei +4°C); Inkubationspuffer **A** im SuRE /Cut 5-Puffer-System von Boehringer Mannheim

*PvuII*

Restriktionsendonuklease aus *Proteus vulgaris* von Boehringer Mannheim (5000 U; 40 U/ $\mu$ l; 125  $\mu$ l); erkennt die Sequenz CAG/CTG und erzeugt Fragmente mit glatten Enden; gelagert in Tris-HCl, 20 mM; NaCl, 100 mM; EDTA, 1 mM; 2-Mercaptoethanol, 10 mM; Triton®X-100 (v/v), 0,01%; Glycerin (v/v), 50 %; pH ca. 7,7 (bei +4°C); Inkubationspuffer **M** im SuRE /Cut 5-Puffer-System von Boehringer Mannheim

*HindIII*

Restriktionsendonuklease aus *Haemophilus influenzae* Rd com-10 von Boehringer Mannheim (10.000 U; 40 U/ $\mu$ l; 250  $\mu$ l); erkennt die Sequenz A/AGCTT und erzeugt Fragmente mit 5'-kohäsiven Enden; gelagert in Tris-HCl, 10 mM; NaCl, 250 mM; EDTA, 0,1 mM; Dithioerythrit, 1 mM; Glycerin (v/v), 50 %; pH ca. 7,5 (bei +4°C); Inkubationspuffer **B** im SuRE /Cut 5-Puffer-System von Boehringer Mannheim



### 2.1.3 Lösungen und Puffer

#### Wasser

Puffer und Stammlösungen für PCR-Reaktionen oder Enzymdigestionen mit kleinen Volumina wurden mit sterilem Wasser (aqua ad iniectabilia) angesetzt. Für alle anderen Lösungen wurde einfach destilliertes Wasser verwendet.

#### Inkubationspuffer für Restriktionsendonukleasen

Es wurden die von der Firma Boehringer Mannheim mitgelieferten Puffer **A**, **B**, **L**, **M** und **H** nach dem sog. SuRe/Cut-Puffer-System in der folgenden Zusammensetzung verwendet:

Puffer <b>A</b>	Tris-Acetat, 33 mM; K-Acetat, 66 mM; Mg-Acetat, 10 mM; Dithiothreit, 0,5 mM; pH 7,9 (bei 37°C)
Puffer <b>B</b>	Tris-HCl, 10 mM; NaCl, 100 mM; MgCl <sub>2</sub> , 5 mM; 2-Mercaptoethanol, 1 mM; pH 8,0 (bei 37°C)
Puffer <b>L</b>	Tris-HCl, 10 mM; MgCl <sub>2</sub> , 10 mM; Dithiothreit, 1 mM; PH 7,5 (bei 37°C)
Puffer <b>M</b>	Tris-HCl, 10 mM; NaCl, 50 mM; MgCl <sub>2</sub> , 10 mM; Dithiothreit, 1 mM; pH 7,5 (bei 37°C)
Puffer <b>H</b>	Tris-HCl, 50 mM; NaCl, 100 mM; MgCl <sub>2</sub> , 10 mM, Dithiothreit, 1 mM; pH 7,5 (bei 37°C)

### 2.1.4 Materialien für elektrophoretische Techniken

#### 1 x Tris-Acetat-Puffer (TAE)

Tris-Acetat, 40 mM

EDTA, 1 mM

(pH 8,0)

(Sigma, Deisenhofen)

(nach Sambrook et. al., 1989, S. 6.7, B23)

#### Agarose

ohne DNase-, RNase- und Protease-Aktivität

(nach Twining (1984) Analytical Biochemistry 143: 30-34)

optimaler Trennbereich der DNA-Fragmente: 0,5 kb- 25 kb

(Sigma, Deisenhofen)

#### Ladepuffer für native Gele 6x

0,25 % Bromphenolblau (BPB)

0,25 % Xylen Cyanol FF

in 1x TBE-Puffer pH 8,3

30 % Glycerin in Wasser

69,5 % H<sub>2</sub>O

(nach Sambrook et. al., 1989, S. 6.12, Tab. 6.3 Puffer Typ III)

#### Bromphenolblau-Xylencyanol

0,5 % Bromphenol Blue Sodium (CAS-Nr.: 62625-28-9)

0,5 % Xylene Cyanole FF (CAS-Nr.: 2650-17-1)

dye solution

in 1x TBE-Puffer

(pH 8,3)

#### Ethidiumbromid-Lösung

Ethidiumbromid in 10 ml H<sub>2</sub>O gelöst mit einer Endkonzentration von 10 mg/ml

### **2.1.5 Materialien für die Extraktion von genomischer DNA aus Blut**

#### Lysis Puffer

Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl) 155 mM

Kaliumhydrogencarbonat (KHCO<sub>3</sub>) 10 mM

EDTA 0,1 mM

(pH 7,4)

#### SE-Puffer

Natriumchlorid (NaCl) 75 mM

EDTA 25 mM

(pH 8,0)

#### TE-Puffer

Tris-HCl 10 mM

EDTA 1 mM

(pH 8,0)

#### Natriumdodecylsulfat (SDS)

SDS 20%

(Sigma, Deisenhofen)

#### Protease

Protease aus *Streptomyces griseus* 4 U/mg (lyophilisierter Zustand)

ohne DNase- und RNase-Aktivität

(Sigma, Deisenhofen)

## 2.2 Methoden

Bei der vorliegenden Arbeit wurden sog. Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) untersucht. Dabei handelt es sich um nachweisbare Größenunterschiede von DNA-Fragmenten, die entstehen, wenn die DNA verschiedener Individuen mit demselben, spezifischen Restriktionsenzym geschnitten wird. Üblicherweise werden hierzu mittels PCR amplifizierte DNA-Abschnitte bekannter Sequenz benutzt, die den gesuchten Polymorphismus enthalten. Dafür wird zunächst genomische DNA aus Blutzellen gewonnen und in wässriger Lösung asserviert. Im nächsten Schritt erfolgt mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) die Vervielfältigung eines Abschnittes konstanter Länge dieser genomischen DNA, welcher den zu untersuchenden Polymorphismus beinhaltet. So gewonnene und amplifizierte DNA-Abschnitte werden anschließend mit einem spezifischen Restriktionsenzym in ausreichender Konzentration bei ausreichend langer Reaktionszeit verdaut. Dieses Enzym erkennt im Bereich des zu untersuchenden Polymorphismus eine etwaig vorhandene Schnittstelle, so dass bei einem bestimmten Genotyp DNA-Stücke definierter Länge entstehen. Das Produkt dieser enzymatischen Behandlung wird anschließend auf ein Agarose-Gel aufgebracht und elektrophoretisch aufgetrennt, so dass die Digestionsprodukte als spezifische Bandenmuster dargestellt werden können. Die Dokumentation erfolgt fotografisch unter UV-Licht. Lässt sich statistisch ein Zusammenhang zwischen einem bestimmten Polymorphismus und einem erhöhten Risiko für eine definierte Erkrankung nachweisen, so hat dieser Polymorphismus einen informativen, evtl. mitunter auch einen diagnostischen Charakter. Voraussetzung für die PCR-Analyse ist also die bekannte DNA-Sequenz des den Polymorphismus enthaltenden DNA-Abschnitts.

Die Methodik der RFLP-Analyse mittels PCR wurde dabei jeweils der Literatur entlehnt und dann entsprechend den vorhandenen Geräten, Enzymen und Chemikalien optimiert. Die angeführten Literaturstellen behandelten meist Fragestellungen zum Fettstoffwechsel und zum Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen.

Da also bekannte, bereits charakterisierte Polymorphismen untersucht wurden, konnte auf eine Sequenzierung verzichtet werden.

### 2.2.1 DNA-Extraktion aus Vollblut

1. Die untersuchte DNA wurde aus Leukozyten (EDTA-Blut) gewonnen.
2. Das EDTA-Blut (ca. 2 ml) wurde mit 3 Anteilen Lysis-Puffer versetzt, anschließend für 15 Minuten in Eis gekühlt und alle 5 Minuten leicht geschüttelt.
3. Anschließend wurde die entstandene Lösung für 5 Minuten bei 700 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, je nach verbliebenem Restvolumen 5-10 ml Lysis-Puffer zugegeben und schließlich die Probe auf dem Vortexer vermischt. Dieser Schritt wurde anschließend noch einmal wiederholt.
4. Im folgenden wurde die Probe erneut 5 Minuten bei 700 g zentrifugiert, der Überstand erneut verworfen und das entstandene Pellet in 5 ml SE-Puffer resuspendiert.
5. Anschließend wurden 70 µl Protease (Firma Sigma, Deisenhofen), sowie 250 µl SDS 20% zugegeben, gut mit der Pipette gemischt und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur stengelassen, um die Proteine der Zellmembranen, wie auch die der Kernhülle aufzulösen.
6. Am folgenden Tag wurden 2,5 ml SE-Puffer und 2 ml NaCl 6mmol/l zugegeben und die Lösung für 20 Sekunden auf dem Vortexer gemischt.
7. Diese Lösung wurde daraufhin für 15 Minuten bei 2700 g zentrifugiert.
8. Der Überstand wurde in ein frisches Röhrchen überführt und 2 Anteile Ethanol 100% zugegeben, dabei kam es nach Kippen des Röhrchens zum Ausfällen der DNA.
9. Mit einer gebogenen Pasteurpipette wurde anschließend die ausgefällte DNA abpipettiert, kurz durch Ethanol 70% gezogen und schließlich je nach DNA-Menge in 200-600 µl TE-Puffer gelöst (nach Sambrook et al., 1989, S. 6.16-6.19).

### 2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction = PCR) ist eine *in vitro*-Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren. Mit ihrer Hilfe können definierte Desoxyribonukleinsäure-(DNA-)Fragmente aus der genomischen DNA amplifiziert werden. Diese von dem Biochemiker Kary B. Mullis 1983 entwickelte Methode, die in Form eines Protokolls von Saiki et al. 1985 veröffentlicht wurde, basiert auf drei Teilschritten mit jeweils unterschiedlichen Temperaturen, die in aufeinander folgenden Zyklen wiederholt werden: Im ersten Schritt, der Denaturierung der DNA-Doppelstränge, wird die DNA bei hoher Temperatur (Schmelztemperatur  $T_m$  ca.  $92^\circ\text{C}$  -  $95^\circ\text{C}$ ) in Einzelstränge aufgeschmolzen. In der Phase der Anlagerung (annealing), dem zweiten Schritt, hybridisieren bei relativ niedriger Temperatur (bei den vorliegenden Untersuchungen  $54$  -  $67^\circ\text{C}$ ) die Oligonukleotidprimer mit den beiden DNA-Matrizensträngen (template) und dienen damit im dritten Schritt der DNA-Polymerase als Startmoleküle beim Kopieren der beiden Stränge. Dabei verlängert die DNA-Polymerase unter Verwendung der zugegebenen Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP) die Primer in  $5'$ - $3'$ -Richtung, und zwar bis es zum Anhalten der Polymerase oder bis es zur Unterbrechung durch einen neuen Vermehrungszyklus kommt. Ab der dritten Amplifizierungsrunde entstehen nur noch Produkte definierter Länge, die durch die Position des Primers in der Matrize vorgegeben ist (Abb.2-3). Ab dem vierten Zyklus erfolgt die Vermehrung exponentiell, so dass sich bei einer angenommenen hundertprozentigen Ausbeute - die eher unwahrscheinlich ist - das gesuchte DNA-Amplikon nach 24 Zyklen  $2^{20}$ -fach vermehrt haben sollte. Die Zahl der Amplikons  $Z$  am Ende der Reaktion wird nach der Gleichung  $Z = (2^n - 2n)x$  berechnet ( $n$  = Anzahl der Zyklen,  $2n$  = Anzahl der Produkte aus dem ersten und zweiten Zyklus,  $x$  = Anzahl der Kopien der ursprünglichen DNA-Matrize (template)). Eine Erschöpfung der PCR-Reaktion ergibt sich meist nach ca. 30 Zyklen, was auf eine begrenzte Enzymmenge wie auch auf eine Abnahme der Enzymaktivität durch Denaturierung zurückzuführen ist.

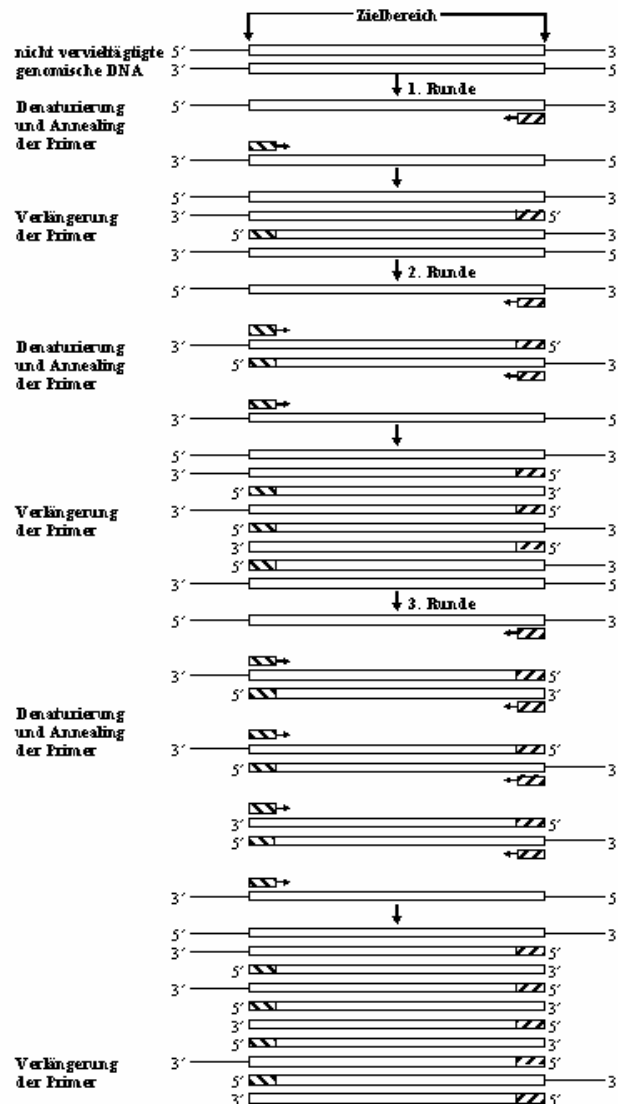


Abb. 2-3 Prinzip der PCR (nach Newton/Graham, 1994, S. 23)

Zentraler Bestandteil der PCR ist die seit 1988 verfügbare, auch bei der Denaturierungstemperatur von bis zu 95°C thermostabile, Taq-Polymerase aus dem Bakterienstamm *Thermus aquaticus* YT1, die eine optimale Enzymaktivität bei 72°C aufweist.

Bei der vorliegenden Untersuchung wurden alle PCR-Reaktionen im Kaltstart durchgeführt, d.h. alle Komponenten wurden bereits vor der Denaturierung der genomischen DNA dem Reaktionsansatz zugegeben. Als Polymerase wurde die thermostabile Taq-Polymerase der Firma Stratagene (La Jolla, California, USA) verwendet.

