

**Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen**

**Rheinische Kliniken Essen  
Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie**

**Das lysosomale Enzym Cathepsin D als  
genetischer Risikofaktor für Morbus Alzheimer**

**I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades der Medizin**

**durch die Medizinische Fakultät**

**der Universität Duisburg-Essen**

**Vorgelegt von**

**Özgür Albayrak**

**aus Springe**

**2007**

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. K.-H. Jöckel  
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. M. Jüptner  
2. Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. med. D. Wieczorek

Tag der mündlichen Prüfung: 14. März 2008

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>Epidemiologie des Morbus Alzheimer.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2</b>	<b>Pathogenese des Morbus Alzheimer .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Amyloid Precursor Protein (APP), <math>\beta</math>-Amyloid und Alzheimersche Plaques .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.1.1</b>	<b>Amyloidogene und nicht-amyloidogene APP-Prozessierung.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Lokalisation der APP-Prozessierung.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.2.1</b>	<b>Die APP-Prozessierung im endosomal-lysosomalen System.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.2.2</b>	<b>Cathepsin D und seine Bedeutung in der Ätiologie des Morbus Alzheimer .....</b>	<b>16</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Das Protein tau und neurofibrilläre Tangles .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3</b>	<b>Diagnose.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3.1</b>	<b>Neuropathologische Diagnose.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Humangenetische Diagnose .....</b>	<b>21</b>
<b>1.4</b>	<b>Genetik des Morbus Alzheimer .....</b>	<b>22</b>
<b>1.4.1</b>	<b>Familiäre Form des Morbus Alzheimer: autosomal dominanter Erbgang .....</b>	<b>23</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Sporadische Form des Morbus Alzheimer: komplexes Vererbungsmuster .....</b>	<b>23</b>
<b>1.4.3</b>	<b>Vorgehen zur Identifizierung von neuen Suszeptibilitätsgenen .....</b>	<b>24</b>
<b>1.4.4</b>	<b>Der Cathepsin D 224C<math>\rightarrow</math>T Polymorphismus als Risikofaktor für Morbus Alzheimer .....</b>	<b>27</b>
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1</b>	<b>Vorgehen bei klinisch diagnostizierten Fällen .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Probenauswahl .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....</b>	<b>31</b>
<b>2.1.2.1</b>	<b>Versuchsmaterialien .....</b>	<b>32</b>
<b>2.1.2.2</b>	<b>Anwendung der PCR zur Genotypisierung einer C<math>\rightarrow</math>T-Transition im Exon 2 des Cathepsin D-Gens bei klinisch diagnostizierten Fällen .....</b>	<b>32</b>
<b>2.1.2.3</b>	<b>Anwendung der PCR zur Genotypisierung einer C<math>\rightarrow</math>T-Transition im Exon 2 des Cathepsin D-Gens bei neuropathologisch gesicherten Fällen .....</b>	<b>34</b>
<b>2.1.2.4</b>	<b>Kontaminationskontrolle .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) .....</b>	<b>36</b>

---

2.1.3.1	Versuchsmaterialien .....	36
2.1.3.2	Versuchsprotokoll .....	36
2.1.3.3	Anwendung des RFLP zur Genotypisierung einer C → T Transition an Position 224 im Exon 2 des Cathepsin D-Gens bei klinisch diagnostizierten Fällen .....	37
2.1.3.4	Anwendung des RFLP zur Genotypisierung einer C → T Transition an Position 224 im Exon 2 des Cathepsin D-Gens bei neuropathologisch gesicherten Fällen.....	37
2.1.4	Gelelektrophorese .....	40
2.1.4.1	Versuchsmaterialien .....	40
2.1.4.2	Durchführung.....	41
2.2	Vorgehen bei neuropathologisch diagnostizierten Fällen.....	42
2.2.1	DNS-Extraktion aus neuropathologischem Archivmaterial.....	43
2.2.1.1	Versuchsmaterialien .....	43
2.2.1.2	Versuchsprotokoll .....	44
2.2.2	Quantifizierung von Plaques, Tangles und Mikroglia.....	45
2.2.3	Immunhistochemie.....	45
2.2.3.1	Versuchsmaterialien .....	46
2.2.3.2	Versuchsprotokoll .....	48
2.3	Statistik.....	50
3	ERGEBNISSE.....	51
3.1	Klinisch diagnostizierte Fälle.....	51
3.1.1	Verteilung des Cathepsin D-Genotyps .....	52
3.1.1.1	Cathepsin D-Genotyp in allen Altersstufen.....	52
3.1.1.2	Cathepsin D-Genotyp in der Altersstufe bis 60 Jahre .....	53
3.1.1.3	Cathepsin D-Genotyp in der Altersstufe 61-70 Jahre.....	54
3.1.1.4	Cathepsin D-Genotyp in der Altersstufe 71-80 Jahre.....	55
3.1.1.5	Cathepsin D-Genotyp in der Altersstufe über 81 Jahre .....	56
3.1.2	Verteilung der Cathepsin D-Allelfrequenzen.....	57
3.1.2.1	Cathepsin D-Allelfrequenzen in allen Altersstufen.....	57
3.1.2.2	Cathepsin D-Allelfrequenzen in der Altersstufe bis 60 Jahre .....	58
3.1.2.3	Cathepsin D-Allelfrequenzen in der Altersstufe 61 – 70 Jahre .....	59



---

3.1.2.4	Cathepsin D-Allelfrequenzen in der Altersstufe 71-80 Jahre .....	60
3.1.2.5	Cathepsin D-Allelfrequenzen in der Altersstufe über 81 Jahre .....	61
3.1.3	Der APOE-Genotyp und Cathepsin D .....	62
3.1.3.1	Verteilung des APOE-Genotyps .....	63
3.1.3.2	Verteilung der APOE-Allelfrequenzen .....	65
3.1.3.3	Cathepsin D-Genotyp in Abhängigkeit des APOE 4-Allels .....	67
3.1.4	Ermittlung des Erkrankungsrisikos für Morbus Alzheimer .....	69
3.1.5	Der Einfluss von Alter, Geschlecht und APOE 4-Allel und ihre Wechselwirkungen mit dem Cathepsin D T-Allel auf das Erkrankungsrisiko ...	71
3.1.5.1	Geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich des Erkrankungsrisikos .....	72
3.2	Neuropathologisch diagnostizierte Fälle .....	74
3.2.1	Effekt des Cathepsin D-Genotyps auf neuropathologische Veränderungen bei Morbus Alzheimer .....	74
3.2.2	Immunhistochemische Doppelfärbung von $\beta$ -Amyloid und Cathepsin D .....	77
4	DISKUSSION.....	81
4.1	Besteht eine Assoziation zwischen dem Cathepsin D224C→T Polymorphismus und Morbus Alzheimer? .....	81
4.2	Faktoren, die das Erkrankungsrisiko des Cathepsin D T-Allels für Morbus Alzheimer beeinflussen .....	87
4.2.1	Das Alter .....	87
4.2.2	Das Geschlecht .....	89
4.2.3	Das APOE 4-Allel.....	91
4.3	Grenzen und Fehlerquellen genetischer Assoziationsstudien.....	92
4.3.1	Genetischer Hintergrund der Studienpopulation .....	93
4.3.2	Kopplungsungleichgewicht .....	94
4.3.3	Die funktionelle Bedeutung eines Kandidatengens.....	95
4.4	Beeinflusst der Cathepsin D 224C→T Polymorphismus die neuropathologischen Veränderungen bei Morbus Alzheimer?.....	96
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	98
6	LITERATUR.....	99

---

<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>109</b>
<b>7.1</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>109</b>
<b>7.2</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>110</b>
<b>7.3</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>111</b>

## 1 EINLEITUNG

100 Jahre ist es her, seitdem der Breslauer Nervenarzt Alois Alzheimer im Jahre 1907 erstmals „über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ berichtete. Die nach ihm benannte Alzheimersche Krankheit zählt zu den degenerativen Hirnerkrankungen und ist als die häufigste Form der Demenz anzusehen. Die von Alzheimer beschriebenen histopathologischen Elemente, Alzheimersche Plaques und Neurofibrillenveränderungen in Hippokampus und Isokortex sind seither Gegenstand intensiver Forschung. War die Erkrankung bis in die 80er Jahre des letzten Jahrhunderts hinein noch weitgehend unverstanden, so nimmt seit zwei Dekaden das Wissen um pathogenetische Kaskaden, die den neuropathologischen Veränderungen bei Morbus Alzheimer zugrunde liegen, mit dem Fortschritt der Molekulargenetik erheblich zu. Insbesondere die Entdeckung von drei autosomal-dominanten Gendefekten (Amyloid-Precursor-Protein (APP), Präsenilin 1, Präsenilin 2) sowie einem genetischen Risikofaktor (Apolipoprotein E) hat zu einer entscheidenden Verbesserung um das Verständnis der Erkrankung beigetragen.