Bei den untersuchten DNA-Abschnitten lagen im einzelnen folgende Ansätze und Reaktionsbedingungen vor:

**2.2.2.1 Apolipoprotein CI (Apo CI)**

(nach Nillesen et al., 1990)

Reaktionsmix für 1 Reaktion

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
aqua	20,5 µl	-
Puffer	2,5 µl	1x
dNTP	0,5 µl	jeder dNTP 0,2 mM
Primer 1	0,2 µl	0,16 µM
Primer 2	0,2 µl	0,16 µM
Taq-Polymerase	0,1 µl	0,5 U/25 µl
	24,0 µl	
genomische DNA	1,0 µl	30 ng/25 µl
Gesamtreaktionsvolumen	25 µl	

**Tab. 2-2-PCR-Ansatz Apolipoprotein CI (Apo CI)**

PCR-Bedingungen:

<b>Zeitdauer [min]</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zahl der Zyklen</b>
05:00	95	1
00:30	95	
01:00	54	31
02:00	72	
05:00	72	1

**Tab. 2-3 PCR-Bedingungen Apolipoprotein CI (Apo CI)**



**2.2.2.2  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin (ACT)**

(nach Kamboh et al., 1995, Thome et al., 1995)

Reaktionsmix für 1 Reaktion

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
aqua	20,2 $\mu$ l	-
Puffer	2,5 $\mu$ l	1x
dNTP	0,5 $\mu$ l	jeder dNTP 0,2 mM
Primer 1	0,3 $\mu$ l	0,24 $\mu$ M
Primer 2	0,3 $\mu$ l	0,24 $\mu$ M
Taq-Polymerase	0,2 $\mu$ l	1 U/25 $\mu$ l
24,0 $\mu$ l		
genomische DNA	1,0 $\mu$ l	30 ng/25 $\mu$ l
Gesamtreaktionsvolumen 25 $\mu$ l		

**Tab. 2-4 PCR-Ansatz  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin (ACT)**

PCR-Bedingungen:

<b>Zeitdauer [min]</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zahl der Zyklen</b>
08:00	94	1
00:30	94	
00:30	55	35
02:00	72	
05:00	72	1

**Tab. 2-5 PCR-Bedingungen  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin (ACT)**

### 2.2.2.3 Exon 8 des LDL-Rezeptorgens (8-LDL)

(nach Gudnason et al., 1995)

Reaktionsmix für 1 Reaktion

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
aqua	19,9 µl	-
Puffer	2,5 µl	1x
dNTP	0,5 µl	jeder dNTP 0,2mM
Primer 1	0,5 µl	0,4 µM
Primer 2	0,5 µl	0,4 µM
Taq-Polymerase	0,1 µl	0,5 U/25 µl
	24,0 µl	
genomische DNA	1,0 µl	30 ng/25 µl
Gesamtreaktionsvolumen	25 µl	

**Tab. 2-6 PCR-Ansatz Exon 8 des LDL-Rezeptorgens (8-LDL)**

PCR-Bedingungen:

Zeitdauer [min]	Temperatur [°C]	Zahl der Zyklen
05:00	95	
03:00	59	1
05:00	72	
00:30	95	
01:00	59	30
02:00	72	
05:00	72	1

**Tab. 2-7 PCR-Bedingungen Exon 8 des LDL-Rezeptorgens (8-LDL)**

### 2.2.2.4 Exon 13 des LDL-Rezeptorgens (13-LDL)

(nach Ahn et al., 1994)

Reaktionsmix für 1 Reaktion

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
aqua	19,30 µl	-
Puffer	2,50 µl	1x
dNTP	0,50 µl	jeder dNTP 0,2mM
Primer 1	0,75 µl	0,6 µM
Primer 2	0,75 µl	0,6 µM
Taq-Polymerase	0,20 µl	1 U/25 µl
	24,0 µl	
genomische DNA	1,0 µl	30 ng/25 µl
Gesamtreaktionsvolumen	25 µl	

**Tab. 2-8 PCR-Ansatz Exon 13 des LDL-Rezeptorgens (13-LDL)**

PCR-Bedingungen:

<b>Zeitdauer [min]</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zahl der Zyklen</b>
05:00	95	1
00:30	95	
02:00	67	30
01:00	72	
03:00	72	1

**Tab. 2-9 PCR-Bedingungen Exon 13 des LDL-Rezeptorgens (13-LDL)**

**2.2.2.5 Lipoproteinlipase-*Hind* III-Genlocus (Lip-*Hind* III)**

(nach Gotoda et al., 1992)

Reaktionsmix für 1 Reaktion

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
aqua	18,40 µl	-
Puffer	2,50 µl	1x
dNTP	0,50 µl	jeder dNTP 0,2 mM
Primer 1	1,25 µl	1,0 µM
Primer 2	1,25 µl	1,0 µM
Taq-Polymerase	0,10 µl	0,5 U/25 µl
	24,0 µl	
genomische DNA	1,0 µl	30 ng/25 µl
Gesamtreaktionsvolumen	25 µl	

**Tab. 2-10 PCR-Ansatz Lipoproteinlipase-*Hind* III-Genlocus (Lip-*Hind* III)**

PCR-Bedingungen:

<b>Zeitdauer [min]</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zahl der Zyklen</b>
05:00	94	1
00:30	94	
02:00	50	26
03:00	72	
07:00	72	1

**Tab. 2-11 PCR-Bedingungen Lipoproteinlipase-*Hind* III-Genlocus (Lip-*Hind* III)**

### 2.2.2.6 Lipoproteinlipase-*Pvu* II-Genlocus (Lip-*Pvu* II)

(nach Peacock et al., 1992)

Reaktionsmix für 1 Reaktion

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
aqua	19,9 µl	-
Puffer	2,5 µl	1 x
dNTP	0,5 µl	jeder dNTP 0,2 mM
Primer 1	0,5 µl	0,4 µM
Primer 2	0,5 µl	0,4 µM
Taq-Polymerase	0,1 µl	0,5 U/25 µl
	24,0 µl	
genomische DNA	1,0 µl	30 ng/25 µl
Gesamtreaktionsvolumen	25 µl	

**Tab. 2-12 PCR-Ansatz Lipoproteinlipase-*Pvu* II-Genlocus (Lip *Pvu* II)**

PCR-Bedingungen:

Zeitdauer [min]	Temperatur [°C]	Zahl der Zyklen
05:00	93	1
05:00	58	
00:30	92	
05:00	58	25
05:00	72	1

**Tab. 2-13 PCR-Bedingungen Lipoproteinlipase-*Pvu* II-Genlocus (Lip *Pvu* II)**

### 2.2.2.7 Apolipoprotein E (Apo E)

(nach Thome et al. 1995)

Reaktionsmix für 1 Reaktion

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
aqua	19,9 µl	-
Puffer	2,5 µl	1 x
dNTP	0,5 µl	jeder dNTP 0,2 mM
Primer 1	0,5 µl	0,4 µM
Primer 2	0,5 µl	0,4 µM
Taq-Polymerase	0,1 µl	0,5 U/25 µl
24,0 µl		
genomische DNA	1,0 µl	30 ng/25 µl
Gesamtreaktionsvolumen 25 µl		

**Tab. 2-14 PCR-Ansatz Apolipoprotein E (Apo E)**

PCR-Bedingungen:

<b>Zeitdauer [min]</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zahl der Zyklen</b>
05:00	94	1
01:00	94	
00:30	65	40
01:30	72	
05:00	72	1

**Tab. 2-15 PCR-Bedingungen Apolipoprotein E (Apo E)**

### 2.2.3 Spaltung der amplifizierten DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die mittels PCR amplifizierte DNA wurde im Anschluss mit bakteriellen Restriktionsendonukleasen versetzt und dadurch an spezifischen Basensequenzen geschnitten. Die bei molekularbiologischen Techniken eingesetzten Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die spezifische, meist palindromische Basensequenzen doppelsträngiger DNA erkennen und dort Phosphodiesterbindungen hydrolysieren. Die Erkennungsequenzen sind meist 4-6 Basenpaare lang. Die Proben wurden jeweils mit dem Enzym und dem dazugehörigen Puffer versetzt, der ein Wirkungsoptimum des Enzyms garantiert. Die Digestion erfolgte mit Inkubation im Wasserbad bei 37° C, zumeist über Nacht. Die Enzymmenge wurde jeweils in deutlichem Überschuss zugegeben (zwischen 6 und 80 Units), um eine vollständige Digestion der amplifizierten DNA-Menge zu erreichen. Die Volumina eines Ansatzes lagen im Bereich von 50 µl bis 400 µl.

Unterschiedliche Fragmentgrößen, die auftreten, wenn man die DNA verschiedener Individuen mit demselben Restriktionsenzym schneidet, zeigen bei unterschiedlichen Basensequenzen einen vorhandenen Polymorphismus (RFLP = Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus) an. Im einzelnen wurden folgende Ansätze verwendet:

#### 2.2.3.1 Apolipoprotein CI (Apo CI)

Restriktionsenzym	<i>Hpa</i> I (Haemophilus parainfluenzae; 3-10 U/µl)
DNA-Schnittstelle	↓ GTTAAC CAATTG ↑
SuRE/Cut-Puffer	A
Inkubation	37°C über Nacht

Tab. 2-16 *Hpa* I: Konzentration, spezifische Schnittstelle, Puffer und Temperaturoptimum

Reaktionsansatz für 1 Reaktion

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
SuRE/Cut-Puffer <b>A</b>	3,0 µl	1 x
<i>Hpa</i> I	2,0 µl	0,6 bis 2,0 U/5 µl
Gesamtreaktionsvolumen	5,0 µl	

**Tab. 2-17 *Hpa* I: Reaktionsansatz für Enzymdigestion amplifizierter DNA**

Die 5 µl des Reaktionsansatzes wurden jeweils dem PCR-Produkt von 25 µl beigelegt.

**2.2.3.2  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin (ACT)**

Restriktionsenzym	<i>Mva</i> I (Micrococcus varians RFL 19; 10 U/µl)
DNA-Schnittstelle	↓ CC( <sup>A</sup> <sub>T</sub> )GG GG( <sup>T</sup> <sub>A</sub> )CC ↑
SuRE/Cut-Puffer	<b>H</b>
Inkubation	37°C über Nacht

**Tab. 2-18 *Mva* I: Konzentration, spezifische Schnittstelle, Puffer und Temperaturoptimum**

Reaktionsansatz für 1 Reaktion

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
aqua	1,0 µl	-
SuRE/Cut-Puffer <b>H</b>	3,0 µl	1 x
<i>Mva</i> I	1,0µl	10 U/5 µl
Gesamtreaktionsvolumen	5,0µl	

**Tab. 2-19 *Mva* I: Reaktionsansatz für Enzymdigestion amplifizierter DNA**

Die 5 µl des Reaktionsansatzes wurden jeweils dem PCR-Produkt von 25 µl beigelegt.



### 2.2.3.3 Exon 8 des LDL-Rezeptorgens (8-LDL)

Restriktionsenzym	<i>Stu</i> I (Streptomyces nodosus; 40 U/μl)
DNA-Schnittstelle	↓ AGGCCT TCCGGA ↑
SuRE/Cut-Puffer	<b>B</b>
Inkubation	37°C über Nacht

Tab. 2-20 *Stu* I: Konzentration, spezifische Schnittstelle, Puffer und Temperaturoptimum

Reaktionsansatz für 1 Reaktion

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
aqua	1,0 μl	-
SuRE/Cut-Puffer <b>B</b>	3,0 μl	1 x
<i>Stu</i> I	1,0μl	40 U/5 μl
Gesamtreaktionsansatz	5,0μl	

Tab. 2-21 *Stu* I: Reaktionsansatz für Enzymdigestion amplifizierter DNA

Die 5 μl des Reaktionsansatzes wurden jeweils dem PCR-Produkt von 25 μl beigelegt.

### 2.2.3.4 Exon 13 des LDL-Rezeptorgens (13-LDL)

Restriktionsenzym	<i>Ava</i> II (Anabaena variabilis; 5 U/μl)
DNA-Schnittstelle	↓ GG( <sup>A</sup> <sub>T</sub> )CC CC( <sup>T</sup> <sub>A</sub> )GG ↑
SuRE/Cut-Puffer	<b>A</b>
Inkubation	37°C über Nacht

Tab. 2-22 *Ava* II: Konzentration, spezifische Schnittstelle, Puffer und Temperaturoptimum

Reaktionsansatz für 1 Reaktion

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
SuRE/Cut-Puffer <b>A</b>	3,0 µl	1 x
<i>Ava</i> II	2,0 µl	10 U/5 µl
Gesamtreaktionsansatz	5,0 µl	

**Tab. 2-23 *Ava* II: Reaktionsansatz für Enzymdigestion amplifizierter DNA**

Die 5 µl des Reaktionsansatzes wurden jeweils dem PCR-Produkt von 25 µl beigelegt.

### 2.2.3.5 Lipoproteinlipase-*Hind* III-Genlocus (*Lip-Hind* III)

Restriktionsenzym	<i>Hind</i> III (Haemophilus influenzae Rd com-10; 40 U/µl)
DNA-Schnittstelle	↓ AAGCTT TTCGAA ↑
SuRE/Cut-Puffer	<b>B</b>
Inkubation	37°C über Nacht

**Tab. 2-24 *Hind* III: Konzentration, spezifische Schnittstelle, Puffer und Temperaturoptimum**

Reaktionsansatz für 1 Reaktion

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
SuRE/Cut-Puffer <b>B</b>	3,0 µl	1 x
<i>Hind</i> III	2,0 µl	80 U/5 µl
Gesamtreaktionsansatz	5,0 µl	

**Tab. 2-25 *Hind* III: Reaktionsansatz für Enzymdigestion amplifizierter DNA**

Die 5 µl des Reaktionsansatzes wurden jeweils dem PCR-Produkt von 25 µl beigelegt.

### 2.2.3.6 Lipoproteinlipase-*Pvu* II-Genlocus (Lip-*Pvu* II)

Restriktionsenzym	<i>Pvu</i> II (Proteus vulgaris; 40 U/μl)
DNA-Schnittstelle	↓ CAGCTG GTCGAC ↑
SuRE/Cut-Puffer	<b>M</b>
Inkubation	37°C über Nacht

**Tab. 2-26 *Pvu* II: Konzentration, spezifische Schnittstelle, Puffer und Temperaturoptimum**

Reaktionsansatz für 1 Reaktion

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
aqua	1,0 μl	-
SuRE/Cut-Puffer <b>M</b>	3,0 μl	1 x
<i>Pvu</i> II	1,0μl	40 U/5 μl
Gesamtreaktionsansatz	5,0μl	

**Tab. 2-27: *Pvu* II: Reaktionsansatz für Enzymdigestion amplifizierter DNA**

Die 5 μl des Reaktionsansatzes wurden jeweils dem PCR-Produkt von 25 μl beigelegt.

### 2.2.3.7 Apolipoprotein E (Apo E)

Restriktionsenzym	<i>Cfo</i> I (Clostridium formicoaceticum; 10 U/μl)
DNA-Schnittstelle	↓ GCGC CGCG ↑
SuRE/Cut-Puffer	<b>L</b>
Inkubation	37°C über Nacht

**Tab. 2-28 *Cfo* I: Konzentration, spezifische Schnittstelle, Puffer und Temperaturoptimum**

## Reaktionsansatz für 1 Reaktion

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
aqua	1,0 µl	-
SuRE/Cut-Puffer L	3,0 µl	1 x
<i>Cfo</i> I	1,0µl	10 U/5 µl
Gesamtreaktionsansatz	5,0µl	

Tab. 2-29: *Cfo* I: Reaktionsansatz für Enzymdigestion amplifizierter DNA

Die 5 µl des Reaktionsansatzes wurden jeweils dem PCR-Produkt von 25 µl beigelegt.

### 2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der amplifizierten und mittels Restriktionsendonukleasen geschnittenen DNA erfolgte zur Größenabschätzung in Agarosegelen in einem homogenen, konstanten elektrischen Feld. Diese Methode ist bis zu DNA-Fragmentgrößen von 20 kb gut geeignet. Die vorliegenden Fragmente variierten von 33 bp bis 715 bp.

Verwendet wurde eine horizontale Flachgelelektrophorese unter nativen Bedingungen in Agarose ohne DNase-, RNase- und Protease-Aktivität. Die Agarosekonzentration richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente, wobei relativ kleine Fragmente entsprechend höhere Konzentrationen von Agarose erforderten. Bei den vorliegenden Untersuchungen lagen die Konzentrationen zwischen 1,5 % und 4 %. Die analytischen Gele hatten ein Volumen von 50 ml, die Agarose wurde unter Erhitzen in der Mikrowelle bei 200 W und anschließendem Rühren mit dem Magnetrührer in bidestilliertem Wasser gelöst und nach Zugabe von 2 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer 25x und von 5 µl Ethidiumbromid in 7 cm x 8 cm große Gelträger (sog. Renner) gegossen.

Die Agarosegele enthielten Ethidiumbromid in einer Konzentration von 5 µg/ml Gel. Der Laufpuffer bestand aus Tris-Acetat-EDTA-Puffer 1x. Die DNA wurde vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/8 Volumen Ladepuffer (nach Sambrook J et al., 1989, S. 6.11, Tab. 6.3 Puffer Typ III; siehe Kapitel 2.1.1.1) gemischt.

### Färben der Agarosegele mit Ethidiumbromid

(nach Sambrook J et al., 1989, S. 6.15)

Ethidiumbromid (EtBr) bindet ohne Sequenzspezifität an DNA. Diese Fähigkeit besitzt EtBr durch einen planaren Molekülanteil, der sich zwischen benachbarte Basenpaare eines doppelsträngigen DNA-Moleküls einlagert. EtBr lagert sich ebenfalls an einzelsträngige Nukleinsäuren, jedoch 5-10 mal weniger. EtBr absorbiert UV-Licht und fluoresziert bei einer Wellenlänge von 302 nm und 366 nm, es emittiert rot-oranges Licht im Wellenlängenbereich von 590 nm.

Durch die Einlagerung von Ethidiumbromid konnten die bei UV-Transilluminatoren (312 nm) Wellenlänge fluoreszierenden DNA-Banden dargestellt und mit einer Polaroid-Kamera auf Polaroid-Filmen vom Typ 667 aufgenommen werden. Zur Laufkontrolle der Elektrophorese wurde eine UV-Handleuchte mit langwelligem UV-Licht (365 nm) verwendet. Zur Größenbestimmung und zur Bandendifferenzierung wurde jeweils ein geeigneter DNA-Längenstandard (siehe Kapitel 2.1.1.4) in Spur Nr. 10 jedes Agarosegels mit aufgetrennt.

Im folgenden wird, bis auf Apolipoprotein E, zu jedem Polymorphismus jeweils ein Agarosegel mit allen möglicherweise auftretenden DNA-Banden dargestellt.

#### **2.2.4.1 Apolipoprotein CI (Apo CI)**

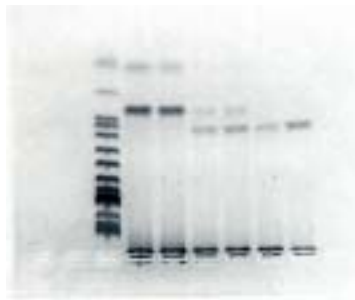


**Abb. 2-4 Apolipoprotein CI: Typisches Bandenmuster (Spur 1 Längenstandard VIII; Spur 2 und 3 A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub>; Spur 4 und 5 A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>; Spur 6 und 7 A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub>)**

Genotyp	DNA-Fragmentgröße
A <sub>1</sub> /A <sub>1</sub>	222 bp
A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub>	222 bp; 159 bp; 63 bp
A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>	159 bp; 63 bp

**Tab. 2-30 Apolipoprotein CI: Genotyp und Größen der DNA-Fragmente in Basenpaaren (bp)**

#### 2.2.4.2 $\alpha_1$ -Antichymotrypsin (ACT)



**Abb. 2-5  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin: Typisches Bandenmuster (von links nach rechts Spur 1 Längenstandard VIII; Spur 2 und 3 A/A; Spur 4 und 5 A/T; Spur 6 und 7 T/T)**

Genotyp	DNA-Fragmentgröße
A/A	84 bp; 33 bp; 7 bp (nicht sichtbar)
A/T	117 bp; 84 bp; 33 bp; 7 bp (nicht sichtbar)
T/T	117 bp; 7 bp (nicht sichtbar)

**Tab. 2-31  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin: Genotyp und Größen der DNA-Fragmente in Basenpaaren (bp)**

### 2.2.4.3 Exon 8 des LDL-Rezeptorgens (8-LDL)



**Abb. 2-6 Exon 8 des LDL-Rezeptorgens: Typisches Bandenmuster (von links nach rechts Spur 1 Längenstandard VIII; Spur 2 und 3 Ala/Ala; Spur 4 und 5 Ala/Thr; Genotyp Thr/Thr nicht vorhanden)**

Genotyp	DNA-Fragmentgröße
Ala/Ala	144 bp; 49 bp
Ala/Thr	193 bp; 144 bp; 49 bp
Thr/Thr	193 bp

**Tab. 2-32 Exon 8 des LDL-Rezeptorgens: Genotyp und Größen der DNA-Fragmente in Basenpaaren (bp)**

### 2.2.4.4 Exon 13 des LDL-Rezeptorgens (13-LDL)



**Abb. 2-7 Exon 13 des LDL-Rezeptorgens: Typisches Bandenmuster (von links nach rechts Spur 1 Längenstandard VIII; Spur 2 und 3 ++; Spur 4 und 5 +/-; Spur 6 und 7 -/-)**

Genotyp	DNA-Fragmentgröße
+/+	141 bp; 87 bp
+/-	228 bp; 141 bp; 87 bp
-/-	228 bp

**Tab. 2-33 Exon 13 des LDL-Rezeptorgens: Genotyp und Größen der DNA-Fragmente in Basenpaaren (bp)**

#### 2.2.4.5 Lipoproteinlipase-*Hind* III-Genlocus (Lip-*Hind* III)



**Abb. 2-8 Lipoproteinlipase-*Hind* III-Genlocus: Typisches Bandenmuster (von links nach rechts Spur 1 Längenstandard VII; Spur 2 und 3 H2/H2; Spur 4 und 5 H1/H2; Spur H1/H1)**

Genotyp	DNA-Fragmentgröße
H1/H1	715 bp
H1/H2	715 bp; 600 bp; 115 bp
H2/H2	600 bp; 115 bp

**Tab. 2-34 Lipoproteinlipase-*Hind* III-Genlocus: Genotyp und Größen der DNA-Fragmente in Basenpaaren (bp)**



### 2.2.4.6 Lipoproteinlipase-*Pvu* II-Genlocus (Lip-*Pvu* II)



**Abb. 2-9 Lipoproteinlipase-*Pvu* II-Genlocus: Typisches Bandenmuster (Spur 1 Längenstandard VIII; Spur 2 und 3 +/+; Spur 4 und 5 +/-; Spur 6 und 7 -/-)**

Genotyp	DNA-Fragmentgröße
+/+	330 bp; 110 bp
+/-	440 bp; 330 bp; 110 bp
-/-	440 bp

**Tab. 2-35 Lipoproteinlipase-*Pvu* II-Genlocus: Genotyp und Größen der DNA-Fragmente in Basenpaaren (bp)**

### 2.2.4.7 Apolipoprotein E (Apo E)

Allel	DNA-Fragmentgröße
Apo E2	91 bp; 81 bp
Apo E3	91 bp; 48 bp; 33 bp
Apo E4	72 bp; 48 bp; 33 bp; 19 bp (nicht sichtbar)

**Tab. 2-36 Apolipoprotein E: Genotyp und Größen der DNA-Fragmente in Basenpaaren (bp)**

### 2.2.5 Statistische Methoden

Die Allelfrequenzen wurden nach der üblichen Methode der Genzählung ermittelt. Diese können nach der Formel

$$f(a) = \frac{2 \cdot \text{Homozygote} + 1 \cdot \text{Heterozygote}}{2 \cdot n}$$

berechnet werden. Dabei bezeichnet  $f(a)$  die Häufigkeit des Allels  $a$ , *Homozygote* die Zahl der Homozygoten, *Heterozygote* die Zahl der Heterozygoten für das Merkmal, und  $n$  die Gesamtzahl der untersuchten Individuen. Die Summe der Häufigkeiten beider Allele beträgt dabei jeweils 1.

Die Verteilung der Genotypen wurde zwischen der DAT-Gruppe und der Kontrollgruppe für jeden Polymorphismus durch die Verwendung separater  $\chi^2$ -Teste verglichen. Zur Beurteilung des Verteilungsmusters der Genotypen in DAT- und Kontrollgruppe wurden die Polymorphismen ebenso durch  $\chi^2$ -Teste verglichen. Darüber hinaus wurde eine Diskriminanzanalyse mit schrittweiser variabler Auswahl durchgeführt, um relevante Polymorphismen zu identifizieren und ihren prädiktiven Wert zu ermitteln. Die Ausgangswahrscheinlichkeit für jede diagnostische Gruppe wurde mit 50 % angenommen. Das relative Risiko (RR) einschließlich des Konfidenzintervalls (KI(RR)), die Sensitivität ( $p_{\text{sens}}$ ) und Spezifität ( $p_{\text{spez}}$ ) wurde nach den üblichen statistischen Methoden errechnet:

$$p_{\text{sens}} = \frac{a}{(a + c)};$$

$$p_{\text{spez}} = \frac{d}{(b + d)}$$

$$RR = \frac{a(c + d)}{c(a + b)}$$

$$KI(RR) = RR \left( 1 \pm 1,96 \sqrt{\frac{b}{a(a + b)} + \frac{d}{(c + d)}} \right)$$

Dabei gilt:

	DAT	Kontrollen	
Merkmal vorhanden	a	b	a + b
Merkmal nicht vorhanden	c	d	c + d
	a + c	b + d	

### 3. Ergebnisse

Die bei DAT-Patienten und Kontrollprobanden gefundenen Allelfrequenzen werden in den Tabellen 3-1, 3-3 und 3-4 dargestellt. Die Allelhäufigkeiten der einzelnen untersuchten Polymorphismen in der Gesamtpopulation stimmten mit den in der Literatur angegebenen Werten (Nillesen et al., 1990; Peacock et al., 1992; Gotoda et al., 1992; Ahn et al., 1994; Kamboh et al., 1995; Gudnason et al., 1995; Thome et al., 1995) weitgehend überein.

Das Apo-E-Allel 4 war in der Indexgruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant häufiger vorhanden ( $p = 0,001$ ). Ebenso zeigte das Apo-CI-Allel A<sub>2</sub> eine erhöhte Frequenz in der DAT-Gruppe ( $p = 0,009$ ). Die höhere Frequenz des LDL-Rezeptor-Gens Exon 8 Threonin (Thr) bei DAT-Patienten im Vergleich zu den Kontrollprobanden verfehlte nur knapp die Signifikanz ( $p = 0,055$ ). Die Polymorphismen ACT, LDL-Rezeptor-Gen Exon 13 und Lipoproteinlipase (Introns 6 und 8) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen.

In der Gesamtstichprobe ( $n = 225$ ) war die Anwesenheit des Apo-CI-Allels A<sub>2</sub> in hohem Maße mit dem Apo-E-Allel 4 ( $\chi^2$ -Test,  $P < 0,00001$ ) korreliert, wohingegen sich das Apo-CI-Allel A<sub>1</sub> als von Apo-E-Allel 4 überwiegend unabhängig erwies. Bei homozygoten Trägern von Apo-CI-Allel A<sub>1</sub> wurde keinerlei Apo-E-Allel 4 gefunden. Nur 1,3 % der für Apo-CI-Allel A<sub>2</sub> homozygoten Probanden hatten kein Apo-E-Allel 4. Bei der separaten Analyse von DAT-Patienten und Kontrollen wurde die gleiche Korrelation zwischen Apo-E- und Apo-CI-Allelen gefunden (Tab. 3-4)

Es fanden sich keine signifikanten Korrelationen zwischen dem Apo-E-Genotyp und den Polymorphismen des LDL-Rezeptorgens (Exons 8 und 13), des  $\alpha_1$ -Antichymotrypsins (ACT) oder der Lipoproteinlipase-Gene (Introns 6 und 8).

Bei der Verwendung der Gen-Polymorphismen für die Diskrimanzanalyse führte die stufenweise Auswahl der Variablen zu einem Einschluss des Apo-E- und LDL-Rezeptorgen-Polymorphismus (Exon 8) als für die Klassifizierung des Merkmals DAT relevante Variablen. Die Sensitivität der diagnostischen Klassifizierung mit diesen beiden Variablen war 41,1 %, die Spezifität wurde mit 80,7 % errechnet. Bei Durchführung der Klassifizierung mit dem Apo-E-Polymorphismus war die Sensitivität ähnlich (42,7 %),

die Spezifität lag bei 79,3 %. Die Genauigkeit der Klassifizierung war ähnlich mit beiden Methoden (67 % bzw. 65 %).

Das relative Risiko für DAT, das auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse errechnet wurde, lag bei 1,97 für Apo E4, 1,76 für Apo-CI-Allel A<sub>2</sub> und 1,74 für das LDL-Rezeptorgen (Thr) als einzelne Risikofaktoren (Tab. 3-4). Das relative Risiko stieg auf 2,68 für die Anwesenheit von wenigstens einem Apo-E4-Allel und einem LDL-Rezeptorgen Allel Thr, und zwar mit einem Konfidenzintervall von 1,29 bis 4,07.

Es wurde kein Effekt auf das Ersterkrankungsalter bei der Verteilung der Genpolymorphismen gefunden, ebenso wenig wie ein Unterschied zwischen dem Typ mit frühem und dem Typ mit spätem Erkrankungsalter.

Apo E	DAT (n = 63)	Kontrollen (n = 162)
Genotypen, n (%)		
2/2	0 (0,0)	1 (0,6)
2/3	5 (7,9)	19 (11,7)
2/4	2 (3,2)	8 (4,9)
3/3	24 (38,1)	92 (56,8)
3/4	26 (42,6)	35 (21,6)
4/4	6 (9,5)	7 (4,3)
Allelfrequenzen		
f(2)	0,06	0,09
f(3)	0,63	0,73
f(4)	0,32	0,18

**Tab. 3-1** Verteilung der Apo-E-Genotypen und –Allelfrequenzen bei DAT-Patienten und Kontrollen

	DAT, n(%)	Kontrollen, n(%)	Signifikanz	Relatives Risiko (95 % Konfidenzintervall)
Apo E4	34 (54,0)	50 (30,9)	P = 0,001	1,97 (1,5-2,79)
Kein Apo E4	29 (46,0)	112 (69,1)		
Apo CI A2	39 (61,9)	69 (42,6)	P = 0,009	1,76 (0,99-2,53)
Kein Apo CI A2	24 (38,1)	93 (57,5)		
LDL-R (Exon 8) Thr	10 (15,9)	12 (7,4)	P = 0,055	1,74 (0,85-2,63)
Kein LDL-R (Exon 8) Thr	53 (84,1)	150 (92,6)		

**Tab. 3-2** Apo E, Apo CI und LDL-Rezeptor (Exon 8) Genotypen bei DAT-Patienten und Kontrollen: Gruppendifferenzen ( $\chi^2$ -Test) und relatives Risiko

	DAT (n = 63)	Kontrollen (n = 162)		DAT (n = 63)	Kontrollen (n = 162)
<b>Apo CI</b>			<b>ACT</b>		
<i>Genotypen</i>			<i>Genotypen</i>		
A <sub>1</sub> /A <sub>1</sub>	24 (38,1)	93 (57,4)	A/A	14 (22,2)	39 (24,1)
A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub>	33 (52,4)	51 (31,5)	A/T	29 (46,0)	87 (53,7)
A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>	6 (9,5)	18 (11,1)	T/T	20 (31,7)	36 (22,2)
<i>Allelfrequenzen</i>			<i>Allelfrequenzen</i>		
f(A <sub>1</sub> )	0,64	0,73	f(A)	0,45	0,51
f(A <sub>2</sub> )	0,36	0,27	f(T)	0,55	0,49
<b>LDL-Rezeptor Exon 8</b>			<b>LDL-Rezeptor Exon13</b>		
<i>Genotypen</i>			<i>Genotypen</i>		
Ala/Ala	53 (84,1)	150 (92,6)	+/+	13 (20,6)	31 (19,1)
Ala/Thr	10 (15,9)	12 (7,7)	+/-	27 (42,9)	80 (49,4)
Thr/Thr	0 (0,0)	0 (0,0)	-/-	23 (36,5)	51 (31,5)
<i>Allelfrequenzen</i>			<i>Allelfrequenzen</i>		
f(Ala)	0,92	0,96	f(+)	0,42	0,44
f(Thr)	0,08	0,04	f(-)	0,58	0,56
<b>Lipoproteinli- pase Intron 6</b>			<b>Lipoproteinli- pase Intron 8</b>		
<i>Genotypen</i>			<i>Genotypen</i>		
+/+	15 (23,8)	38 (23,5)	H <sub>1</sub> /H <sub>1</sub>	5 (7,9)	13 (8,0)
+/-	31 (49,2)	86 (53,1)	H <sub>1</sub> /H <sub>2</sub>	26 (41,3)	79 (48,8)
-/-	17 (27,0)	38 (23,5)	H <sub>2</sub> /H <sub>2</sub>	32 (50,8)	70 (43,2)
<i>Allelfrequenzen</i>			<i>Allelfrequenzen</i>		
f(+)	0,48	0,50	f(H <sub>1</sub> )	0,29	0,32
f(-)	0,52	0,50	f(H <sub>2</sub> )	0,71	0,68