Inzwischen ist klar, dass es sich bei Morbus Alzheimer um ein multifaktorielles Syndrom, dem genetisch komplexe und heterogene Erkrankungen zugrunde liegen, und nicht um eine einheitliche Krankheit handelt. Sie wird zu einem geringen Anteil von 5% autosomal dominant vererbt. Für die restlichen 95% wird ein komplexes Vererbungsmuster angenommen, wobei genetische Risikofaktoren im Zusammenspiel mit Umwelteinflüssen zum Ausbruch der Krankheit führen können, jedoch nicht zwingend für ihr Zustandekommen sind. Neben Apolipoprotein E (APOE) wurden in den vergangenen Jahren weitere Suszeptibilitätsfaktoren entdeckt, zu deren Etablierung es jeweils zahlreicher genetischer Assoziationsstudien bedarf, um sicher zu stellen, dass der Zusammenhang zwischen einem Gen und der Krankheit nicht aufgrund von Zufall, kleinen Fallzahlen oder uneinheitlich definierten Beobachtungsgruppen beschrieben wird, sondern unabhängig auftritt.

Hinsichtlich der pathophysiologischen Entstehungsmechanismen der Erkrankung spielen die Alzheimerschen Plaques und deren Hauptbestandteil  $\beta$ -Amyloid ( $\beta$ A4) eine zentrale Rolle. Ein gesicherter Bestandteil der Plaques ist die lysosomale Protease Cathepsin D (CatD). Ihre Mitbeteiligung an der Pathogenese des Morbus Alzheimer wurde in pathobiochemischen Studien belegt. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob eine Beziehung zwischen einem Polymorphismus im Gen des CatD und dem Vorkommen von Morbus Alzheimer besteht.

## 1.1 Epidemiologie des Morbus Alzheimer

Die Alzheimersche Krankheit ist eine Erkrankung des alten Menschen. Dies spiegelt sich in der exponentiell ansteigenden Prävalenz innerhalb der Altersgruppen der 60-69-jährigen (0,3%), der 70-79-jährigen (3,2%) und der 80-89-jährigen (10,3%) wider, die für Europa erhoben wurden (Rocca et al., 1991). Damit ist sie die vierthäufigste chronische Erkrankung im Alter, nach der koronaren Herzkrankheit, dem Schlaganfall und dem Diabetes Mellitus.

Welches Ausmaß die Erkrankung in der nahen Zukunft annehmen wird, verdeutlichen Prognosen (Hebert et al., 2003), wonach im Jahre 2050 voraussichtlich etwa 13,2 Millionen Menschen allein in den USA an Morbus Alzheimer leiden werden.

Zu den derzeit weltweit sicher anerkannten Risikofaktoren der Alzheimerschen Krankheit gilt fortgeschrittenes Alter (Jorm und Jolley, 1998), das Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4-Allel (APOE4) (Evans et al., 1997), sowie eine familiäre Häufung von Morbus Alzheimer (Stewart, 2000). Verschiedene Studien rücken ferner die Zugehörigkeit zum weiblichen Geschlecht (Andersen et al., 1999), ein geringes Bildungsniveau (Ott et al., 1999) und Schädel-Hirn-Trauma (Mortimer et al., 1993; Uryu et al., 2002) in den Blickpunkt.

## 1.2 Pathogenese des Morbus Alzheimer

Die typischen mikroskopisch erfassbaren Veränderungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten sind die  $\beta$ -amyloidhaltigen ( $\beta$ A4) senilen Plaques und die neurofibrillären Tangles (NFT). Der Amyloid-Kaskaden Hypothese nach wird angenommen, dass die Amyloidbildung als ein initiales Ereignis eine Reihe von pathophysiologischen Mechanismen in Gang setzt, die in ihrer Gesamtheit zu einem Nervenzelluntergang führen, was sich makroskopisch als Hirnatrophie bemerkbar macht (Review in (Hardy und Selkoe, 2002)). Zu den pathophysiologischen Reaktionen, die durch die Amyloidbildung hervorgerufen werden, zählt man Entzündung, die Bildung von NFT, Oxidativer Stress, Apoptose sowie die Aktivierung des endosomal-lysosomalen Systems. Bestimmte Areale des Gehirns sind einem typischen Befallmuster folgend davon betroffen. Der physiologischen Funktion dieser Hirnregionen entsprechend kommt es infolgedessen zu den charakteristischen kognitiven Defiziten. Derzeit ist noch unklar, welche Faktoren zu diesem initialen Ereignis führen (Hardy und Selkoe, 2002).

$\beta$ A4 wird aus dem Amyloid-Vorläufer-Protein (engl. *Amyloid precursor protein*, APP) durch proteolytische Spaltung freigesetzt. Die Entstehung von  $\beta$ A4 infolge amyloidogener Prozessierung von APP gilt als das zentrale pathophysiologische Geschehen bei Morbus Alzheimer. Das endosomal-lysosomale System wird als zentraler Schauplatz der amyloidogenen Prozessierung angesehen (Nixon et al., 2001; Bahr und Bendiske, 2002). Cathepsin D ist als Hauptbestandteil der lysosomalen Proteasen beim Menschen Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen. Es wird deshalb im Folgenden näher auf die einzelnen genannten Faktoren, insbesondere auf das endosomal-lysosomale System und auf die Entstehungsmechanismen von  $\beta$ A4 und NFT eingegangen.

### 1.2.1 Amyloid Precursor Protein (APP), $\beta$ -Amyloid und Alzheimersche Plaques

1907 veröffentlichte Alois Alzheimer (Alzheimer, 1907) erstmals eine Arbeit, in der er bei einer 55-jährigen Patientin mit klinisch diagnostizierter Demenz eine Autopsie vornahm und die histopathologischen Merkmale, zahlreiche senile Plaques und ausgeprägte Neurofibrillenveränderungen in Hippokampus und Isokortex, beschrieb. Bis heute gelten diese morphologischen Charakteristika neben der makroskopisch sichtbaren Hirnatrophie

als wegweisend für die neuropathologische Diagnose des Morbus Alzheimer (Khachaturian, 1985).

Hauptbestandteil der senilen Plaques ist das  $\beta$ -Amyloid ( $\beta$ A4). Das  $\beta$ A4 aggregiert zu Fibrillen, die in verdichteter Form als Amyloid-Plaques auftreten. Die Ablagerung im Hirnparenchym erfolgt je nach Aggregationsform des  $\beta$ A4 als diffuse (amorphe) oder neuritische Plaques. Diffuse Plaques stellen die frühesten erkennbaren Veränderungen des  $\beta$ A4 dar. Neuritische Plaques sind dagegen Plaques in "fortgeschrittenen" Stadien, die typischerweise Anteile untergegangener Neurone und Astrozyten sowie Mikrogliazellen beinhalten. Zudem finden sich in den Plaques zahlreiche biochemische Bestandteile, u.a. Apolipoprotein E, alpha1-Antichymotrypsin, Interleukin 6 und Cathepsin D (Dickson, 1997; Bernstein et al., 1989).

$\beta$ A4 wird aus dem Amyloid-Precursor-Protein (APP) durch proteolytische Spaltung freigesetzt. Es ist Mitglied einer evolutionär konservierten Proteinfamilie, zu der auch die Homologen Amyloid Precursor like Proteine 1 und 2 (APLP1 und APLP2) gehören. APP taucht als transmembranöses Zelloberflächenprotein ubiquitär auf (Cao und Sudhof, 2001).

Die physiologische Funktion des transmembranösen Zelloberflächenproteins APP ist bis heute noch unzureichend aufgeklärt. Hinweise für eine essentielle Bedeutung von APP und seiner Homologen für die Entwicklung des Organismus kamen anhand von Experimenten mit „knock-out“ Mäusen. Es konnte gezeigt werden, dass Tiere, bei denen APP und APLP 2 oder APLP1 und APLP2 nicht exprimiert wurde, bereits früh nach der Geburt sterben, wohingegen das Ausschalten nur eines der Gene allenfalls geringe neurologische Auffälligkeiten verursacht (von Koch et al., 1997; Dawson et al., 1999).

Desweiteren scheint APP auch eine Bedeutung für neuronale Migrationsprozesse zu haben, denn es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, bei denen alle APP Familienmitglieder ausgeschaltet wurden, kortikale Fehlbildungen, wie z.B. Lissenzephalie und Migrationsdefizite aufwiesen (Herms et al., 2004).

### 1.2.1.1 Amyloidogene und nicht-amyloidogene APP-Prozessierung

Es wird angenommen, dass APP auf zwei alternativen Wegen prozessiert wird, wobei entweder  $\beta$ A4 entsteht (amyloidogener Weg) oder  $\beta$ A4 nicht entsteht (nicht-amyloidogener Weg). Die Produkte unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Funktion in Neurotoxizität und Neuroprotektion. An der Prozessierung des APP sind nach bisherigem Erkenntnisstand insgesamt drei Proteasen beteiligt, die als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase bezeichnet werden (s.Abb.1).