**Tab. 3-3** Verteilung der Genotypen und Allelfrequenzen von Apo CI, ACT, LDL-Rezeptorgen (Exons 8 und 13) und Lipoproteinlipasegen (Introns 6 und 8) bei DAT-Patienten und Kontrollen

Genotyp	DAT		Kontrollen		
	Apo E4	Kein Apo E4	Apo E4	Kein Apo E4	
ACT	AA	9 (26,5)	5 (17,2)	13 (26,0)	26 (27,0)
	AT	15 (44,1)	14 (48,3)	23 (46,0)	64 (57,1)
	TT	10 (29,4)	10 (34,5)	14 (28,0)	22 (19,6)
Apo CI	A <sub>1</sub> /A <sub>1</sub>	0 (0,0)	24 (82,6)	0 (0,0)	93 (83,0)
	A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub>	28 (82,4)*	5 (17,2)	35 (70,0)*	16 (14,3)
	A <sub>2</sub> /A <sub>2</sub>	6 (17,6)*	0 (0,0)	15 (30,0)*	3 (2,7)
LDL-R Exon 8	Ala/Ala	29 (85,3)	8 (27,6)	48 (96,0)	102 (91,1)
	Ala/Thr	5 (14,7)	10 (34,5)	2 (4,0)	10 (8,9)
	Thr/Thr	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
LDL-R Exon 13	+/+	5 (14,7)	8 (27,6)	12 (24,0)	19 (17,0)
	+/-	17 (50,0)	10 (34,5)	27 (54,0)	53 (47,3)
	-/-	12 (35,3)	11 (37,9)	11 (22,0)	40 (35,7)
Lipoproteinlipase	+/+	10 (29,4)	5 (17,2)	13 (26,0)	25 (22,3)
Intron 6	+/-	15 (44,1)	16 (55,2)	26 (52,0)	60 (53,6)
	-/-	9 (26,5)	8 (27,6)	11 (22,0)	27 (24,1)
Lipoproteinlipase	H <sub>1</sub> /H <sub>1</sub>	1 (2,9)	4 (13,8)	2 (4,0)	11 (9,8)
Intron 8	H <sub>1</sub> /H <sub>2</sub>	14 (41,2)	12 (41,4)	28 (56,0)	51 (45,5)
	H <sub>2</sub> /H <sub>2</sub>	19 (55,9)	13 (44,8)	20 (40,0)	50 (44,6)

**Tab. 3-4** Frequenzen von ACT-, Apo CI-, LDL-R- (Exons 8 und 13) und Lipoproteinlipasegenotypen (Introns 6 und 8) bei DAT-Patienten und Kontrollen unter der Anwesenheit wenigstens eines Apo E4-Allels und ohne Apo E4-Allel.

Daten dargestellt in n(%)\* Signifikant höhere Frequenz von Apo CI, A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub> und A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> bei Apo E4-Allel-Trägern unabhängig von der diagnostischen Gruppe (p<0,00001). Kein Apo CI-Genotyp A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub> bei Apo E4-Trägern in allen diagnostischen Gruppen beobachtet.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Das Apolipoprotein-E-Allel 4 als etablierter Risikofaktor für die DAT**

Die in der vorliegenden Studie gefundene signifikant höhere Allelfrequenz des Apo-E4-Allels bei DAT-Patienten, verglichen mit Kontrollen, untermauert die bekannte Rolle des Apo-E-Gens und seines Tri-Allel-Polymorphismus als Risikofaktor für die DAT. In einer Assoziationsstudie konnte durch Corder et al. (1993) bei der Untersuchung von Patienten mit einer familiären DAT und entsprechenden Kontrollprobanden ein Kandidatengen für einen Risikofaktor der DAT auf dem Chromosom 19 ausgemacht werden. Dieser Genbereich konnte später als das Apolipoprotein-E-Gen (Apo-E-Gen) identifiziert werden. Die bekannten drei Allele des Apo-E-Gens variieren in ihrer Allelhäufigkeit in verschiedenen Populationen, bei den Kaukasiern kommt das Apo-E3-Allel am häufigsten vor (ca. 70 - 80 %), gefolgt von Apo-E4-Allel mit 12 - 14 % und dem Apo-E2-Allel mit 6 - 10 % (Houlston et al. 1989). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Zahlen bei den Kontrollen größenordnungsmäßig ebenfalls so nachgewiesen werden. Die Häufigkeit des Apo E3 lag in unserer Untersuchung bei 73 %, die von Apo E4 etwas höher als beschrieben bei 18 %, Apo E2 konnte in 9 % der Fälle gefunden werden. Eine Erhöhung der Allelhäufigkeit bei Patienten mit DAT konnte in den Jahren nach der Erstbeschreibung in vielen weiteren Untersuchungen bestätigt werden (Saunders et al., 1993; St. Clair et al., 1995), dieser Nachweis gelang auch bei durch neuropathologische Aufarbeitung bestätigten Fällen von DAT (Saunders et al., 1993). Dabei wiesen homozygote Träger des Apo-E4-Allels gegenüber den anderen Genotypen das höchste Erkrankungsrisiko auf, gefolgt von den heterozygoten Trägern, die immer noch ein deutlich erhöhtes Risiko gegenüber altersgematchten Kontrollprobanden aufwiesen, denen das entsprechende Allel fehlte. Unklar bleibt jedoch bislang die genaue Rolle des Apo-E4-Allels in der Pathogenese. Weiterhin ist die Assoziation zwischen dem Merkmal DAT und Apo E4 offenbar in klinischen Populationen deutlicher als in der Allgemeinbevölkerung (Tsuang et al., 1996). Dies spricht dafür, dass der Apo-E-Genotyp am ehesten das Erkrankungsalter herabsetzt, weniger das absolute Risiko (Benjamin et al.,



1996; Meyer et al., 1998) zu erkranken. Es kommt damit zu einer Selektion jüngerer Individuen mit schwererem Verlauf und vorhandenem Apo-E4-Allel. Ebenso könnte die vermehrte Assoziation in klinischen Populationen auf das Vorliegen weiterer, kopathogener Faktoren hinweisen, die in Kombination mit Apo E das Erkrankungsrisiko für DAT erhöhen und so zum Eintritt in eine klinische Behandlung führen.

Wurde in der vorliegenden Arbeit die Genotypisierung von Apo E als einziges diagnostisches Kriterium verwendet, so konnten zwei Drittel der untersuchten Probanden (ca. 67 %) korrekt als DAT-Patienten oder Kontrollen klassifiziert werden. Die Sensitivität und Spezifität der Diagnose DAT wurde unter Einbeziehung des Polymorphismus des LDL-Rezeptors Exon 8 in die Analyse nicht verbessert. Im Gegensatz dazu zeigen jedoch die Daten, dass das individuelle relative Risiko für DAT zunimmt, wenn zumindest eines der beiden Allele, nämlich das Apo-E4-Allel oder LDL-Rezeptor-Allel Thr des Exon 8 vorhanden ist. Der prädiktive Wert des Apo-E-Polymorphismus alleine oder zusammen mit anderen in dieser Studie beobachteten Polymorphismen bleibt jedoch immer noch limitiert und stellt kein ausreichendes diagnostisches Kriterium dar.

Ebenso wird in der Literatur die Gültigkeit der Assoziation zwischen dem Apo-E4-Allel und der DAT für verschiedene ethnische Gruppen in Frage gestellt. So konnte zwar eine solche Assoziation bei schwarzen Amerikanern nachgewiesen werden (Hendrie et al., 1995), in einer afrikanischen Population war dies jedoch nicht der Fall (Osuntokun et al., 1995).

Bezüglich des Erkrankungsalters tragen jüngere Alterskohorten ein höheres Erkrankungsrisiko, wohingegen Alterskohorten z.B. über 80 Jahren ein niedrigeres relatives Risiko aufweisen (Corder et al., 1994; Frisoni et al., 1998). Insgesamt setzt nach derzeitigem Stand der Untersuchungen das Apo-E4-Allel das Ersterkrankungsalter herab (Benjamin et al., 1996), wobei ein maximaler Effekt des Apo-E4-Allels bis zum 70. Lebensjahr zu bestehen scheint, das allgemeine Erkrankungsrisiko wird jedoch weniger beeinflusst (Blacker et al., 1997).

Ausgehend von dem Befund, dass das Apo-E4-Allel einen Risikofaktor für die Entwicklung einer sporadischen DAT darstellt, sowie von der Beobachtung, dass auch bei diesen sporadischen Fällen eine familiäre Häufung auftritt, stellt sich die Frage, ob nicht das Apo-E4-Allel als prädiktiver Faktor für diese familiäre Belastung anzusehen ist. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass das Apo-E4-Allel lediglich bei einem Teil

der untersuchten Populationen die familiäre Häufung der DAT zu erklären vermag. Somit muss von der Existenz weiterer, möglicherweise ergänzender Faktoren ausgegangen werden (Farrer et al., 1995; Houlden et al., 1994; Li et al., 1996; Martinez et al., 1998). Neben dem Alter als wichtigstem Risikofaktor, sind die familiäre Belastung mit DAT und das Apo-E4-Allel die wichtigsten Prädiktoren für die Entwicklung einer DAT (Duara et al., 1996). Dabei addieren sich beide Prädiktoren, was das Erkrankungsalter betrifft, hinsichtlich des Erkrankungsrisikos per se ist dies jedoch nicht der Fall (Jarvik et al., 1996).

Demgegenüber stehen einige Untersuchungen, die bei der familiären, früh beginnenden Form der DAT keinen Einfluss des Apo-E4-Allels auf das Erkrankungsalter bzw. auf das Erkrankungsrisiko nachweisen konnten (Van Broeckhoven et al., 1994; Houlden et al., 1999). In einer anderen Studie wurden allerdings erhöhte Allelfrequenzen des Apo-E4-Allels gefunden, die aber aufgrund der kleinen Zahl der Probanden in der Stichprobe nicht signifikant waren (Yu et al., 1994).

Bezüglich der Pathogenese der DAT ist die Rolle des Apolipoprotein-E-Allels und seines Genproduktes Apolipoprotein E noch ungeklärt. Für die Entwicklung einer DAT ist das Vorhandensein des Apo-E4-Allels weder notwendig noch ausreichend, so dass weitere genetische Faktoren in die Krankheitsentstehung involviert sein müssen. Es gibt weiterhin Hinweise darauf, dass Apolipoproteine an der  $\beta$ -Amyloid-Ablagerung beteiligt sind, und sich verschiedene Apolipoproteine in ihrer Wirkung hierbei untereinander vertreten können (Harr et al., 1996). Daher liegt die Untersuchung anderer Apolipoprotein-Gene nahe, welche auch in dieser Studie durchgeführt wurde.

## 4.2 Apolipoprotein CI als potentieller Suszeptibilitätsmarker

Von besonderem Interesse sind dabei die Gene für die Apolipoproteine CI und CII, deren Genloci in unmittelbarer Nähe des Apo-E4-Genes auf Chromosom 19 liegen. Einige Untersuchungen konnten eine deutliche Assoziation zwischen der DAT und einem Polymorphismus im Apo-CI-Genlocus nachweisen (Drigalenko et al., 1998; Poduslo et al., 1998; Ki et al., 2002), wohingegen die Assoziation mit anderen benachbarten Genorten, wie Apo CII und D19S178 nur schwache Assoziationen mit der DAT, andere Gene überhaupt keine zeigten (Poduslo et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit war die Allelfrequenz des Apo-CI-Allels A<sub>2</sub> bei DAT-Patienten signifikant erhöht. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit dieses Allels eine deutliche Assoziation mit dem Apo-E4-Allel aufweist. Die Frequenz des Apo-CI-Allels A<sub>2</sub> bei den DAT-Patienten war hier der Allelfrequenz von Apo E4 ähnlich (0,36 bei Apo CI A<sub>2</sub>, 0,32 bei Apo E4). Eine enge Verknüpfung der beiden Allele wurde auch von anderen Untersuchern gefunden (Poduslo et al., 1995; Kamino et al., 1996; Lauer et al., 1998). Bis jetzt ist die exakte Funktion des Apo CI unklar, insbesondere, ob es eine direkte oder indirekte Rolle bei der Pathogenese der DAT spielt. Klar ist, dass Apo CI die Bindung des Apo E an das LDL-Rezeptor assoziierte Protein verhindert (Weisgraber et al., 1990), das an der Degradation des  $\beta$ -Amyloid Präkursor Proteins beteiligt ist (Kounnas et al., 1995). Insgesamt wird in der Literatur ein Linkage-Disequilibrium zwischen dem Apo-CI-Polymorphismus und dem Apo-E4-Allel angenommen (Yu et al. 1994; Poduslo et al., 1995; Tysoe et al., 1998). Ein weiteres, in der Literatur behandeltes Apolipoprotein ist das A-IV, das als Bestandteil der Plasmalipide in den Metabolismus des Zentralen Nervensystems involviert scheint. Czászár et al. (1997) konnten zeigen, dass zumindest in der von ihnen untersuchten Population ein häufiger Polymorphismus des Apo-A-IV-Gens signifikant mit der DAT assoziiert ist, so dass hier ein weiterer Suszeptibilitätsmarker für die DAT vorliegen könnte.

### 4.3 $\alpha_1$ -Antichymotrypsin als Kandidatengen für die DAT

Ein weiteres untersuchtes Gen ist das des Proteaseinhibitors  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin (ACT), der in den Amyloidplaques vermehrt auftritt und, wie Apolipoprotein E eine hohe Affinität zum  $\beta$ -Amyloid aufweist. Eventuell ist  $\alpha_1$ -ACT auch bei der Polymerisation des  $\beta$ -Amyloids beteiligt. Weiterhin sollen die Serumkonzentrationen von  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin bei Patienten mit DAT und deren Angehörigen 1. Grades erhöht sein (Altstiel et al., 1995; Gabriel et al., 1998).

Im Gegensatz zu einer früheren Studie mit kleinerer Fallzahl (Thome et al. 1995), war in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied zwischen den Allelfrequenzen bei DAT-Patienten und Kontrollen zu verzeichnen. Die pathogenetische Rolle des  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin ist noch umstritten. Kamboh et al. (1995) konnten für einen Polymorphismus des  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin-Gens, genauer gesagt eines Signalpeptids in diesem Gen, ein signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko für die DAT nachweisen. Ausserdem wurde ein Einfluss auf den Gendosiseseffekt des hetero- oder homozygot vorliegenden Apo-E4-Allels postuliert, insbesondere ein additiver Effekt des  $\alpha_1$ -ACT A/A-Genotyps und des Apo-E 4/4-Genotyps (Kamboh et al., 1995; DeKosky et al., 1996). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit wie auch durch zahlreiche andere Forschungsgruppen (Thome et al., 1995; Haines et al., 1996; Müller et al., 1996; Muramatsu et al., 1996; Nacmias et al., 1996; Didierjean et al., 1997; Fallin et al., 1997; Murphy et al., 1997; Tysoe et al., 1997; Durany et al., 1998; Lamb et al., 1998; Durany et al., 1999) nicht bestätigt werden. Die Allelfrequenzen stimmten in der vorliegenden Arbeit (A: 0,52; T: 0,48) mit den von Kamboh gefundenen Werten (A: 0,51; T: 0,49) fast exakt überein. In Bezug auf  $\alpha_1$ -ACT gibt es auch Hinweise, dass das Erkrankungsalter durch den  $\alpha_1$ -ACT-A/A-Genotyp herabgesetzt werden könnte (Talbot et al., 1996). Auf der anderen Seite wurde in einer japanischen Population eine Erhöhung des  $\alpha_1$ -ACT-Allels A lediglich bei Patienten mit fehlendem Apo-E4-Allel gefunden (Muramatsu et al., 1996). Insgesamt gibt es zwar Hinweise darauf, dass sowohl  $\alpha_1$ -ACT als auch Apo E in die Pathogenese der DAT involviert sind, die Daten der vorliegenden Arbeit ergeben jedoch keinen Anhalt für eine wesentliche Beeinflussung des Risikos für DAT durch  $\alpha_1$ -ACT, weder alleine noch in Kombination mit dem Apo-E-Polymorphismus.

#### **4.4 Das LDL-Rezeptor-Gen und mögliche Assoziation der DAT mit dem Fettstoffwechsel**

In der vorliegenden Arbeit wurden ferner zwei Polymorphismen in den Exons 8 und 13 des Low-Density Lipoprotein-Rezeptor-Gens untersucht, das auch im ZNS exprimiert wird und als Rezeptor des Apolipoprotein E fungiert.

Hinsichtlich der Relevanz der Untersuchung von Proteinen aus dem Fettstoffwechsel ist zum einen die physiologische Verknüpfung mit dem bekannten, etablierten Risikofaktor Apo E4 zu nennen. Auf der anderen Seite konnten in zahlreichen Untersuchungen Veränderungen in der molekularen Dynamik neuronaler und nicht-neuronaler Membranen beobachtet werden, die sich aus Lipiden und Proteinen zusammensetzen. So konnten bei der DAT Veränderungen in Zusammensetzung und Metabolismus von Phospholipiden und damit strukturelle Veränderungen an neuronalen Zellmembranen gefunden werden (Ellison et al., 1987; Nitsch et al., 1992), insbesondere eine Reduktion des Anteils an Phospholipiden. Als mögliche Folgen dieser Veränderungen werden Einflüsse auf die synaptische Funktion angenommen, ebenso wie auf den Stoffwechsel transmembranaler Proteine, zu denen auch das Amyloid-Präkursor-Protein, die Präseniline bzw. Neurotransmitter-Rezeptoren zählen. Weiterhin wurde eine Erhöhung der Membranfluidität (Hartmann et al., 1994; Roth et al., 1995) beobachtet, welche zu einer Destabilisierung der gesamten Membran beitragen kann (Ginsberg et al., 1993), während die Veränderungen transmembranaler Proteine mit ihren strukturellen Beziehungen zu Proteinen des Zytoskeletts, wozu beispielsweise auch das Protein Tau gehört, zu weitreichenden Veränderungen in der Zelle mit deutlicher Funktionsbeeinträchtigung führen können. Einige Untersuchungen erwägen auch als Ursache für die neurotoxische Wirkung des  $\beta$ -Amyloids die Zerreißung neuronaler Membranen durch Bindung an Membranphospholipide (McLaurin und Chakrabarty, 1996). Diskutiert wird schließlich auch ein Einfluss auf die Signaltransduktion von transmembranalen Rezeptorproteinen (Hartmann et al., 1994; Roth et al., 1995). Dies kann letztlich auch Einfluss nehmen auf die Lebensfähigkeit der Neuronen, deren quantitativ bedeutsamer Untergang ein Kriterium u. a. der histologischen Diagnose DAT darstellt.

Die gefundenen Allelfrequenzen für den Polymorphismus im Exon 8 des LDL-Rezeptors mit Aminosäureaustausch 370 Ala → 370 Thr mit dem Verlust der Schnittstelle für das Restriktionsenzym *StuI* betragen 0,96 für das Alanin-Allel und 0,04 für das Threonin-Allel bei den Kontrollen, was den in der Literatur gefundenen Zahlen (Ala: 0,95; Thr: 0,05; Gudnason et al., 1995) entspricht.

Auch die Allelfrequenzen für den Polymorphismus im Exon 13 des LDL-Rezeptors mit Vorhandensein einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym *AvaII* („+“-Allel: 0,44) bzw. deren Fehlen („-“-Allel: 0,56) in der Kontrollgruppe, entsprachen exakt den Werten bei Ahn et al. (1994). Die in der vorliegenden Arbeit gefundene höhere Allelfrequenz des LDL-Rezeptor-Allels Thr bei DAT-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen verfehlte knapp das Signifikanzniveau ( $p = 0,055$ ; Tabelle 3-2). Unter gemeinsamer Betrachtung mit dem Apo-E-Polymorphismus (s.o.) zeigen jedoch die Daten, dass das individuelle relative Risiko für DAT zunimmt, wenn zumindest eines der beiden Allele Apo E4 oder das LDL-Rezeptor-Allel Thr des Exon 8 vorhanden ist. Demgegenüber zeigte der Polymorphismus des LDL-Rezeptors Exon 13 keinerlei signifikante Unterschiede zwischen DAT-Patienten und Kontrollgruppe.

Bezüglich des LDL-Rezeptors ist zu erwähnen, daß Lendon et al. (1997) eine Assoziation nachweisen konnten zwischen einem Polymorphismus im Gen des Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein (sog. LRP-Gen) und der DAT. Zwar lag keine Signifikanz mehr vor, wenn andere Risikofaktoren wie Apo E4 miteinbezogen wurden, jedoch muss wohl davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem LRP-Gen-Polymorphismus um einen Suszeptibilitätsmarker für die DAT handelt, zumal die Assoziation durch Lambert et al. (1998) nachvollzogen werden konnte.

In diesem Zusammenhang ist in ferner von einer Assoziation zwischen einem Triplet-Repeat-Polymorphismus im Gen des Very Low Density Lipoprotein-Rezeptors (VLDL-R) zu berichten, den Okuizumi et al. (1995) erstmals beschrieben. Eine Replikation dieses Befundes gelang Nachuntersuchern jedoch nicht (Chung et al., 1996; Pritchard et al., 1996).

## 4.5 Das Lipoproteinlipase-Gen zeigt keine Korrelation zur DAT

In den oben beschriebenen Zusammenhang zwischen Fettstoffwechsel und der Entstehung der DAT ist schließlich auch die Untersuchung von zwei Polymorphismen im Gen der Lipoproteinlipase einzuordnen. Hierbei wäre zunächst der Polymorphismus im Intron 6 zu nennen, der durch etwaiges Vorhandensein einer Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *PvuII* charakterisiert ist und bei den Kontrollen mit einer Allelfrequenz von 0,50 für das „+“-Allel und dementsprechend ebenfalls 0,50 für das „-“-Allel vorkam. Im Vergleich dazu betragen die Werte in der Literatur 0,43 für das „+“-Allel und 0,57 für das „-“-Allel (Peacock et al., 1992).

Weiterhin wurde ein Polymorphismus im Intron 8 des Lipoproteinlipase-Gens (LPL-Gen) zwischen den Exons 8 und 9 mit einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym *HindIII* bei dem H2-Allel bzw. deren Fehlen bei dem H1-Allel untersucht. Die gefundenen Allelfrequenzen betragen hierbei 0,68 für das H2-Allel und 0,32 für das H1-Allel und waren damit ebenfalls im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte (Gotoda et al., 1992; H2: 0.73; H1: 0,27).

Beide Polymorphismen zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede in den Allelfrequenzen von DAT-Patienten und Kontrollpersonen.

## 4.6 Methodische Schwierigkeiten

Als methodische Schwierigkeit ist in der vorliegenden Arbeit das Fehlen des histopathologischen Nachweises der Diagnose DAT anzuführen. Daher kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass einige Fälle mit noch nicht ausgeprägter klinischer Symptomatik fälschlicherweise der Kontrollgruppe zugeordnet wurden. Die Genauigkeit der klinischen Diagnose DAT unter Verwendung der in dieser Arbeit benutzten Kriterien wurde von Kosunen et al. (1996) mit 90 % angegeben. Jedoch mag die Möglichkeit der Fehlzuordnung zu unvermeidbaren Fehlern in der statistischen Auswertung führen.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass sowohl Apo E als auch Apo CI als Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung einer Demenz vom Alzheimer-Typ angesehen werden

müssen. Darüber hinaus erfordert diesbezüglich die mögliche Rolle des LDL-Rezeptorgens weitere klärende Untersuchungen. Insgesamt unterstreichen aber die vorliegenden Ergebnisse deutlich die Relevanz von Veränderungen im Lipidfettstoffwechsel für die Pathogenese der DAT.

#### **4.7 Die prädiktive Bedeutung genetischer Marker und genetischer Risikofaktoren bei der DAT**

Im Hinblick auf die DAT als gesellschaftliches Problem muss neben der Entwicklung von therapeutischen Ansätzen, die derzeit lediglich einen palliativen Charakter haben, vor allem die Klärung der Ätiopathogenese im Vordergrund stehen. Verbunden damit ist auch die Erfassung von Risikofaktoren, die das Auftreten der Erkrankung insbesondere in Bezug auf das Erkrankungsalter beeinflussen, und deren Kenntnis wiederum letztlich der Erarbeitung weiterführender Therapiekonzepte dienen kann bzw. einmal die Frühintervention oder sogar die Prophylaxe für die Entwicklung einer DAT ermöglichen könnten.

Nach dem momentanen Wissensstand kann als gesichert gelten, dass Individuen mit DAT-assoziierten Genen (wie z.B. Apo E4) einen früheren Erkrankungsbeginn haben als solche, die diese Gene nicht aufweisen. Hingegen scheint der klinische Verlauf der DAT vom Apo-E4-Genotyp weitestgehend unbeeinflusst zu sein (Farlow et al., 1998; Macgowan et al., 1998), wobei sich die klinische Symptomatik bei sporadischen und familiären Formen der DAT kaum unterscheidet (Haupt et al., 1995). Ferner konnte keine Beziehung zwischen dem Apo-E4-Genotyp und dem Auftreten über die Demenz hinausgehender psychiatrischer Störungen bei DAT-Patienten gefunden werden. Insgesamt ist die klinische Relevanz genetischer Marker gegenwärtig eher gering, die hohe Prävalenz gesunder Träger beispielsweise des Apo-E4-Allels spricht gegen eine Verwendung als Prädiktor bzw. diagnostischen Marker beim einzelnen Patienten (Oliveira et al., 1997). Hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen mit der DAT assoziierten Genen und dem Therapieerfolg existieren bislang nur wenige Studien, deren Ergebnisse kontrovers diskutiert werden (Farlow et al., 1998; Macgowan et al., 1998), so dass hier noch ein Bedarf an Therapiestudien besteht, bei denen beispielsweise der Apo-E4-Genotyp mitgetestet wird. Die Genetik der DAT wird aber in Zukunft eine immer größere



Rolle auch in der Erstellung von Risikoprofilen, sowie in Diagnostik und Therapie dieser Erkrankung spielen. So wäre es, ausgehend von Risikomodellen für die DAT in der Zukunft denkbar, ein Risikoprofil für ein Individuum zu erstellen, um daraus evtl. eine medikamentöse Langzeittherapie zur Prävention, beispielsweise der Amyloidbildung und –ablagerung einzuleiten und so den Erkrankungsbeginn zeitlich zu verschieben oder sogar den Ausbruch der Erkrankung zu verhindern.

## **4.8 Bedeutung eines Risikomodells für die DAT**

Die Notwendigkeit der Erstellung von Risikomodellen für die Entwicklung einer DAT ergibt sich aus der Tatsache, dass die Diagnose „DAT“ derzeit erst dann mit hoher Wahrscheinlichkeit gestellt werden kann, wenn die beobachteten kognitiven Defizite, wie auch die biologischen Hirnveränderungen bereits ein Stadium erreicht haben, in dem sie weitestgehend irreversibel sind. Auch fällt die differentialdiagnostische Zuordnung zur DAT gegenüber anderen Demenzformen wie der vaskulären Demenz, der Lewy-Body-Demenz, der frontalen Demenz (Pick) oder der Demenz bei der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung bei ausgeprägter Symptomatik leichter als bei leichten Demenzformen. Ebenso verhält es sich mit prognostischen Aussagen zum Verlauf der Demenz. Der klinische Verdacht auf das Vorliegen einer DAT kann letztlich erst durch die postmortale neuropathologische Untersuchung verifiziert werden. Diese wird in Deutschland lediglich bei einem kleinen Anteil der an Demenz Erkrankten durchgeführt. Der neuropathologische Nachweis von Neurofibrillen und Amyloid-Plaques entspricht dabei einer Bestandsaufnahme des Ausmaßes von neuronalem Funktionsverlust und Zelltod. Dieser ist gewissermaßen als Endzustand eines Prozesses zu verstehen, bei dem neurodegenerative Hirnveränderungen ein Ausmaß erreicht haben, welches die kognitiven Reserven eines Betroffenen so weit aufgebraucht hat, dass klinische Symptome auftreten. Dementsprechend setzt derzeit sowohl die diagnostische wie auch therapeutische Intervention erst sehr spät ein. Selbst unter Einsatz einer noch zu entwickelnden wirksamen Therapie, die das Fortschreiten der Erkrankung aufhält oder zumindest verzögert, käme deren Hilfe in vielen Fällen zu spät. Der Sinn eines Risikomodells bestünde also in der Zukunft darin, ein Risikoprofil für das Individuum zu erstellen, mit dessen Hilfe nach Abwägung von Risikofaktoren und evtl. auch Protekti-

onsfaktoren über die Durchführung einer frühzeitigen medikamentösen Prävention entschieden werden könnte.

## **4.9 Weitere für die Entwicklung einer DAT möglicherweise relevante Gene**

Nicht zuletzt, weil es sich bei der DAT offensichtlich um eine multifaktorielle und wohl auch multigenetische Erkrankung handelt, wurden in den letzten Jahren neben den bereits angeführten Genen zahlreiche weitere genetische Faktoren untersucht.

### **4.9.1 Das Präsenilin-1-Gen**

So wurde von Wragg et al. (1996) ein Polymorphismus des Introns 3' des Exons 8 des Präsenilin-1-Gens untersucht. Hierbei wurde ein zweifach erhöhtes Risiko homozygoter Träger des 1-Allels gegenüber den Heterozygoten bzw. den homozygoten Trägern des 2-Allels, an einer spät beginnenden DAT zu erkranken. Diese Assoziation konnte auch in anderen Populationen (Higuchi et al., 1996; Kehoe et al., 1996) bestätigt werden. Allerdings existieren auch andere Studien, die diesen Befund nicht bestätigen konnten (Cai et al., 1997, Scott et al., 1997). Daher muss die Bedeutung dieses Polymorphismus weiter untersucht werden.

### **4.9.2 Das Amyloid-Precursor-Protein-Gen**

Auf dem Chromosom 4 befindet sich das Gen der Non-A $\beta$ -Komponente des AD Amyloid Precursor Proteins (NACP), das zur Gruppe der Synukleine gehört, bei der Regulation der A $\beta$ -Bildung beteiligt ist und damit in die Pathogenese der DAT involviert sein könnte. Allerdings konnte keine erhöhte Rate an Mutationen bei DAT-Patienten in diesem Gen gefunden werden (Campion et al., 1995). Auch ein weiterer Polymorphismus im NACP-Gen zeigte keine Assoziation bezüglich eines erhöhten Erkrankungsrisikos für die DAT. Allerdings könnte das Allel 2 des NACP-Gens eine protektive Rolle bei der Pathogenese der DAT spielen, da es bei Apo-E4-positiven, aber gesunden Kontrollpersonen vermehrt nachgewiesen werden konnte (Xia et al., 1996).