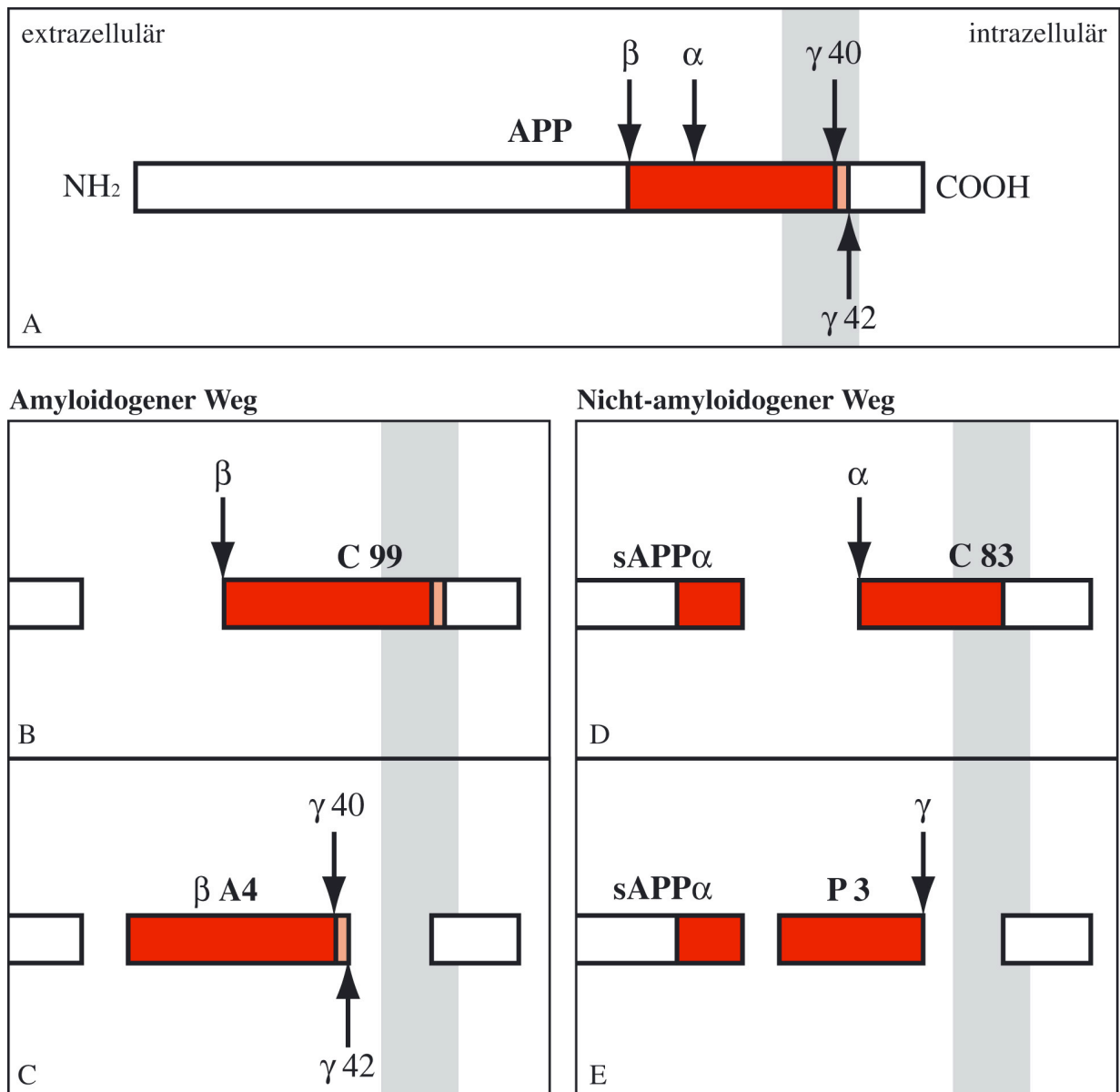
Der amyloidogene Weg setzt sich sukzessive aus zwei Schritten zusammen (Abb.1B und C). Zunächst unterliegt APP der Spaltung durch das Enzym  $\beta$ -Sekretase, einer Aspartyl-Protease, die als „Beta site cleaving enzyme (BACE)“ bezeichnet wird. Sie gehört zur Familie der Pepsine. BACE schneidet APP extrazellulär, und es bleibt ein kurzes 99 Aminosäuren enthaltendes Carboxyl-terminales Stück (C99) in der Membran zurück (Marlow et al., 2003). Dieser Teil enthält die  $\beta$ A4-Domäne und wird in einem darauffolgenden Schritt von dem  $\gamma$ -Sekretase Komplex weiter prozessiert.

Die  $\gamma$ -Sekretase setzt sich aus einem Quartett an Eiweißen zusammen und wird der Familie der Aspartyl-Proteasen zugerechnet. Das katalytische Zentrum ist PSEN1/PSEN2. Als Kofaktoren wurden Nicastrin (Nct), Anterior pharynx defective phenotype (APH1-a/APH1-b) und Presenilin enhancer (PEN2) identifiziert. Die genaue Bedeutung der einzelnen Komponenten ist derzeit noch nicht vollständig geklärt (De Strooper, 2003; Esler und Wolfe, 2001; Aguzzi und Haass, 2003). C99 ist Substrat der  $\gamma$ -Sekretase und wird an zwei verschiedenen Stellen, die zwei Aminosäurenlängen voneinander entfernt liegen, alternativ geschnitten. Daraus resultieren zwei Formen von  $\beta$ A4: Das 40 Aminosäuren lange  $\beta$ A40 und das 42 Aminosäuren lange  $\beta$ A42. Das längere  $\beta$ A42 ist hydrophober, aggregiert leichter zu Fibrillen und weist neurotoxische Eigenschaften auf. Es ist die Hauptform des  $\beta$ A4, das in senilen Plaques vorgefunden wird und diffundiert in die extrazelluläre Matrix und kann dort als lösliches fibrilläres Monomer allmählich zu einem unlöslichen Oligomer aggregieren: dem Amyloid. Durch vermehrte Amyloidablagerungen entstehen dann die charakteristischen Alzheimerschen Plaques (Hardy und Selkoe, 2002).

Demgegenüber steht der nicht-amyloidogene Weg (Abb. 1D und E). Dabei wird APP durch die  $\alpha$ -Sekretase gespalten. Die  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität wird durch drei Proteine (TACE (ADAM-17), ADAM-10 und ADAM-9) bewirkt, die alle eine „A-disintegrin und Metalloproteinase-Domäne“ (ADAM) enthalten und damit zu den Zelloberflächenproteinen

gehören, die in Prozesse zellulärer Adhäsion und Proteolyse involviert sein können (Kojro und Fahrenholz, 2005). Schneidet es das APP an der  $\alpha$ -Schnittstelle, die innerhalb der  $\beta$ A4-Domäne liegt, im N-terminalen Fragment, wird ein 90 kDa großes lösliches in der Regel extrazelluläres Fragment (sAPP $\alpha$ ) frei, dem eine neuroprotektive Funktion zugesprochen wird (Turner et al., 2003). Zurück bleibt ein 83 Aminosäuren enthaltendes Carboxyl-terminales Stück (C83) in der Membran. C83 kann weiter durch die  $\gamma$ -Sekretase zu P3 gespalten werden (Selkoe, 2001).





**Abb.1: Die Prozessierung von APP.** Dargestellt sind die beiden möglichen Wege, durch die APP durch die α-, β- und γ-Sekretase prozessiert werden kann: der *Amyloidogene Weg* (B,C) und der *Nicht-amyloidogene Weg* (D,E). Beide Prozesse laufen nebeneinander her ab. Bei Alzheimer Patienten kommt es durch ein Ungleichgewicht der Sekretasenaktivität zur vermehrten Bildung von Amyloid (βA4). Einzelheiten im Text (Kap. 1.2.1.1).

## 1.2.2 Lokalisation der APP-Prozessierung

Das Amyloid Precursor Protein wird auf verschiedene Weisen prozessiert (s.1.2.1.1.). Auf seinem „Lebensweg“ durchläuft APP verschiedene Stationen, an denen es prozessiert werden kann: nach seiner Synthese im Endoplasmatischen Retikulum (ER) gelangt es in den Golgi-Apparat, wo es für den Weg an die Zellmembran markiert und in Vesikel gepackt wird. Diese Transportvesikel gelangen entweder direkt zur Zellmembran oder werden in Neuronen über den schnellen axonalen Transport zu den präsynaptischen Nervenendigungen transportiert. Als Transmembranprotein kann APP über Endozytose reinternalisiert und innerhalb des endosomal-lysosomalen Systems degradiert werden (Golde et al., 1992).

Selkoe (2001) beschrieb, dass APP während des sekretorischen Signalwegs, vorwiegend im ER und Golgi-Apparat, prozessiert werden kann. Neuere Untersuchungen zeigen, dass APP auch während des axonalen Transports einer Prozessierung unterliegen kann (Kamal et al., 2000; Muller und Kins, 2002). Die zentrale Lokalisierung der APP-Prozessierung zu  $\beta$ A4 wird jedoch im endosomal-lysosomalen System angegeben (Nixon et al., 2001; Bahr und Bendiske, 2002).

Für die vorliegende Arbeit ist das endosomal-lysosomale System mit Cathepsin D als dem Hauptbestandteil der lysosomalen Proteasen in der Pathogenese des Morbus Alzheimer von zentraler Bedeutung und soll im Folgenden genauer dargestellt werden.

### 1.2.2.1 Die APP-Prozessierung im endosomal-lysosomalen System

Der neuronale endozytotische Pfad ist ein präzise kontrolliertes und effizientes intrazelluläres „Handels- und Transportsystem“, in dem extrazelluläre trophische und nutritive Faktoren für die Zelle internalisiert und prozessiert werden, integrale Membranproteine und Rezeptoren nach Neurotransmitter Freisetzung recycled oder katabolisiert werden und Informationen für intrazelluläre biosynthetische Vorgänge weitergeleitet werden. Endozytose befähigt Zellen dazu, Moleküle innerhalb von vakuolären Kompartimenten zu verändern oder zu degradieren, die sich auf einem weiten Kontinuum hinsichtlich ihrer unterschiedlichen morphologischen und biochemischen Eigenschaften befinden. Zu diesen Kompartimenten gehören frühe und späte Endosomen und Lysosomen, die unterschiedliche Möglichkeiten besitzen, geeignete Substrate mittels Proteolyse zu prozessieren (Berg

et al., 1995). Eine Vielzahl von sauren Hydrolasen wird im Golgi-Apparat verpackt und durch Transportvesikel zu den Endosomen und Lysosomen befördert. Lange Zeit galt die Meinung, dass der Abbau endozytotischen Materials auf Lysosomen begrenzt sei. Heute weiß man, dass in bestimmten nicht-neuronalen Zellen saure Proteasen auch in Endosomen vorkommen können, die endozytisierte Proteine modifizieren (Berg et al., 1995).

Das wissenschaftliche Interesse am endosomal-lysosomalen System ist durch Befunde, die seine Bedeutung in der Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit belegen, gewachsen. Bereits in den 60er Jahren wurde beschrieben, dass Lysosomen (oder den Lysosomen ähnelnde Strukturen) an der Zusammensetzung seniler Plaques beteiligt sind (Suzuki und Terry, 1967; Review in Bahr und Bendiske, 2002). Veränderungen des lysosomalen Systems treten bereits in frühen Stadien der Alzheimerschen Krankheit auf. Lange bevor die mikroskopisch charakteristischen neuropathologischen Merkmale der Krankheit nachweisbar sind, lässt sich bereits eine charakteristische intrazelluläre Umverteilung der Lysosomen in Neuronen von Alzheimer-Patienten nachweisen (Nixon et al., 2001).

Die Proteine APP,  $\beta$ A4 und APOE, die von zentraler Bedeutung für die Pathogenese dieser Erkrankung sind, werden im endosomal-lysosomalen System internalisiert und prozessiert (Cole et al., 1992). Daher repräsentiert dieses System eine gemeinsame zelluläre Kaskade, innerhalb dessen diese ätiologischen Faktoren zusammen treffen. Pathobiochemische, molekulargenetische und immunhistologische Untersuchungen an Hirngewebe von Betroffenen der Alzheimerschen Krankheit belegen eine deutliche Hochregulation der lysosomalen Aktivität in einem frühen Stadium der neuronalen metabolischen Aktivität innerhalb betroffener Hirnregionen, sowie eine deutlich erhöhte Biosynthese von sauren Hydrolasen und eine zwei bis siebenfach erhöhte Anzahl an Lysosomen (Cataldo et al., 1995). Die vermehrte Anreicherung von sauren Hydrolasen, wie Cathepsin D, innerhalb später Endosomen und Lysosomen in Abhängigkeit von  $\beta$ A4 in vivo (Cataldo et al., 1995; Evin et al., 1995; Hoffman et al. 1998), die Freisetzung dieser Enzyme nach neuronaler Lyse (Cataldo et al., 1995) und ihr beharrliches Vorkommen in extrazellulären  $\beta$ A4 Ablagerungen (Bernstein et al., 1989; Cataldo et al. 1995) wurden nur bei Störungen beobachtet, bei denen es zur Akkumulation von  $\beta$ A4 kommt, was auf einen Zusammenhang zwischen dem endosomal-lysosomalen System, bzw. seiner Bestandteile und der amyloidogenen APP-Prozessierung schließen lässt (Cataldo et al., 1997).

### 1.2.2.2 Cathepsin D und seine Bedeutung in der Ätiologie des Morbus Alzheimer

Da in der vorliegenden Arbeit ein Polymorphismus im Cathepsin D-Gen auf seine Relevanz für die Alzheimersche Krankheit untersucht worden ist, soll dieses wichtige Enzym des endosomal-lysosomalen Systems nachfolgend genauer dargestellt werden.

Cathepsin D (CatD) ist ein elementarer Bestandteil der proteolytischen Enzyme in eukaryotischen Zellen und im menschlichen Körper in verschiedenen Organen und Zellarten weit verbreitet (Reid et al., 1986).

CatD ist der Struktur seines katalytischen Zentrums nach eine aspartische Endopeptidase und gehört zur Familie der Pepsine. Sein pH-Optimum liegt im sauren Bereich. Es spaltet Proteine bevorzugt an Stellen mit einem hohem Anteil an hydrophoben Aminosäuren (Barrett, 1992).

Das reife CatD generiert sich aus seinem Vorläuferprotein, dem proCathepsin D (proCatD) ( $M_r$ : 46 kD). Es kommt in zwei verschiedenen Formen vor: Als einkettiges ( $M_r$ : 44 kD) und als zweikettiges Protein mit einer schweren ( $M_r$ : 30 kD) und einer leichten Kette ( $M_r$ : 15 kD). Es lässt sich nachweisen, dass beide Formen nebeneinander in einer Zelle exprimiert werden. Unklar ist, welche Auswirkung das gleichzeitige Vorkommen der zwei Isoformen von CatD hat. Hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität unterscheiden sie sich nicht (Conner et al., 1987).

Die Sequenz der cDNA von CatD und der Primärstruktur seines Genprodukts ist seit 1985 bekannt. Menschliches CatD besteht aus 412 Aminosäuren (Faust et al., 1985). Die molekulare Organisation des CatD-Gens wurde 1991 aufgedeckt (Redecker et al., 1991).

Die Verteilung der Lysosomen (und damit auch von CatD) im Gehirn ist je nach Region und Zelltyp unterschiedlich. Auch die Zusammensetzung der Lysosomen an Enzymen unterscheidet sich je nach Zelltyp. Eine stärkere Anhäufung von CatD findet sich in Neuronen des Hypothalamus sowie in Motoneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks. Sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen kommt CatD besonders zahlreich in den Pyramidalzellen des Hippokampus und des Neokortex vor und damit also in Zellen, die bei Alzheimer-Patienten in besonderer Weise betroffen sind und deshalb als vulnerabel für Alzheimer spezifische pathophysiologische Veränderungen gelten. Innerhalb der Neurone ist CatD der Lokalisation der Lysosomen entsprechend ausschließlich im Zytoplasma der Perikarien lokalisiert und des Weiteren weniger zahlreich in den Axonen und Dendriten (Bernstein et al., 1985; Whitaker et al, 1981).

Inzwischen ist die Identität der Sekretasen, die die APP-Prozessierung bewerkstelligen, aufgeklärt (Esler und Wolfe, 2001; Aguzzi und Haass, 2003) (s. 1.2.1.1.). Jedoch galt lange Zeit davor die lysosomale Protease Cathepsin D als „Kandidat“ für die Sekretaseaktivität bei der amyloidogenen APP-Prozessierung. Verschiedene biochemische Studien wiesen darauf hin, dass Cathepsin D in vitro APP innerhalb seiner  $\beta$ A4 Domäne an unterschiedlichen Stellen spalten kann (Kohnken et al., 1995; Ladrör et al., 1994; Evin et al., 1995; Chevallier et al. 1997). Heute weiß man, dass sich die  $\beta$ -Sekretase BACE, die wie CatD ebenfalls eine Aspartyl-Protease ist, in charakteristischer Weise hinsichtlich ihrer Substratspezifität von CatD unterscheidet (Gruninger-Leitch et al., 2002).

Auch wenn CatD nicht unmittelbar und ursächlich an der amyloidogenen Prozessierung als Sekretase beteiligt ist, so deuten folgende Befunde auf eine Mitbeteiligung von CatD an diesem Vorgang hin. 1989 wurde CatD erstmals immunhistochemisch in neuritischen Plaques in Gehirnen von Alzheimer-Patienten nachgewiesen. Dieses CatD ist intakt und enzymatisch aktiv (Bernstein et al., 1989; Cataldo et al., 1990; Nakamura et al., 1991). Je mehr  $\beta$ A4 in den Plaques enthalten ist, desto höher ist der Gehalt dieser Plaques an CatD. Das gilt insbesondere für neuritische Plaques. In den „amyloid-ärmeren“ diffusen Plaques, erscheint CatD in geringerer Konzentration (Cataldo et al., 1997, Hoffmann et al., 1998). Auch ist die mRNA-Expression von CatD in Neuronen von Alzheimer-Patienten erhöht (Cataldo et al., 1995). Die CatD Ablagerungen in den Plaques entstammen hauptsächlich aus degenerierten Neuronen und zu einem geringeren Umfang auch aus Mikrogliazellen, Makrophagen und reaktiven Astrozyten (Cataldo et al., 1990).