### **4.9.3 Das Butyrylcholinesterase-Gen**

Auf Chromosom 3 befindet sich das Gen für die Butyrylcholinesterase, die wahrscheinlich als Regulator für Acetylcholinesterase im ZNS fungiert. Lehman et al. (1997) fanden die K-Variante der Butyrylcholinesterase bei Patienten mit sporadischer, spät beginnender DAT im Vergleich zu Kontrollpersonen der gleichen Altersgruppe gehäuft, dies jedoch nur bei Trägern des Apo-E4-Allels. Bislang jedoch konnte dieser Befund von zahlreichen anderen Gruppen (Brindle et al., 1998; Crawford et al., 1998; Hiltunen et al., 1998; Russ et al., 1998; Singleton et al., 1998) nicht repliziert werden.

### **4.9.4 Das $\alpha_2$ -Makroglobulin-Gen**

Weiterhin wurde das Gen des Alpha-2-Makroglobulin untersucht, dessen Genprodukt ebenso wie das  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin ein Proteaseinhibitor ist mit der Fähigkeit, die neurotoxische Wirkung des  $\beta$ -Amyloid abzumildern. Blacker et al. (1998) konnten eine deutliche Assoziation zwischen der DAT und einer Deletion im  $\alpha_2$ -Makroglobulin-Gen nachweisen. Weitere Replikationen dieses Befundes stehen noch aus.

### **4.9.5 Das Bleomycin-Hydrolase-Gen**

Auf Chromosom 17 ist das Gen für die Bleomycin-Hydrolase (BH-PEN) lokalisiert, welche zu den Cystein-Proteasen zählt und für ihre Fähigkeit bekannt ist, das Zytostatikum Bleomycin zu inaktivieren. Montoya et al. (1998) beschrieben einen Polymorphismus dieses Gens als Risikofaktor für die Entwicklung einer sporadischen DAT. Replikationsstudien fanden jedoch keine Assoziation zwischen dem Bleomycin-Hydrolase-Polymorphismus und DAT (Farrer et al., 1998; Ikeda et al., 1999; Thome et al., 1999). Vielmehr konnte ein Linkage-Disequilibrium zwischen dem Bleomycin Hydrolase-Polymorphismus und einer genetischen Variante des Promotors -491A/T des Apolipoproteins E nachgewiesen werden (Thome et al, 1999).

#### **4.9.6 Das Stickoxid-Synthase-Gen**

Dahiyat et al. (1999) postulierten den Polymorphismus Glu298Asp im Gen der Stickoxid-Synthase (NOS3) als potentielles Kandidatengen für die Entwicklung einer late-onset DAT. Dieses Ergebnis konnte allerdings in folgenden Replikationsstudien nicht nachvollzogen werden (Kunugi et al., 2000; Crawford et al., 2000; Liou et al., 2002; Tedde et al., 2002). Die mögliche Rolle des Stickoxids bei der Pathogenese der DAT muss noch weiter geklärt werden.

#### **4.10 Ausblick**

Im Hinblick auf die noch unzureichende Datenlage zu den genetischen Ursachen für DAT und deren Bedeutung für die Pathogenese der Erkrankung erscheint die Durchführung von kompletten Genom-Untersuchungen sinnvoll, um bestehende Lücken zu schließen. Bislang beschäftigten sich erst wenige Arbeitsgruppen mit kompletten Genom-Untersuchungen (Pericak-Vance et al., 1997; Zubenko et al., 1998). Dennoch wurde bereits der Genort des Apo E auf Chromosom 19 positiv mit der DAT assoziiert. Darüber hinaus wurde von weiteren positiven Befunden auf den Chromosomen 1, 10, 12 und X berichtet. Welche funktionellen Veränderungen damit verbunden sind und welche Rolle sie in der Pathogenese spielen, bleibt Gegenstand weiterer intensiver Forschungsbemühungen.

## 5. Zusammenfassung

Seit ihrer Entdeckung 1907 ist die Demenz vom Alzheimer Typ (DAT) vor allem in den demographisch überalternden westlichen Industrienationen, zu einem gesellschaftlich äußerst relevanten Problem geworden. Abgesehen vom Lebensalter zählen genetische Faktoren zu den Hauptrisikofaktoren. Neben den gut untersuchten krankheitsrelevanten Genen für die DAT in hochbelasteten Familien, konnte das Apolipoprotein-E4-Allel auf Chromosom 19 als genetischer Risikofaktor sowohl für die familiäre wie für auch die sporadische Form der DAT identifiziert werden. Das Vorhandensein des Apo-E4-Allels ist jedoch weder notwendig noch ausreichend für die Entwicklung einer DAT. Es muss also von der Existenz weiterer, möglicherweise ergänzender Faktoren ausgegangen werden. Nahe liegend erscheint eine Assoziation mit weiteren Genen, die für Proteine aus dem Fettstoffwechsel codieren.

Bei 63 Patienten mit DAT (entsprechend den NINCDS-ADRDA- und ICD 10-Kriterien) und 162 nicht-dementen psychiatrischen Patienten (insgesamt 143 Frauen und 82 Männern, also 225 Probanden) wurden die Gene für Apolipoprotein E (Apo E), Apolipoprotein CI (Apo CI),  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin (ACT), Low-density Lipoprotein Rezeptor Exon 8 und 13 (8-LDL und 13-LDL) und die Lipoproteinlipase Intron 6 und 8 (*PvuII*-Lip und *HindIII*-Lip) nach PCR-Amplifikation, Enzymrestriktion und elektrophoretischer Auftrennung auf Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen untersucht.

Das Apo-E-Allel 4, mittlerweile als Risikofaktor für die DAT etabliert, und das Apo-CI-Allel A2 zeigten sich in der Indexgruppe signifikant erhöht. In Bezug auf den Polymorphismus im Exon 8 des LDL-Rezeptors (Alanin/Threonin) ergab sich ebenfalls der Trend einer Prädominanz des Thr-Allels in der Indexgruppe. Die Verteilung der Polymorphismen von ACT und Lipoproteinlipase war in beiden beobachteten Gruppen ähnlich.

Aus den vorliegenden Daten geht hervor, dass der Polymorphismus des Apo E4 als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer sporadischen DAT angesehen werden kann und auch Apo CI möglicherweise einen Suszeptibilitätsmarker darstellt, der in der Pathogenese der DAT durch die Verhinderung der Bindung von Apo E4 an das LDL-assoziierte Protein möglicherweise eine wichtige Rolle spielt. Darüber hinaus ergibt sich aus der vorliegenden Studie ein Hinweis auf eine mögliche Rolle des LDL-Rezeptorgens.

Weiterführende Untersuchungen mit größeren Stichproben erscheinen jedoch dringend erforderlich. Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass der Lipidstoffwechsel in der Pathogenese der sporadischen DAT von erheblicher Bedeutung ist.

Als methodisches Problem der vorliegenden Arbeit muss das Fehlen des histopathologischen Nachweises der Diagnose DAT genannt werden. Somit ist nicht auszuschließen, dass einige Fälle mit noch nicht ausgeprägter Symptomatik fälschlicherweise der Kontrollgruppe zugeordnet wurden.

Im Hinblick auf die DAT als gesellschaftliches Problem muss neben der Entwicklung von therapeutischen Ansätzen, die derzeit lediglich einen palliativen Charakter haben, vor allem die Klärung der Ätiopathogenese im Vordergrund stehen. Verbunden damit ist aber auch die Erfassung von Risikofaktoren, die das Auftreten der Erkrankung bzw. das Ersterkrankungsalter beeinflussen. Erkenntnisse hierzu könnten wiederum letztlich der Erarbeitung weiterführender Therapiekonzepte und der Entwicklung von Präventionsmaßnahmen dienen.

Dabei könnte der Genetik eine wichtige Rolle hinsichtlich der Erstellung von Risikoprofilen zukommen. So wäre es, ausgehend von einem Risikomodell für die DAT vorstellbar, ein Risikoprofil für ein Individuum zu erstellen, um daraus die Notwendigkeit einer frühzeitigen medikamentösen Therapie zur Hemmung der Amyloidbildung als Präventionsmaßnahme abzuleiten und den Erkrankungsbeginn dadurch hinauszuschieben.

Auf dem Weg dorthin erscheint die Erstellung von Risikomodellen für die Entwicklung einer DAT dringlich. Einerseits könnte dadurch die Diagnostik verbessert werden, welche derzeit entweder klinisch oder durch neuropathologische post mortem Untersuchungen erfolgt. Die klinische Diagnose birgt dabei das Risiko von Fehldiagnosen oder auch verspäteter Diagnosestellung. Andererseits könnte die differentialdiagnostische Abgrenzung gegenüber anderen Demenzformen verbessert werden.

Zur Erweiterung der Kenntnisse um die Genetik der Demenz vom Alzheimer Typ erscheinen, neben der Abklärung bekannter Suszeptibilitätsgene durch Studien mit großen Fallzahlen, v. a. komplette Genomuntersuchungen sinnvoll, da so weitere, die Entwicklung der DAT beeinflussende Gene identifiziert werden könnten.

## 6. Literatur

**Abraham CR**, Selkoe, DJ, Potter H (1998) Immunochemical identification of the serine protease inhibitor  $\alpha_1$ -antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell* 52: 487-501

**Ahn YI**, Kamboh MI, Aston CE, Ferrell RE, Hamman RF (1994) Role of common genetic polymorphisms in the LDL receptor gene in affecting plasma cholesterol levels in the general population. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 14 (5): 663-670

**Altstiel LD**, Lawlor B, Mohs R, Schmeidler J, Dalton A, Mehta P, Davis K (1995) Elevated alpha-1-antichymotrypsin serum levels in a subset of nondemented first-degree relatives of Alzheimer's disease patients. *Dementia* 6: 17-20

**Alzheimer A** (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift der psychiatrischen und psychisch-gerichtlichen Medizin* 64: 146

**Alzheimer A** (1898) Neuere Arbeiten über die Dementia senilis und die auf atheromatöser Gefäßerkrankung basierenden Gehirnkrankheiten. *Monatsschrift für Psychiatrie und Neurologie* 3: 101-115

**Beffert U**, Arguin C, Poirier J (1999) The polymorphism in exon 3 of the low density lipoprotein receptor-related protein gene is weakly associated with Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 259: 29-32

**Benjamin R**, Leake A, McArthur FK, Candy JM, Ince PG, Edwardson JA, Torvik A, Morris CM, Bjertness E (1996) Apolipoprotein E genotype and Alzheimer's disease in an elderly Norwegian cohort. *Neurodegeneration* 5: 43-47

**Bickel H** (1995) Demenzkranke in Alten- und Pflegeheimen: Gegenwärtige Situation und Entwicklungstendenzen. In: *Forschungsinstitut der Friedrich-Ebert-Stiftung (Hrsg) Medizinische und gesellschaftspolitische Herausforderung: Alzheimer Krankheit. Der langsame Zerfall der Persönlichkeit. Friedrich-Ebert-Stiftung, Bonn, 49-68*

**Blacker D**, Haines JL, Rodes L, Terwedow H, Go RC, Harrell LE, Perry RT, Bassett SS, Chase G, Meyers D, Albert MS, Tanzi R (1997) ApoE-4 and age at onset of Alzheimer's disease: The NIMH Genetics Initiative. *Neurology* 48: 139-147

**Blacker D**, Wilcox MA, Laird NM, Rodes L, Horvath SM, Go RC, Perry R, Watson B, Bassett SS, McInnis MG, Albert MS, Hyman BT, Tanzi RE (1998) Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nature Genetics* 19: 357-360

**Brindle N**, Song Y, Rogaeva E, Premkumar S, Levesque G, Yu G, Ikeda M, Nishimura M, Paterson A, Sorbi S, Duara R, Farrer L, St George-Hyslop P (1998) Analysis of the butyrylcholinesterase gene and nearby chromosome 3 markers in Alzheimer disease. *Human Molecular Genetics*: 933-935

**Brooks AJ**, Clair DS (1994) Synuclein proteins and Alzheimer's disease. *Trends in Neuroscience* 17: 404-405

**Bullido MJ**, Artiga MJ, Recuero M, Sastre I, García MA, Aldudo J, Lendon C; Han SW; Morris JC; Frank A; Vazquez J; Goate A; Valdivieso F (1998) A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nature Genetics* 18: 69-71

**Cai X**, Stanton J, Fallin D, Hoyne J, Duara R, Gold M, Sevush S, Scibelli P, Crawford F, Mullan M (1997) No association between the intronic presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease in clinic and population-based samples. *American Journal of Medical Genetics* 74: 202-203

**Campion D**, Martin C, Heilig R, Charbonnier F, Moreau V, Flaman JM, Petit JL, Hannequin D, Brice A, Frebourg T (1995) The NACP/Synuclein Gene: Chromosomal Assignment and Screening for Alterations in Alzheimer Disease. *Genomics* 26: 254-257



**Chung H**, Roberts CT, Greenberg S, Rebeck W, Christie R, Wallace R, Jacob HJ, Hyman BT (1996) Lack of Association of Trinucleotide Repeat Polymorphisms in the Very-Low-Density Lipoprotein Receptor Gene with Alzheimer's Disease. *Annals of Neurology* 39: 800-803

**Corder EH**, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families. *Science* 261:921-923

**Corder EH**, Saunders AM, Risch NF, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature Genetics* 7:180-184

**Crawford F**, Fallin D, Suo Z, Abdullah L, Gold M, Gauntlett A, Duara R, Mullan M (1998) The butyrylcholinesterase gene is neither independently nor synergistically associated with late-onset AD in clinic and community-based populations. *Neuroscience Letters* 249: 115-118

**Crawford F**, Freeman M, Abdullah L, Schinka J, Gold M, Duara R, Mullan M (2000) No association between the NOS3 codon 298 polymorphism and Alzheimer's disease in a sample from the United States. *Annals of Neurology* 47: 687

**Cruts M**, Backhovens H, Wang SY, Van Gassen G, Theuns J, De Jonghe CD, Wehnert A, De Voecht J, De Winter G, Cras P (1995) Molecular genetic analysis of familial early-onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. *Human Molecular Genetics* 4 (12): 2363-2371

**Császár A**, Kálmán J, Szalai C, Janka Z, Romics L (1997) Association of the apolipoprotein A-IV codon 360 mutation in patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 230: 151 – 154

**Dahiyat M**, Cumming A, Harrington C, Wischik C, Xuereb J, Corrigan F, Breen G, Shaw D, St. Clair D (1999) Association between Alzheimer's disease and the NOS3 gene. *Annals of Neurology* 46: 664-667

**Deeb SS**, Peng R (1989) Structure of the Human Lipoprotein Lipase Gene. *Biochemistry* 28 (10): 4131-4135

**De Kosky ST**; Aston CE, Kamboh MI (1996) Polygenic determinants of Alzheimer's disease: modulation of the risk by alpha-1-antichymotrypsin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 802: 27-34

**Didierjean O**, Martinez M, Campion D et al. (1997) No effect of the Alpha-1-antichymotrypsin A allele in Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 643: 103-105

**Dilling H**, Mombour W, Schmidt MH, editors (1991) Internationale Klassifikation Psychischer Störungen: ICD 10, Kapitel V (F). Klinisch-diagnostische Leitlinien, Bern: Weltgesundheitsorganisation (WHO).