### 1.2.3 Das Protein tau und neurofibrilläre Tangles

Das zweite charakteristische histopathologische Merkmal ist die Ansammlung von Neurofibrillenbündeln oder "neurofibrillären Tangles" (NFT) in Nervenzellkörpern und Neuriten. Das Substrat der NFT sind „paired helical filaments“, die aufgrund einer abnormalen Phosphorylierung des Proteins tau entstehen. Die normale Funktion von tau könnte die Stabilisierung der am axonalen Transport beteiligten Mikrotubuli sein. Der Amyloid-Kaskaden-Theorie (s. 1.2) zufolge, komme es infolge oxidativen Stresses durch eine veränderte intraneuronale Ionenhomöostase zu einer ungünstigen Aktivitätsveränderung des Zusammenspiels der Phosphatasen/Kinasen (Hardy und Selkoe 2002).

Von Braak und Braak (1991) konnte gezeigt werden, dass die Neurofibrillenpathologie im Gegensatz zur relativ unsystematischen Verteilung der Amyloid-Plaques einem stereotypen Muster mit einer konstanten hierarchischen Ausbreitung folgt. Nach dem Muster der befallenen Areale gibt eine Stadieneinteilung den Schweregrad der Neurofibrillenpathologie an, wobei die jeweiligen Stadien gut mit dem Ausmaß der Demenz korrelieren (Baner et al., 1993). Die ersten Nervenzellen mit NFT treten zunächst im transentorhinalen Kortex (Stadium I-II), später im gesamten entorhinalen Kortex, dem Ammonshorn und anderen limbischen Strukturen (Stadium III-IV) und zuletzt im gesamten isokortikalen Assoziationskortex (Stadium V-VI) auf, wobei die ersten NFT bereits 20 Jahre vor Beginn der klinischen Symptomatik auftreten sollen. Von Bedeutung ist dabei, dass die Stadien I-II meist klinisch asymptomatisch bleiben (präklinisches Stadium), bei den Stadien III-IV kann, muß aber nicht zwingend eine Demenz bestehen, während Patienten mit den Stadien V-VI immer dement sind (Baner et al., 1993).

Die Entwicklung der Alzheimerspezifischen Veränderungen (Plaques und Tangles) verläuft zeitlich aufeinander folgend, wobei erst  $\beta$ A4 gebildet wird und dann die NFT entstehen (Hardy und Selkoe, 2002, Lewis et al. 2001). Das konnte anhand eines dreifach transgenen Mausmodells gezeigt werden, in dem APP, PS1 und tauP301L exprimiert wird. Die  $\beta$ A4 Ablagerung geht der NFT Bildung zeitlich voraus. Die räumliche und zeitliche Entwicklung und Ausdehnung von den Amyloidablagerungen und den NFT im Mausmodell entspricht derjenigen von Alzheimer Patienten (Oddo et al., 2003).

### 1.3 Diagnose

Trotz aller Fortschritte bei der Erforschung der molekularbiologischen Grundlagen der Alzheimerschen Krankheit, kann die Diagnose bisher dann sicher gestellt werden, wenn der klinische Befund zusammen mit dem neuropathologischen Befund bewertet wird. Zwar kann die klinische Diagnose der Alzheimerschen Krankheit in spezialisierten Kliniken eine Validität bis zu etwa 90% erreichen (Cummings et al., 1998). Dennoch gibt es bisher kein spezifisches Kriterium oder eine typische Kombination mehrerer Merkmale, die eine absolut sichere klinische Diagnose rechtfertigen würden. Der neuropathologische Befund ohne Kenntnis des klinischen Bildes wiederum reicht nicht aus, um die Diagnose sicher stellen zu können, sondern es kann, je nach Befund, lediglich eine unterschiedlich wahrscheinliche Aussage über das Vorliegen der Krankheit getroffen werden.

#### 1.3.1 Neuropathologische Diagnose

Die Diagnose des Morbus Alzheimer wird nach internationalen Kriterien postmortal durch die neuropathologische Untersuchung des Gehirns unter Berücksichtigung des klinischen Befundes zu Lebzeiten des Patienten gestellt (McKhann et al., 1984; Gearing et al., 1995). Eine morphologische Untersuchung des Gehirns zu Lebzeiten des Patienten wird nur in Ausnahmefällen durchgeführt, da sich eine Hirnbiopsie derzeit bei Fehlen wesentlicher therapeutischer Konsequenzen aus ethischen Gründen verbietet. Damit ist die autoptische Untersuchung des Gehirns die Grundlage für eine sichere Diagnose, aber auch Basis um neue molekulare Marker und neue therapeutische Ansätze zu testen und zu etablieren.

Die makroskopische Untersuchung des Gehirns zeigt bei fortgeschrittenen Fällen eine diffuse, temporal und frontal betonte Hirnatrophie, die jedoch unspezifisch ist und eine Abgrenzung zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen nicht zulässt. Histologisch findet man neben den oben erwähnten Veränderungen (senile Plaques, neurofibrilläre Tangles, Verlust von Nervenzellen und Synapsen) regelmäßig eine Astrogliose, eine Aktivierung von Mikrogliazellen, eine granulovakuoläre Degeneration und Neuropilfäden. Häufig ist zudem eine Amyloidangiopathie mit den Alzheimer-Veränderungen assoziiert. Für die histologisch-neuropathologische Diagnose der Alzheimerschen Krankheit sind allerdings ausschließlich senile Plaques und neurofibrilläre Tangles von Bedeutung. Zur Darstellung dieser Veränderungen verwendet man verschiedene Versilberungstechniken

sowie immunhistologische Färbungen für  $\beta$ -Amyloid und tau. Da senile Plaques und neurofibrilläre Tangles unabhängig voneinander auch bei „normalem Altern“ auftreten, ist eine wesentliche Frage für die Diagnose, wo man die Grenze zwischen „normalen Altersveränderungen“ und Alzheimerpathologie setzt. Um diese Grenze einheitlich festzulegen, wurden drei international anerkannte Diagnoseprotokolle für Morbus Alzheimer entwickelt, die jeweils klinische und neuropathologische Befunde und Kriterien integrieren (McKhann et al., 1984; Mirra et al., 1991; Hyman und Trojanowski, 1997). Allen Protokollen ist gemeinsam, dass als wichtigste neuropathologische Veränderung senile Plaques und insbesondere neuritische Plaques semiquantitativ beurteilt werden, während der Neurofibrillenpathologie nach Braak&Braak (1991) eine unterstützende Wertigkeit zukommt. Bei den CERAD-Kriterien (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) (Mirra et al., 1991) wird die semiquantitativ ermittelte Dichte neuritischer Plaques in drei isokortikalen Regionen ermittelt und in einen altersadaptierten „Plaque-Score“ überführt. Nach Integration von Plaque-Score und klinischen Daten wird das Vorliegen eines Morbus Alzheimer als sicher, wahrscheinlich, möglich oder „normal“ beurteilt. Die Neurofibrillenpathologie spielt bei den CERAD-Kriterien keine Rolle.

1997 wurde von einer internationalen Arbeitsgruppe (Anonymous, 1998) ein Protokoll erarbeitet (NIA- und Reagan-Institute-Kriterien), das auch die neurofibrillären Veränderungen berücksichtigt und das einige grundlegende Prinzipien in Betracht zieht. Erstens, dass es sich bei Morbus Alzheimer um eine klinisch und pathologisch heterogene Erkrankung handelt, bei der weder klinische noch neuropathologische Veränderungen alleine eine sichere Diagnose erlauben. Das heißt, wenn man pathologische Veränderungen im Gehirn findet und keine klinischen Angaben zum Vorliegen einer Demenz hat, ist nur eine Wahrscheinlichkeitsaussage und keine sichere Diagnose eines Morbus Alzheimer möglich. Zweitens, kann einer Demenz bei älteren Menschen mehr als eine Erkrankung zugrunde liegen. So können neben den degenerativen Alzheimerveränderungen weitere pathologische Prozesse (z.B. Vaskuläre Demenz, M. Parkinson, Progressive Supranukleäre Lähmung etc.) zur Demenz beitragen. Und drittens, werden alle neuropathologischen Alzheimerveränderungen im Gehirn (diffuse und neuritische Plaques, neurofibrilläre Tangles) als abnormal angesehen und sollen dokumentiert werden.

Für die neuropathologische Einteilung werden mehrere Hirnareale untersucht und eine semiquantitative Evaluation von neuritischen Plaques (nach CERAD) und neurofibrillären Tangles durchgeführt sowie das Braak-Stadium bestimmt.



Es ergibt sich

- eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass Alzheimerveränderungen der Demenz zugrunde liegen, wenn sowohl neuritische Plaques als auch Tangles (Braak-Stadium V/VI) in großer Anzahl im Isokortex auftreten
- eine mittlere Wahrscheinlichkeit, dass Alzheimerveränderungen der Demenz zugrunde liegen, wenn neuritische Plaques mäßig häufig vorkommen und die Neurofibrillenveränderungen auf limbische Regionen begrenzt sind (Braak-Stadium III/IV)
- eine niedrige Wahrscheinlichkeit, dass Alzheimerveränderungen der Demenz zugrunde liegen, wenn neuritische Plaques und Tangles (Braak-Stadium I/II) in geringer Anzahl vorkommen.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Diagnose eines Morbus Alzheimer dann mit hinlänglicher Sicherheit gestellt werden kann, wenn ein mehr als altersadaptierter Plaque-Score zusammen mit neurofibrillären Tangles vorliegt und klinisch eine Demenz bekannt ist.

### 1.3.2 Humangenetische Diagnose

Ein in der Öffentlichkeit viel beachtetes Thema ist der Einsatz genetischer Tests zur Diagnostik von Morbus Alzheimer. Wert, Nutzen und Risiken werden sowohl von Wissenschaftlern als auch von der Öffentlichkeit kontrovers und kritisch diskutiert.

Für Personen mit bekanntem autosomal dominantem Erbgang in der Familienanamnese sind Tests für Mutationen im Präsenilin 1-Gen (PSEN1) oder im Gen des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP, engl. *Amyloid Precursor Protein*) am weitesten verbreitet. Es ist jedoch zu beachten, dass Mutationen in diesen Genen zu einer variablen Expression führen können und der positive Nachweis nicht zwangsläufig bedeutet, an Morbus Alzheimer zu erkranken. Genetische Testverfahren sollten daher nur nach professioneller humangenetischer Beratung stattfinden.

Der Nachweis des APOE-Genotyps als prädiktiver Test bei asymptomatischen Personen wird derzeit generell abgelehnt, da er keine Voraussage darüber erlaubt, ob und ab welchem Alter die Krankheit ausbricht. Genau so wenig würden sich therapeutische Konsequenzen aus der Kenntnis des Genotyps ergeben.

Uneinigkeit herrscht über den Nachweis des APOE-Genotyps als diagnostisches Hilfsmittel. Die diagnostische Genauigkeit erhöht sich beim klinischen Verdacht auf Alzheimer signifikant, wenn das APOE  $\epsilon$ 4-Allel (APOE4) vorliegt. Jedoch fehlen weitergehende Studien über den Stellenwert des APOE-Tests im klinischen Alltag (Anonymous, 1995; Roses, 1997).

#### **1.4 Genetik des Morbus Alzheimer**

Im letzten Jahrzehnt wurden beachtliche Erfolge in der Erforschung der Beziehung zwischen Genen und Krankheiten erzielt. Grundsätzlich unterscheidet man Erkrankungen, deren Auftreten kausal mit der Mutation eines Gens in Verbindung gebracht werden können, von solchen mit einem komplexen Vererbungsmuster.

Bei ersteren wird die Krankheit einem Mendelschen Vererbungsmuster folgend an die nächstfolgende Generation vererbt, wovon derzeit etwa 100 Gene bekannt sind (The NCBI Handbook, 2002). Demgegenüber sind Erkrankungen mit einem komplexen Vererbungsmuster zu nennen, die familiär gehäuft vorkommen und keinen eindeutigen Erbgang aufweisen. Durch eine komplexe Wechselwirkung von genetischen Risikofaktoren (Suszeptibilitätsgene) mit Umwelteinflüssen können der Verlauf und das Erkrankungsalter, bzw. das Auftreten der Krankheit selbst beeinflusst werden.

Morphologisches Korrelat solcher Risikofaktoren sind auf molekularer Ebene Polymorphismen, d.h. alternative Genotypen (Allele) mit umschriebener Lokalisation auf einem Gen, die im Unterschied zur Mutation eine Allelfrequenz von mehr als 1% in einer Population aufweisen. Sie können in Form von Insertionen, Deletionen, Tandem-Wiederholungen oder dem Austausch einer einzelnen Base auftreten. Ihnen ist zu Eigen, dass der Träger eines Risikofaktors nicht zwangsläufig erkranken muss. Auf der anderen Seite können auch Nichtträger erkranken.

Zu den bedeutsamsten Krankheiten mit einem komplexen genetischen Vererbungsmuster zählen neben Herz-Kreislauf Erkrankungen und bestimmten Stoffwechselstörungen wie dem Diabetes Mellitus auch psychiatrische (z.B. die Schizophrenie) und neurodegenerative Krankheiten (The NCBI Handbook, 2002).

Beim Morbus Alzheimer existieren beide der genannten Vererbungsmuster. Danach wird zwischen familiären und sporadischen Formen unterschieden (Tanzi, 1999).

### **1.4.1 Familiäre Form des Morbus Alzheimer: autosomal dominanter Erbgang**

Die familiäre Form wird im englischen Sprachgebrauch als Early-Onset Alzheimer's Disease (EOAD) bezeichnet. Sie tritt hauptsächlich vor dem 65. Lebensjahr auf und wird autosomal dominant vererbt. Etwa 5% aller Alzheimer-Patienten sind von ihr betroffen. Derzeit sind drei Gene bekannt, die durch Mutationen zum Ausbruch dieser Form führen. Dazu zählt zum einen das Gen des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP), einem Typ-1 Transmembranprotein, das 1987 identifiziert wurde und auf Chromosom 21 liegt (George-Hyslop et al., 1987; Goate et al., 1991). Die Vermutung, dass auf Chromosom 21 ein „Alzheimer-Gen“ liegt, hatte man schon länger, denn Patienten, die an Trisomie 21 leiden, entwickeln fast ausnahmslos ab dem vierzigsten Lebensjahr Alzheimersche Veränderungen im Gehirn. Durch genetische Kopplungsuntersuchungen entdeckte man schließlich das auf diesem Chromosom liegende APP (Heston et al., 1991). Daneben wurden als weitere autosomal dominant vererbte Gendefekte Mutationen in den Genen Presenilin 1 (PSEN1) auf Chromosom 14 (Sherrington et al., 1995) und Presenilin 2 (PSEN2) auf Chromosom 1 identifiziert (Levy-Lahad et al., 1995).

### **1.4.2 Sporadische Form des Morbus Alzheimer: komplexes Vererbungsmuster**

Die sporadische Form, die auch als Late-Onset Alzheimer's Disease (LOAD) bezeichnet wird, tritt empirisch erhobenen Ergebnissen zu Folge hauptsächlich nach dem 65. Lebensjahr in Erscheinung.

Als einziger gesicherter genetischer Risikofaktor gilt derzeit das APOE  $\epsilon$ 4-Allel auf Chromosom 19, wohingegen dem  $\epsilon$ 2 Allel eine protektive Wirkung zugeschrieben wird (Saunders et al., 1993). Dieses Ergebnis konnte seither in zahlreichen Assoziationsstudien repliziert werden. Das APOE  $\epsilon$ 4- Allel scheint einen Einfluss auf das Erkrankungsalter zu haben, da Träger dieses Allels im Vergleich zu Trägern des APOE  $\epsilon$ 2- oder APOE  $\epsilon$ 3- Allels früher, meist noch vor dem 70. Lebensjahr erkranken. (Blacker et al., 1997; Meyer et al., 1998).

Neben dem etablierten Suszeptibilitätsgen APOE wurden zahlreiche weitere Suszeptibilitätsgene für Morbus Alzheimer beschrieben, deren Relevanz kontrovers diskutiert wird. Eines dieser Risikofaktoren ist das Gen für das Akute-Phasen-Protein Alpha-2-Makroglobulin (A2M) auf Chromosom 12 (Blacker et al., 1998) und das Gen für Cathepsin D.

### 1.4.3 Vorgehen zur Identifizierung von neuen Suszeptibilitätsgenen

Bei einer geschätzten Zahl von 30.000 bis 40.000 proteinkodierender Gene im menschlichen Genom stellt sich die Frage nach einer geschickten Strategie, Risikogene zu identifizieren. Eine möglichst genaue Charakterisierung des pathologischen Phänotyps sowie Erkenntnisse über daraus resultierende biochemische Charakteristika, aus denen ein plausibles pathogenetisches Konzept abgeleitet werden kann, ermöglicht es, gezielt in Frage kommende Faktoren zu finden. Durch geeignete molekulargenetische Methoden, wie beispielsweise der *Single Strand Conformational Polymorphism-PCR* (SSCP-PCR), gelingt es, den Genotyp eines pathogenetisch bedeutsamen Faktors auf das Vorliegen von Polymorphismen hin zu untersuchen, die dann auf eine Assoziation mit der Erkrankung hin untersucht werden können.

Ein ergänzender Weg zur Charakterisierung von „Kandidatengenen“ besteht darin, mittels Kopplungsanalysen die Verbindung eines Genortes zu einer Krankheit herauszufinden. Dabei handelt es sich um eine relativ aufwendige Methode, bei der das gleichzeitige Auftreten von DNS-Markern mit einer Krankheit bei Individuen einer Familie über mehrere Generationen hinweg beobachtet wird. Anhand der gewonnenen Daten wird versucht, ein Vererbungsmuster zu erkennen. Ist ein Genort auf diese Weise identifiziert worden, so müssen im darauffolgenden Schritt die Gene in der näheren Umgebung auf eine Assoziation mit der Krankheit untersucht werden. A2M wurde auf diese Weise als Risikofaktor für Morbus Alzheimer vorgeschlagen (Blacker et al., 1998).

In Tabelle 1 sind weitere Suszeptibilitätsgene aufgelistet. Sie sind nach ihrer pathophysiologischen Bedeutung geordnet.