**Drigalenko E**, Poduslo S, Elston R (1998) Interaction of the apolipoprotein E and CI loci in predisposing to late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 51: 131-135

**Duara R**, Barker WW, Loper-Alberola R, Loewenstein DA, Grau LB, Gilchrist D, Sevush S, George-Hyslop PHS (1996) Alzheimer's disease: Interaction of apolipoprotein E genotype, family history of dementia, gender, education, ethnicity, and age of onset. *Neurology* 46: 1575-1579

**Durany N**, Morgan K, Thome J, Tilley L, Kalsheker N, Riederer P, Cruz-Sánchez FF (1998) Relationship between the alpha-1-antichymotrypsin microsatellite polymorphism and Apolipoprotein-E in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Reports* 1: 315-320

**Durany N**, Cruz-Sánchez FF, Thome J, Höhn H, Retz W, Riederer P, Rösler M (1999) No association between  $\alpha_1$ -antichymotrypsin and Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Alzheimer's Reports* 2: 159-164

**Ellison DW**, Flint Beal M, Martin JB (1987) Phosphoethanolamine and ethanolamine are decreased in Alzheimer's disease and Huntington's disease. *Brain Research* 417: 289-392

**Ernst RL**, Hay JW, Fenn C, Tinklenberg J, Yesavage JA (1997) Cognitive function and the costs of Alzheimer disease. *Archives of Neurology* 54: 687-693

**Ernst RL**, Hay JW (1994) The US economic and social costs of Alzheimer's disease revisited. *American Journal of Public Health* 84: 1261-1264

**Faber JP**, Poller W, Olek K, Baumann U, Carlson J, Lindmark B, Eriksson S (1993) The molecular basis of  $\alpha_1$ -antichymotrypsin deficiency in a heterozygote with liver and lung disease. *Journal of Hepatology* 18: 313-321

**Fallin D**, Reading S, Schinka J, Hoyne J, Scibelli P, Gold M, Crawford F, Mullan M (1997) No interaction between the APOE and the alpha-1-antichymotrypsin genes on risk for Alzheimer's disease. *American Journal of Medical Genetics* 74: 192-194

**Farlow MR**, Lahiri DK, Poirier J, Davignon J, Schneider L, Hui SL (1998) Treatment outcome of tacrine therapy depends on apolipoprotein genotype and gender of the subjects with Alzheimer's disease. *Neurology* 50: 669-677

**Farrer LA**, Cupples LA, van Duijn CM, Kurz A, Zimmer R, Muller U, Green RC, Clarke V, Shoffner J, Wallace DC (1995) Apolipoprotein E genotype in patients with Alzheimer's disease: implications for the risk of dementia among relatives. *Annals of Neurology* 38: 797-808

**Farrer LA**, Abraham CR, Haines JL, Rogaeva EA, Song Y, McGraw WT, Brindle N, Premkumar S, Scott WK, Yamaoka LH, Saunders AM, Roses AD, Auerbach SA, Sorbi S, Duara R, Pericak-Vance MA, St George-Hyslop PH (1998) Association between bleomycin hydrolase and Alzheimer's disease in caucasians. *Annals of Neurology* 44 :808-811

**Fraser PE**, Nguyen JT, McLachlan DR, Abraham CR, Kirschner DA (1993)  $\alpha$ 1-antichymotrysin binding to Alzheimer A  $\beta$  peptides is sequence specific and induces fibril disaggregation in vitro. *Journal of Neurochemistry* 61: 298-305

**Frisoni GB**, Manfredi M, Geroldi C, Binetti G, Zanetti O, Bianchetti A, Trabucchi M (1998) The prevalence of apoE-e4 in Alzheimer's disease is age dependent. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 65: 103-106

**Gabriel SM**, Marin DB, Aisen PS, Lantz M, Altstiel LD, Davis KL, Mohs RC (1998) Association of Elevated  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin With Cognitive Impairment in a Prospective Study of the Very Old. *American Journal of Psychiatry* 155: 698-700

**Gao S**, Hendrie HC, Hall KS, Hui S (1998) The relationship between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease. *Archives of General Psychiatry* 55: 809-815

**Ginsberg L**, Atack JR, Rapoport SI, Gershfeld NL (1993) Regional specificity of membrane instability in Alzheimer's disease in brain. *Brain Research* 615: 355-357

**Goate A**, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 21; 349 (6311):704-706

**Gotoda T**, Yamada N, Murase T, Shimano H (1992) Detection of three separate DNA polymorphisms in the human lipoprotein lipase gene by gene amplification and restriction endonuclease digestion. *Journal of Lipid Research* 33: 1067

**Gudnason V**, Patel D, Sun X-M, Humphries S, Soutar AK, Knight BL (1995) Effect of the *StuI* polymorphism in the LDL receptor gene (Ala 370 to Thr) on lipid levels in healthy individuals. *Clinical Genetics* 47: 68-74

**Hachinski VC**, Iliff LD, Zilhka E, Du Boulay GH, McAllister VL, Marshall J, Russell RW, Symon L (1975) Cerebral blood flow in dementia. *Archives of Neurology* 32(9):632-637

**Haines JL**, Pritchard ML, Saunders AM, Schickel JM, Growdon JH, Gaskell PC, Farrer LA, Auerbach SA, Gusella JF, Locke PA, Rosi BL, Yamaoka L, Small GW, Conneally PM, Roses AD, Pericak-Vance MA (1996) No genetic effect of alpha1-antichymotrypsin in Alzheimer disease. *Genomics* 33: 53-56

**Harr SD**, Uint L, Hollister R, Hyman BT, Mendez AJ (1996) Brain Expression of Apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry* 2429-2435

**Harsányi A**, Thome J, Baumer M, Winter M, Rösler M, Kornhuber J, Riederer P (1997) Potential Genetic Markers of Sporadic Alzheimer's Dementia. *Biological Psychiatry* (Suppl., Abstracts of the World Congress of Biological Psychiatry 1997 Nice, France) 42 (1S): 91S

**Hartmann H**, Eckert A, Müller WE (1994) Apolipoprotein E and cholesterol affect neuronal calcium signalling: the possible relationship to beta-amyloid neurotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 200,3: 1185-1192

**Haupt M**, Kurz A, Pollmann S, Romero B (1992) Alzheimer's disease: identical phenotype of familial and non-familial cases. *Journal of Neurology* 39:248-250

**Helbecque N**, Richard F, Cottel D, Neuman E, Guez D, Amouyel P (1998) The very low density lipoprotein receptor is a genetic susceptibility factor for Alzheimer disease in a European Caucasian population. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 12: 368-371

**Helisalmi S**, Mannermaa A, Lehtovirta M, Ryyanen M, Riekkinen P, Soininen H (1997) No association between alpha1-antichymotrypsin polymorphism, Apolipoprotein E and patients with late-onset Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 231: 56-58

**Henderson AS**, Jorm AF, Korten AE, Creasey H, McCusker E, Broe GA, Longley W, Anthony JC (1992) Environmental risk factors for Alzheimer's disease: their relationship to age of onset and to familial or sporadic types. *Psychological Medicine* 22: 429-436

**Hendrie HC**, Hall KS, Hui S, Unverzagt FW, Yu CE, Lahiri DK, Sahota A, Farlow M, Musick B, Class CA (1995) Apolipoprotein E genotypes and Alzheimer's disease in a community study of elderly African Americans. *Annals of Neurology* 37: 118-120

**Heun R**, Maier W (1995) Risks of Alzheimer's disease in First-Degree Relatives. *Archives of General Psychiatry* 52: 317-318

**Higuchi SM**, Muramatsu T, Matsushita S, Arai H, Sasaki H (1996) Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 347: 1186

**Hiltunen M**, Mannermaa A, Helisalmi S, Koivisto A, Lehtovirta M, Ryyanen M, Riekkinen PS, Soininen H (1998) Butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 genes do not act in synergy in Finnish late-onset Alzheimer's disease patients. *Neuroscience Letters* 250: 69-71

**Hollenbach E**, Ackermann S, Hyman BT, Rebeck GW (1998) Confirmation of an association between a polymorphism in exon 3 of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene and Alzheimer's disease. *Neurology* 50: 1905-1907

**Houlden H**, Crook R, Hardy J, Roques P, Collinge J, Rossor M (1994) Confirmation that familial clustering and age of onset in late onset Alzheimer's disease are determined at the apolipoprotein E locus. *Elsevier Neuroscience Letters* 174: 222-224

**Houlden H**; Rizzu P; Stevens M; de Knijff P; van Duijn CM; van Swieten JC; Heutink P; Perez-Tur J; Thomas V; Baker M; Morris H; Rossor M; Janssen JC; Petersen RC; Dodd P; Dark F; Boeve B; Dickson D; Davies P; Pickering-Brown S; Mann D; Adamson J; Lynch T; Payami H; Hardy J; et al (1999) Apolipoprotein E genotype does not affect the age of onset of dementia in families with defined tau mutations. *Neuroscience Letters* 260:193-195

**Houlston RS**, Snowden C, Green F, Alberti KG, Humphries SE (1989) Apolipoprotein (apo) E genotypes by polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide probes: no detectable linkage disequilibrium between apo E and apo CII. *Human Genetics* 83: 364-368

**Namba Y**, Ouchi Y, Asada T, Hattori H, Ueki A, Ikeda K (1999) Lack of association between bleomycin hydrolase gene polymorphism and Alzheimer's disease in Japanese people. *Annals of Neurology* 46:136-137

**Jarvik GP**, Larson EB, Goddard K, Kukull WA, Schellenberg GD, Wijsman EM (1996) Influence of Apolipoprotein E genotype on the Transmission of Alzheimer Disease in Community-Based Sample. *American Journal of Human Genetics* 58: 191-200

**Jorm AF**, Jolley D (1998) The incidence of dementia. A meta-analysis. *Neurology* 51: 728-733

**Kamboh MI**, Sanghera DK, Ferrell RE, DeKosky ST (1995) APOE\*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by  $\alpha$ 1-antichymotrypsin polymorphism. *Nature Genetics* 10: 486-488

**Kamino K**, Yoshiiwa A, Nishiwaki Y, Nagano K, Yamamoto H, Kobayashi T, Nonomura Y, Yoneda H, Sakai T, Imagawa M, Miki T, Ogihara T (1996) Genetic association study between senile dementia of Alzheimer's type and APOE/C1/C2 gene cluster. *Gerontology* 42 (supplement 1): 12-19

**Kang DE**, Saitoh T, Chen X, Xia Y, Masliah E, Hansen LA, Thomas RG, Thal LJ, Katzman R (1997) Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 49: 56-61

**Kehoe P**, Williams J, Lovestone S, Wilcock G, Owen MJ (1996) Presenilin-1 polymorphism and Alzheimer's disease. The UK Alzheimer's Disease Collaborative Group. *Lancet* 347 1185

**Ki CS**, Na DL, Kim DK, Kim HJ, Kim JW (2002) Genetic association of an apolipoprotein C-I (APOC1) gene polymorphism with late-onset Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 319: 75-78

**Kosunen O**, Soininen H, Paljarvi L, Heinonen O, Talasniemi S, Riekkinen PJ Jr (1996) Diagnostic accuracy of Alzheimer's disease: a neuropathological study. *Acta Neuropathologica* 91: 185-193

**Kounnas MZ**, Moir RD, Rebeck GW, Bush AI, Argraves WS, Tanzi RE, Hyman BT, Strickland DK (1995) LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* 82: 331-340



**Kunugi H**, Akahane A, Ueki A, Otsuka M, Isse K, Hirasawa H, Kato N, Nabika T, Kobayashi S, Nanko S (2000) No evidence for an association between the Glu298Asp polymorphism of the NOS3 gene and Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission* 107: 1081-1084

**Lamb H**, Christie J, Singleton AB, Leake A, Perry RH, Ince PG, McKeith IG, Melton LM, Edwardson JA, Morris CM (1998) Apolipoprotein E and alpha-1 antichymotrypsin polymorphism genotyping in Alzheimer's disease and in dementia with Lewy bodies. Distinctions between diseases. *Neurology* 50: 388-391

**Lambert JC**, Wavrant-De Vrièze F, Amouyel P, Chartier-Harlin MC (1998) Association at LRP gene locus with sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Lancet* 351: 1787-1788

**Lauer SJ**, Walker D, Elshourbagy NA, Reardon CA, Levy-Wilson B, Taylor JM (1998) Two copies of the human Apolipoprotein C-I gene are linked closely to the apolipoprotein E gene. *Journal of Biological Chemistry* 263: 7277-7286

**Lehmann DJ**, Johnston C, Smith AD (1997) Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics* 6: 1933-1936

**Lendon CL**, Talbot CJ, Craddock NJ, Han SW, Wragg M, Morris JC, Goate AM (1997) Genetic association studies between dementia of the Alzheimer's type and three receptors for apolipoprotein E in a Caucasian population. *Neuroscience Letters* 222: 187-190

**Levy E**, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B (1990) Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 190 1; 248 (4959):1124-1126

**Levy-Lahad E**, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 18; 269 (5226):973-977

**Li G**, Silverman JM, Altsiel LD, Haroutunian V, Perl DP, Purohit D, Birstein S, Lantz M, Mohs RC, Davis KL (1996) Apolipoprotein E-epsilon 4 allele and familial risk in Alzheimer's disease. *Genetic Epidemiology* 13: 285-298

**Li G**, Silverman JM, Smith CJ, Zaccario ML, Schmeidler J, Mohs RC, Davis KL (1995) Age at onset and familial risk in Alzheimer's disease. *American Journal of Psychiatry* 152(3):424-30

**Liou YJ**, Hong CJ, Liu HC, Liu CY, Liu TY, Chen IC, Tsai SJ (2002) No association between the neuronal nitric oxide synthase gene polymorphism and Alzheimer disease. *American Journal of Medical Genetics* 119: 687-688

**Ma J**, Yee A, Brewer HB, Das S, Potter H (1994) Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments. *Nature* 372: 92-94

**Mahley RW** (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240: 622-630

**Macgowan SH**, Wilcock GK, Scott M (1998) Effect of gender and apolipoprotein E genotype on response to acetylcholinesterase therapy in Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry* 13: 612-630

**Martinez M**, Campion D, Brice A, Hannequin D, Dubois B, Didierjean O, Michon A, Thomas-Anterion C, Puel M, Frebourg T, Agid Y, Clerget-Darpoux F (1998) Apolipoprotein E epsilon4 allele and familial aggregation of Alzheimer disease. *Archives of Neurology* 55: 810-816

**Matsubara E**, Hirai S, Amari M, Shoji M, Yamaguchi H, Okamoto K, Ishiguro K, Harigaya Y, Wakabayashi K (1990) Alpha 1-antichymotrypsin as a possible biochemical marker for Alzheimer-type dementia. *Annals of Neurology* 28: 561-567

**Matthews RT**, Beal MF (1995) Increased 3-nitrotyrosine in brains of Apo E-deficient mice. *Brain Research* 718: 181-184

**Mayeux R**, Ottmann R, Maestre G, Ngai C, Tang MX, Ginsberg H, Chun M, Tycko B, Shelanski M (1995) Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein-epsilon 4 in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 45: 555-557

**Mayeux R**, Sano M, Chen J, Tatemichi T, Stern Y (1991) Risk of dementia in first-degree relatives of patients with Alzheimer's disease and related disorders. *Archives of Neurology* 48: 269-273

**Mc Ilroy SP**, Vahidassr MD, Savage DA, Patterson CC, Lawson JT, Passmore AP (1999) Risk of Alzheimer's disease is associated with a very low-density lipoprotein receptor genotype in Northern Ireland. *American Journal of Medical Genetics* 88: 140-144

**McKhann G**, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 34: 939-944

**McLaurin J und Chakrabartty A** (1996) Membrane Disruption by Alzheimer  $\beta$ -Amyloid Peptides Mediated through Specific Binding to Either Phospholipids or Gangliosides. *The Journal of Biological Chemistry* 43: 26482-26489

**Meyer MR**, Tschanz JT, Norton MC, Welsh-Bohmer KA, Steffens DC, Wyse BW, Breitner JC (1998) APOE genotype predicts when - not whether - one is predisposed to develop Alzheimer disease. *Nature Genetics* 19: 314-316

**Montine TJ**, Montine KS, Swift LL (1997) Central nervous system lipoproteins in Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology* 151: 1571-1575

**Montoya SE**, Astson CE, DeKosky ST, Kamboh MI, Lazo JS, Ferrell RE (1998) Bleomycin hydrolase is associated with risk of sporadic Alzheimer's disease. *Nature Genetics* 18: 211-212

**Müller U**, Bödeker RH, Gerundt I, Kurz A (1996) Lack of association between alpha 1-antichymotrypsin polymorphism, Alzheimer's disease, and allele epsilon 4 of apolipoprotein E. *Neurology* 47: 1575-1577

**Muramatsu T**, Matsuhita S, Arai H, Sasaki H, Higuchi S (1996)  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin gene polymorphism and risk for Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission* 103: 1205-1210