**Tabelle 1** Genetische Risikofaktoren als „Kandidatengene“ für die sporadische Form des Morbus Alzheimer (nach Combarros et al., 2002)

<b>Biologische Bedeutung / Gen</b>	<b>Chromosom</b>	<b>Zitation</b>
<b>Apoptose/Entzündung</b>		
Human leukocyte antigen (HLA-A2)	6	Payami et al., 1997
Interleukin-1A (IL-1A)	2	Du et al., 2000; Grimaldi et al., 2000; Nicoll et al., 2000
Tumor-necrosis-factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	6	McCusker et al., 2001
FAS receptor (TNFRSF6)	10	Feuk et al., 2000
<b>Herz-Kreislauf</b>		
Angiotensin-converting-enzyme (ACE)	17	Kehoe et al., 1999; Mattila et al., 2000b; Richard et al., 2001
Cystatin C	3	Crawford et al., 2000
<b>Diverse</b>		
Tau	17	Bollido et al., 2000; Lilius et al., 1999
NACP/ $\alpha$ -synuclein	4	Xia et al., 1996; Matsubara et al., 2001
Estrogen receptor- $\alpha$	6	Brandi et al., 1999 Ji et al., 2000; Mattila et al., 2000a

**Tabelle 1** (Fortsetzung) Genetische Risikofaktoren als „Kandidatengene“ für die sporadische Form des Morbus Alzheimer (nach Combarros et al., 2002)

Biologische Bedeutung / Gen	Chromosom	Zitation
<b>Amyloid Bildung</b>		
Apolipoprotein E (APOE)	19	Saunders et al., 1993
$\alpha$ 2-Macroglobulin (A2M)	12	Dodel et al., 2000; Blacker et al., 1998; Koster et al., 2000
Presenilin 1 (PSEN1)	14	Yasuda et al., 1999; Wragg et al. 1996
Presenilin 2 (PSEN2)	1	Brookes et al., 1997; Combarros et al., 1999
Low-density lipoprotein receptor-Related protein (LRP)	12	Kang et al., 1997; Kang et al., 2000
very-low-density lipoprotein receptor (VLDLR)	9	Okuizumi et al., 1995; Helbecque et al., 2001; McIlroy et al., 1999a
Lipoprotein lipase (LPL)	8	Baum et al., 1999
Cathepsin D	11	Papassotiropoulos et al., 1999; Papassotiropoulos et al., 2000a
FE65	11	Lambert et al., 2000; Hu et al., 1989
Bleomycin hydrolase (BH)	17	Montoya et al., 1998
$\alpha$ 1-antichymotrypsin (ACT)	14	Kamboh et al., 1995
Butyrylcholinesterase (BCHE)	3	Lehmann et al., 1997; Wiebusch et al., 1999; Panegyres et al., 1999
<b>Oxidativer Stress</b>		
Endothelial nitric oxide synthase (NOS3)	7	Dahiyat et al., 1999
Dihydrolipoyl succinyltransferase (DLST)	14	Nakano et al., 1997
HFE	6	Sampietro et al., 2001
Transferrin	3	Namekata et al., 1997

#### 1.4.4 Der Cathepsin D 224C→T Polymorphismus als Risikofaktor für Morbus Alzheimer

1988 wurde erstmals eine Einzelbasensubstitution von Cytosin (C) zu Thymin (T) an Position 224 im Exon 2 im Profragment des Cathepsin D-Gens von menschlichen Brustkrebs MCF7 Zellen beschrieben, die einen Aminosäureaustausch von Alanin (Ala) zu Valin (Val) zur Folge hat (Augereau et al., 1988). Touitou und Mitarbeiter (Touitou et al., 1994) fanden heraus, dass es sich dabei um einen Polymorphismus handelt (und nicht um eine somatische Mutation) und konnte darüber hinaus zeigen, dass das Vorliegen des CatD T-Allels mit einer erhöhten Sekretion des CatD Proenzym einhergeht, aber nicht mit einer vermehrten Cathepsin D-Genexpression und auch nicht in einem statistisch signifikantem Ausmaß. Sie stellten die (bisher ungeprüfte) Hypothese auf, dass der Polymorphismus zu einer veränderten Aktivität des reifen Cathepsin D führt und somit zur Metastasierung von Tumorzellen beiträgt.

Da Cathepsin D -wie bereits beschrieben- (s. 1.2.2.2) mit der Pathogenese der Amyloid Ablagerungen assoziiert zu sein scheint, stellte Papassotiropoulos (Papassotiropoulos et al., 1999) in Analogie zu Touitou (Touitou et al., 1994) die Hypothese auf, dass der CatD 224C→T Polymorphismus über den Mechanismus der erhöhten ProcatD Sekretion zu einer veränderten Prozessierung von APP und damit zu einer verstärkten Produktion von  $\beta$ A4 führt und somit als „Risikokandidatengene“ für Morbus Alzheimer in Frage kommt. In zwei voneinander unabhängigen Fall-Kontroll Studien konnten Papassotiropoulos et al. (1999, 2000a) eine signifikante Überrepräsentation des CatD T-Allels bei Alzheimer Patienten im Vergleich zu Kontrollen feststellen. Es ergibt sich ein 3,9-fach erhöhtes Risiko für Träger des CatD T-Allels unabhängig von deren APOE-Genotyp und ein insgesamt 10-fach erhöhtes Risiko für Träger des CatD T-Allels bei gleichzeitigem Vorliegen des APOE 4-Allels an Morbus Alzheimer zu erkranken (Papassotiropoulos et al. 1999, 2000a).

Zwei weitere Studien kommen unabhängig voneinander zu dem Schluß, dass CatD geschlechtsspezifisch das Erkrankungsrisiko für Männer (nicht für Frauen) erhöht (Menzer et al., 2001; Jhoo et al., 2005). Ein altersbezogen erhöhtes Erkrankungsrisiko (Altersgruppe 75-79) konnten Beyer et al. (2005) feststellen.

Demgegenüber stehen insgesamt 18 Studien, die keinen Zusammenhang zwischen dem CatD 224C→T Polymorphismus und ein einem erhöhten Risiko an Morbus Alzheimer

mer zu erkranken, belegen können (Bagnoli et al., 2002; Bhojak et al., 2000; Blomqvist et al., 2006; Capurso et al., 2005; Crawford et al., 2000; Emahzion et al., 2001; Ingegneri et al., 2003; Kölsch et al., 2004; Mateo et al., 2002; McIlroy et al., 1999b; Prince et al., 2001; Styczynska et al., 2003; Jhoo et al., 2005; Li et al., 2004; Matsui et al., 2001; Bertram et al., 2000, 2001).



## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Beteiligung von Cathepsin D, dem Hauptbestandteil der Proteasen des endosomal-lysosomalen Systems, an der amyloidogenen APP-Prozessierung ist durch Studien belegt. Ein Polymorphismus im Profragment des Cathepsin D-Gens (224C→T Transition in Exon 2, Austausch von Alanin zu Valin) führt zu einer vermehrten Sekretion des Proenzym von Cathepsin D in menschlichen Brustkrebszellen und könnte durch eine veränderte Aktivität des reifen Cathepsin D zur Metastasierung beitragen. Ausgehend von der vermuteten Beteiligung von CatD an der  $\beta$ A4 Entstehung wurde in Analogie dazu die Hypothese aufgestellt, dass der CatD 224C→T Polymorphismus das Risiko erhöht, an Morbus Alzheimer zu erkranken. Bisher fehlen Studien über einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und den charakteristischen Veränderungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten.

Mit der vorliegenden Arbeit werden zwei Ziele verfolgt. Zum einen wird o.g. Hypothese geprüft, indem mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) an klinisch diagnostizierten Alzheimer Patienten und gesunden Kontrollfällen der CatD-Genotyp bestimmt und die Verteilung des Genotyps sowie der Allelfrequenzen analysiert wird, um anschließend das Risiko zu bestimmen, bei Vorliegen des CatD T-Allels an Morbus Alzheimer zu erkranken. Mögliche beeinflussende Faktoren, wie das Alter, das Geschlecht und der APOE-Genotyp der Probanden werden in der statistischen Auswertung mit berücksichtigt.

Im zweiten Teil der Arbeit wird der Frage nachgegangen, ob sich der CatD-Genotyp auf die wesentlichen neuropathologischen Veränderungen bei Alzheimer Patienten (Plaques, neurofibrilläre Tangles und aktivierte Mikroglia) auswirkt. Dazu werden autopsisch gewonnene Hirngewebsproben, bei denen Morbus Alzheimer neuropathologisch diagnostiziert wurde, genotypisiert und immunhistochemisch auf das Vorkommen von Cathepsin D untersucht. Der CatD-Genotyp wird jeweils mit der Anzahl und der Fläche von  $\beta$ A4-haltigen Plaques,  $\beta$ A4/tau positiven neuritischen Plaques und aktiverter Mikroglia, sowie der Anzahl von neurofibrillären Tangles (NFT) auf einen signifikanten Zusammenhang hin untersucht.