**Murphy GM**, Sullivan EV, Gallagher-Thompson D, Thompson LW, van Duijn CM, Forno LS, Ellis WG, Jagust WJ, Yesavage J, Tinklenberg JR (1997) No association between the alpha 1-antichymotrypsin A allele and Alzheimer's disease. *Neurology* 19: 1313-1316

**Murrell J**, Farlow M, Ghetti B, Benson MD (1991) A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 4; 254 (5028):97-99

**Nacmias B**, Tedde A, Latorraca S, Piacentini S, Bracco L, Amaducci L, Guarnieri BM, Petruzzi C, Ortenzi L, Sorbi S (1996) Apolipoprotein E and alpha1-antichymotrypsin polymorphism in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 40: 678-680

**Newton CR**, Graham A (1994) PCR. *BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford*

**Nillesen WM**, Smeets HJM, van Oost WA (1990) Human ApoCI HpaI restriction site polymorphism revealed by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* 18 (11): 3428

**Nitsch RM**, Blusztajn JK, Pittas AG, Slack BE, Growdon JH, Wurtman RJ (1992) Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 1671-1675

**Okuizumi K**, Onodera O, Namba Y Ikeda K, Yamamoto T, Seki K, Ueki A, Nanko S, Tanaka H, Takahashi H (1995) Genetic association of the very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene with sporadic Alzheimer's disease. *Nature Genetics* 11: 207-209

**Oliveira JR**, Lima Filho JL, Shimokomaki CM, Okuma M, Passos-Bueno MR, Zatz M, Brito-Marques PR (1997) The use of apolipoprotein E genotype for preclinical detection of risk's group for Alzheimer's disease. *American Journal of Medical Genetics* 74(2): 216-217

**Osuntokun BO**, Sahota A, Ogunniyi AO, Gureje O, Baiyewu O, Adeyinka A, Oluwole SO, Komolafe O, Hall KS, Unverzagt FW (1995) Lack of an association between apolipoprotein E epsilon 4 and Alzheimer's disease in elderly Nigerians. *Annals of Neurology* 38: 463-465

**Ott A**, Breteler MMB, de Bruyne MC, van Harskamp F, Stijnen T, Hofman A (1998) Incidence and risk of dementia. The Rotterdam Study. *American Journal of Epidemiology* 147: 574-580

**Peacock RE**, Hamsten A, Nilsson-Ehle P, Humphries SE (1992) Associations between lipoprotein lipase gene polymorphisms and plasma correlations of lipids, lipoproteins and lipase activities in young myocardial infarction survivors and age-matched healthy individuals from Sweden. *Atherosclerosis* 97: 171-185

**Perez-Tur J**, Froelich S, Prihar G, Crook R, Baker M, Duff K, Wragg M, Busfield F, Lendon C, Clark RF (1995) A mutation in Alzheimer's disease destroying a splice acceptor site in the presenilin-1 gene. *Neuroreport* 29; 7 (1): 297-301

**Pericak-Vance MA**, Bass MP, Yamaoka LH; Gaskell PC; Scott WK; Terwedow HA; Menold MM; Conneally PM; Small GW; Vance JM; Saunders AM; Roses AD; Haines JL (1997) Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer Disease. Evidence for a new locus on chromosome 12. *The Journal of the American Medical Association* 278: 1237-1241

**Poduslo SE**, Neal M, Schwankhaus J (1995) A closely linked gene to apolipoprotein E may serve as an additional risk factor for Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 201: 81-83

**Poduslo SE**, Neal M, Herring K, Shelly J (1998) The apolipoprotein CI A allele as a risk factor for Alzheimer's disease. *Neurochemical Research* 23: 361-367

**Pritchard ML**, Saunders AM, Gaskell PC, Small GW, Conneally PM, Rosi B, Yamaoka LH, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1996) No association between very low density lipoprotein receptor (VLDL-R) and Alzheimer disease in American Caucasians. *Neuroscience Letters* 209: 105-108

**Randall LL**, Hardy SJ (1989) Unity in function in the absence of consensus in sequence: role of leader peptides in export. *Science* 243: 1156-1159

**Rebeck GW**, Harr SD, Strickland DK, Hyman BT (1995) Multiple, diverse senile plaque-associated proteins are ligands of an Apolipoprotein E receptor, the  $\alpha_2$ -macroglobulin receptor/low-density-lipoprotein receptor-related protein. *Annals of Neurology* 36: 211-227

**Retz W**, Thome J, Durany N, Harsányi A, Retz-Junginger P, Kornhuber J, Riederer P, Rösler M (2001) Potential Genetic Markers of Sporadic Alzheimer's dementia. *Psychiatric Genetics* 11(3): 115-122

**Rocca WA**, Cha RH, Waring SC, Kokmen E (1998) Incidence of dementia and Alzheimer's disease: a reanalysis of data from rochester, minnesota, 1975-1984. *American Journal of Epidemiology* 148: 51-62

**Rogaev EI**, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T (1995) Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 31; 376 (6543):775-778

**Rosen WG**, Terry RD, Fuld PA, Katzman R, Peck A (1980) Pathologic verification of ischemic score in differentiation of dementias. *Annals of Neurology* 7: 486-488

**Roth GS**, Joseph JA, Mason RP (1995) Membrane alterations as causes of impaired signal transduction in Alzheimer's disease and aging. *Trends in Neuroscience* 18,5: 203-206

**Rubinsztein DC** (1995) Apolipoprotein E: a review of its roles in lipoprotein metabolism, neuronal growth and repair and as a risk factor for Alzheimer's disease. *Psychological Medicine* 25: 223-229

**Russ C**, Powell J, Lovestone S, Holmes C (1998) K variant of butyrylcholinesterase and late-onset Alzheimer's disease. *Lancet* 351: 881

**Saiki RK**, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354

**Saiki RK**, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-49

**Sambrook J**, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor, NY: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*

**Saunders AM**, Strittmatter WJ, Schmechel D, St. George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, Hulette C, Crain B, Goldgaber D, Roses AD (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43: 1467-1472

**Saunders AM**, Schmechel K, Breitner JCS et al. (1993b) Apolipoprotein E4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases. *Lancet* 342: 710-711

**Schellenberg GD**, Boehnke M, Wijsman EM, Moore DK, Martin GM, Bird TD (1992) Genetic association and linkage analysis of the apolipoprotein CII locus and familial Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 31: 223-227

**Scott WK**, Yamaoka LH, Locke PA, Rosi BL, Gaskell PC, Saunders AM, Conneally PM, Small GW, Farrer LA, Growdon JH, Roses AD, Pericak-Vance MA, Haines JL (1997) No association or linkage between an intronic polymorphism of Presenilin-1 and sporadic or late-onset familial Alzheimer disease. *Genetic Epidemiology* 14: 307-315

**Sherrington R**, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 29; 375 (6534):754-760

**Silverman JM**, Li G, Zaccario ML, Smith CJ, Schmeidler J, Mohs RC, Davis KL (1994) Patterns of risk in first-degree relatives of patients with Alzheimer's disease. *Archives of General Psychiatry* 51: 577-586



**Silverman JM**, Raiford K, Edland S, Fillenbaum G, Morris JC, Clark C, Kukall W, Heyman A (1994b) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD), VI: family history assessment: a multi-center study of first-degree relatives of Alzheimer's disease probands and nondemented spouse controls. *Neurology* 44: 1253-1259

**Singleton AB**, Smith G, Gibson AM, Woodward R, Perry RH, Ince PG, Edwardson JA, Morris CM (1998) No association between the K variant of the butyrylcholinesterase gene and pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics* 7: 937-939

**St. Clair D**, Rennie M, Slorach E, Norrman J, Yates C, Carothers A (1995) Apolipoprotein E epsilon 4 allele is a risk factor for familial and sporadic presenile Alzheimer's disease in both homozygote and heterozygote carriers. *Journal of Medical Genetics* 32: 642-644

**St. George-Hyslop PHS**, Tanzi RE, Polinsky RJ, et al. (1987) The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 235: 885-890

**St. George-Hyslop P**, Haines J, Rogaev E et al. (1992) Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Nature Genetics* 2: 330-334

**Strittmatter WJ**, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993) Apolipoprotein E: High-avidity binding to  $\beta$ -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 1977-1981

**Sou tre E**, Thwaites RMA, Yearley HL (1999) Economic impact of Alzheimer's disease in the United Kingdom. *British Journal of Psychiatry* 174: 51-55

**Talbot C**, Houlden H, Craddock N, Crook R, Hutton M, Lendon C, Prihar G, Morris JC, Hardy J, Goate A (1996) Polymorphism in AACT gene may lower age of onset of Alzheimer's disease. *Neuroreport* 7: 534-536

**Tedde A**, Nacmias B, Cellini E, Bagnoli S, Sorbi S (2002) Lack of association between NOS3 polymorphism and Italian sporadic and familial Alzheimer's disease. *Journal of Neurology* 249: 110-111

**Thome J**, Baumer A, Kornhuber J, Rösler M, Riederer P (1995) Alpha-1-antichymotrypsin bi-allele polymorphism, apolipoprotein-E tri-allele polymorphism and genetic risk of Alzheimer's syndrome. *Journal of Neural Transmission* 10: 207-212

**Thome J**, Gewirtz JC, Sakai N, Zachariou V, Retz-Junginger P, Retz W, Duman RS, Rösler M (1999) Polymorphisms of the human Apolipoprotein E promoter and bleomycin hydrolase gene: risk factors for Alzheimer's dementia? *Neuroscience Letters* 274: 37-40

**Tsuang D**, Kukull W, Sheppard L, Barnhart RL, Peskind E, Edland SD, Schellenberg G, Raskind M, Larson EB (1996) Impact of sample selection on APOE epsilon 4 allele frequency: a comparison of two Alzheimer's disease samples. *Journal of American Geriatrics Society* 44: 704-707

**Twining SS** (1984) Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Analytical Biochemistry* 143: 30

**Tysoe C**, Galinsky D, Robinson D, Brayne CE, Easton DF, Huppert FA, Dening T, Paykel ES, Rubinsztein DC (1997) Analysis of alpha-1 antichymotrypsin, qresenilin-1, angiotensin-converting enzyme, and methylenetetrahydrofolate reductase loci as candidates for dementia. *American Journal of Medical Genetics* 74: 207-212

**Tysoe C**, Galinsky D, Robinson D, Brayne C, Huppert FA, Dening T, Paykel ES, Easton DF, Rubinsztein DC (1998) ApoE and Apo CI loci are associated with dementia

in younger but not older late-onset cases. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 9: 191-198

**Van Broeckhoven C**, Backhovens H, Cruts M, Martin JJ, Crook R, Houlden H, Hardy J (1994) APOE genotype does not modulate age of onset in families with chromosome 14 encoded Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 169: 179-180

**Walker LC**, Parker CA, Lipinski WJ, Callahan MJ, Carroll RT, Gandy SE, Smith JD, Jucker M, Bisgaier CL (1997) Cerebral lipid deposition in aged apolipoprotein-E-deficient mice. *American Journal of Pathology* 151: 1371-1377

**Weisgraber KH**, Mahley RW (1996) Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection. *FASEB Journal* 10: 1485-1494

**Weisgraber KH**, Mahley RW, Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Brown MS (1990) Apolipoprotein C-I modulates the interaction of Apolipoprotein E with  $\beta$ -migrating very low density lipoproteins ( $\beta$ -VLDL) and inhibits binding of  $\beta$ -VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *Journal of Biological Chemistry* 265: 22453-22459

**Winblad B**, Ljunggren G, Karlsson G, Wimo A (1996) What are the costs to society and to individuals regarding diagnostic procedures and care of patients with dementia? *Acta Neurologica Scandinavica Supplementa* 168: 101-104

**Wisniewski T**, Castano EM, Golabek A, Vogel T, Frangione B (1994) Acceleration of Alzheimer's fibril formation by Apolipoprotein E in vitro. *American Journal of Pathology* 145: 1030-1035

**Wragg M**, Hutton M, Talbot C (1996) Genetic association between intronic polymorphism in presenelin-1 gene and late-onset Alzheimer's disease. *Lancet* 347: 509-512

**Yoshiiwa A**, Kamino K, Yamamoto H, Kobayashi T, Imagawa M, Nonomura Y, Yoneda H, Sakai T, Nishiwaki Y, Sato N, Rakugi H, Miki T, Ogihara T (1997) Alpha 1-antichymotrypsin as a risk modifier for late-onset Alzheimer's disease in Japanese apolipoprotein E epsilon 4 carriers. *Annals of Neurology* 42: 115-117

**Yu CE**, Payami H, Olson JM, Boehnke M, Wijsman EM, Orr HT, Kukull WA, Goddard KA, Nemens E, White JA (1994) The apolipoprotein E/CI/CII gene cluster and late-onset Alzheimer disease. *American Journal of Human Genetics* 54: 631-642

**Xia Y**, Rohan de Silva HA, Rosi BL, Yamaoka LH, Rimmler JB, Pericak-Vance MA, Roses AD, Chen X, Masliah E, De Teresa R, Iwai A, Sundsmo M, Thomas RG, Hofstetter CR, Gregory E, Hansen LA, Katzman R, Thal LJ, Saitoh T (1996) Genetic studies in Alzheimer's disease with an NACP/alpha-synuclein polymorphism. *Annals of Neurology* 40: 207-215

**Zaudig M**, Mittelhammer J, Hiller W, Pauls A, Thora C, Morinigo A, Mombour W (1991) SIDAM – A structured interview for the diagnosis of dementia of the Alzheimer type, multi-infarct-dementia and dementias of other aetiology according to ICD-10 and DSM-III-R. *Psychological Medicine* 21: 225-236

**Zubenko GS**, Hughes HB, Stiffler JS, Hurtt MR, Kaplan BB (1998) A genome survey for novel Alzheimer disease risk loci: results at 10-cM resolution. *Genomics* 50: 121-128

Ich danke

Herrn Prof. Dr. Peter Riederer für die freundliche Überlassung des Themas und seine Unterstützung bei der Erstellung der Dissertation.

Herrn PD Dr. Dr. Johannes Thome, der mir beim Erlernen der notwendigen praktischen Fähigkeiten wertvolle Hilfestellung gab und durch seine konstruktive Beratung zum Gelingen der Arbeit beitrug.

Frau Dr. Angelika Schmidt für die Hilfe bei methodischen Fragen.

Herrn PD Dr. Norbert Wodarz für den „psychiatrischen Beistand“, seine Hilfestellung bei klinischen und statistischen Fragen.

Allen Mitarbeitern des neurochemischen und klinischen Labors der Universitäts-Nervenlinik für das gute Arbeitsklima und die stets freundliche Unterstützung bei der Ausführung der Versuche.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Harsányi  
Vorname: Alexander  
Geburtsdatum/-ort: 29. Oktober 1971/Freising  
Familienstand: ledig

## Schulbildung:

Sept. 1978 - Juli 1982 Grundschole Altdorf bei Landshut  
Sept. 1982 - Juli 1991 Hans-Carossa-Gymnasium Landshut  
Juli 1991 Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

## Wehrdienst:

Juli 1991 - Juni 1992 Grundwehrdienst im Sanitätsdienst der Bundeswehr

## Studium:

Nov. 1992 - Sept. 1994 Medizinstudium an der Universität Regensburg  
Nov. 1994 - Mai 1999 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Mai 1999 Staatsexamen

## Berufsleben:

Juli 1999 – Oktober 1999 Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie des Klinikums der Universität Regensburg  
Prof. Dr. A. Brawanski

November 1999 – November 2000	Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie des Klinikums Rosenheim Dr. F. Hoffmann
Dezember 2000	Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Klinik für Allgemein- Viszeral- und Unfallchirurgie des Juliusspitals Würzburg Prof. Dr. B. Gay/Prof. Dr. E. Schippers
Seit Januar 2001	Assistenzarzt der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Unfallchirurgie des Juliusspitals Würzburg Prof. Dr. B. Gay/Prof. Dr. E. Schippers

*Alexander Hausányi*