## **2 MATERIALIEN UND METHODEN**

### **2.1 Vorgehen bei klinisch diagnostizierten Fällen**

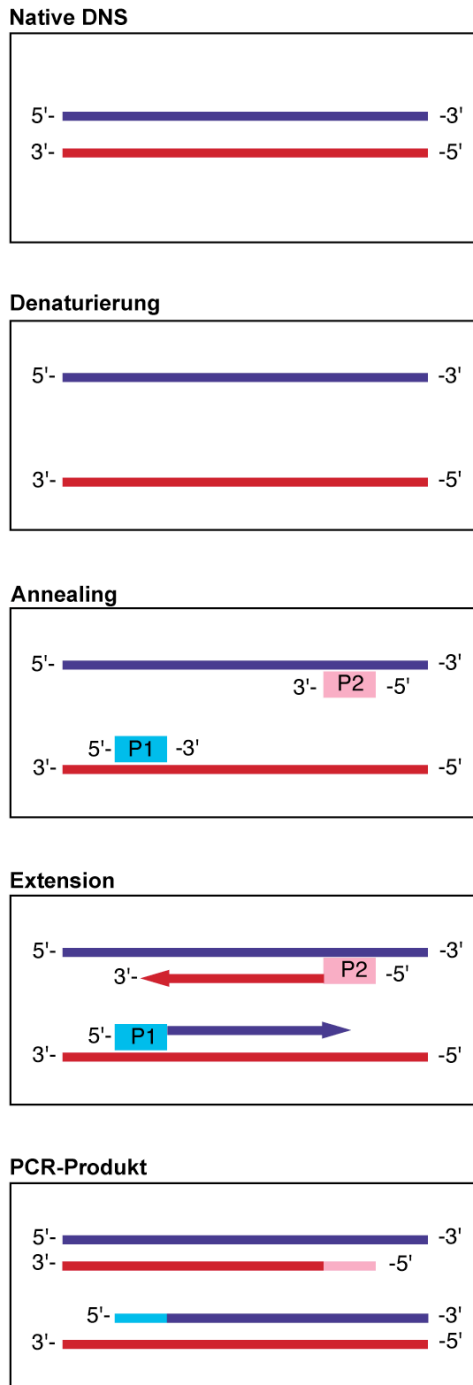
Im ersten Teil der Arbeit wurde der CatD 224C→T Polymorphismus im Exon 2 an insgesamt 433 Probanden untersucht. Für die Genotypisierung wurde DNS aus Leukozyten extrahiert. Dann wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) der Abschnitt, in dem sich das Exon 2 befindet, vervielfältigt und anschließend der Genotyp durch den Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) festgestellt.

#### **2.1.1 Probenauswahl**

Der vorliegenden Untersuchung liegt eine Stichprobenauswahl von 433 Proben, von denen 186 an Morbus Alzheimer (Altersdurchschnitt 68,3; Standardabweichung  $\pm 10,2$ ; Anteil weiblicher Personen 67%) erkrankt sind zu Grunde, die, ebenso wie 247 Kontrollen (67,04 Jahre;  $\pm 11,68$ ; Anteil weiblicher Personen 59%), von denen 191 gesund und 56 von einer neuropsychiatrischen Erkrankung betroffen waren, die nicht mit kognitiven Störungen einherging, genotypisiert und miteinander verglichen wurden. Die Proben wurden in Early-Onset Alzheimers Disease (EOAD) und in Late-Onset Alzheimers Disease (LOAD) Fälle unterteilt. Die Altersgrenze liegt definitionsgemäß bei 60 Jahren. Um einen möglichen altersabhängigen Effekt zu berücksichtigen, wurden die LOAD weiter in die Altersgruppen 61-70 Jahre, 71-80 Jahre und über 81 Jahre eingeteilt und mit altersentsprechenden Kontrollen verglichen.

### 2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist heute weder aus der Forschung noch aus dem Klinikalltag als diagnostisches Instrument wegzudenken. Sie ermöglicht es, geringste Mengen an DNS-Abschnitten millionenfach zu vervielfältigen. Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion ist in Abb. 2 dargestellt.



**Abb. 2** Die PCR. Zunächst wird die doppelsträngige DNS bei ca. 95 °C für fünf Minuten denaturiert; es resultieren zwei Einzelstränge. Im nächsten Schritt, dem Annealing, heften sich bei einem Temperaturoptimum von ca. 50 °C die Primer P1 und P2 an das komplementäre 3'-Ende des zu vervielfältigenden DNS-Abschnitts an. Die anschließende Primerextension bei ca. 70 °C erfolgt stets in 5'-3'-Richtung. Bei n Wiederholungen dieses Zyklus erhält man 2<sup>n</sup> Kopien. Eine optimale Ausbeute wird bei 25- bis 30-facher Wiederholung erzielt. Die Zeit- und Temperaturoptima unterscheiden sich von Fall zu Fall, und müssen durch Experimentieren ermittelt werden.

### 2.1.2.1 Versuchsmaterialien

- Puderfreie Einmal-Latex-Handschuhe (SafeSkin)
- Dünnwandige 0,5 ml Reaktionsgefäße (Perkin Elmer)
- Sterile Pipettenspitzen mit Aerosolfilter (Biozym)
- DNS-Mastercycler 5330 (Eppendorf)
- ddH<sub>2</sub>O
- [5X] Puffer F (Invitrogen)
- dNTP's Mix (Invitrogen)
- Taq-Polymerase (Boehringer Mannheim)
- Primer (MWG Biotech)

### 2.1.2.2 Anwendung der PCR zur Genotypisierung einer C→T-Transition im Exon 2 des Cathepsin D-Gens bei klinisch diagnostizierten Fällen

Die Durchführung der PCR gliedert sich in drei Schritte: Erst wird der Reaktionsansatz zubereitet, dann wird die DNS hinzugefügt und zuletzt wird die Amplifikation gestartet.

Folgende Mengen bzw. Konzentrationen der Materialien wurden je Probe in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße pipettiert:

- 1 µl der Primer (0,4pmol/ µl)
- 14, 4µl ddH<sub>2</sub>O
- 5 µl Puffer F
- 2,5 µl dNTP's Mix (250 µM ea.)
- 0,1 µl taq-Polymerase (1, 25 U)
- 1µl DNS
- Das Endvolumen betrug je Ansatz 25 µl.

Eine initiale Denaturierung erfolgte bei einer Temperatur von 94 °C für die Dauer von fünf Minuten. Daraufhin erfolgte der Amplifikationszyklus. Die Denaturierung fand bei 94°C für die Dauer von 0,5 Minuten statt. Das Annealing dauerte bei einer Temperatur von 63°C ebenfalls 0,5 Minuten. Für die einminütige Extensionsphase erwies sich eine Temperatur von 72°C als optimal. Dieser Zyklus wurde 30mal wiederholt. Abschließend erfolgte eine Extension für die Dauer von fünf Minuten bei einer Temperatur von 72 °C.

Danach wurden die Proben bei einer Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

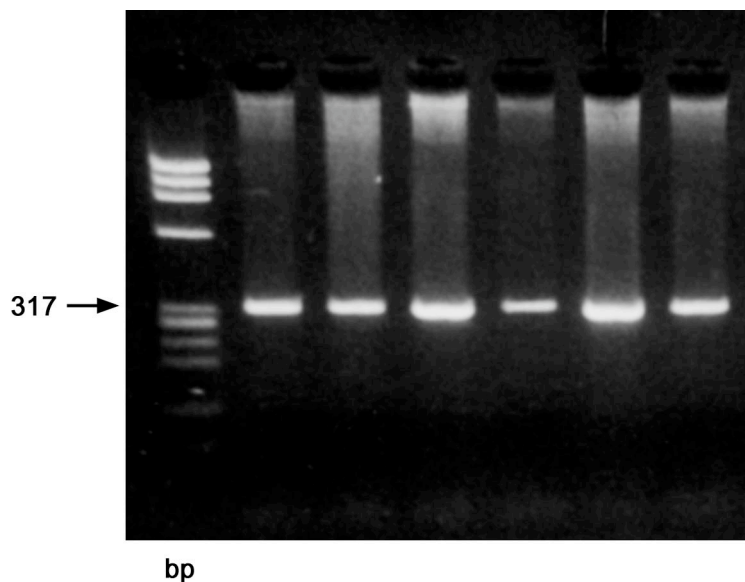
Für die Amplifikation des Exon 2 aus leukozytärer DNS wurden Primer nach dem Protokoll von Papassotiropoulos et al. (1999) verwendet. Es resultierte ein Amplifikat von 317 bp Länge (Abb.3).

#### Sequenz Primer 1 (Cat-D 2-1)

Up: 5'- GTG ACA GGC AGG AGT TTG GT-3'

#### Sequenz Primer 2 (Cat-D 2-2)

Low: 5'-GGG CTA AGA CCT CAT ACT CAC G-3'



**Abb.3** Die Abbildung zeigt PCR-Produkte der DNS von sechs verschiedenen Alzheimer Patienten, die aus deren Leukozyten gewonnen wurde. Sie sind je 317 bp lang. Die Spalte ganz links im Bild zeigt den Längenstandard.

### 2.1.2.3 Anwendung der PCR zur Genotypisierung einer C→T-Transition im Exon 2 des Cathepsin D-Gens bei neuropathologisch gesicherten Fällen

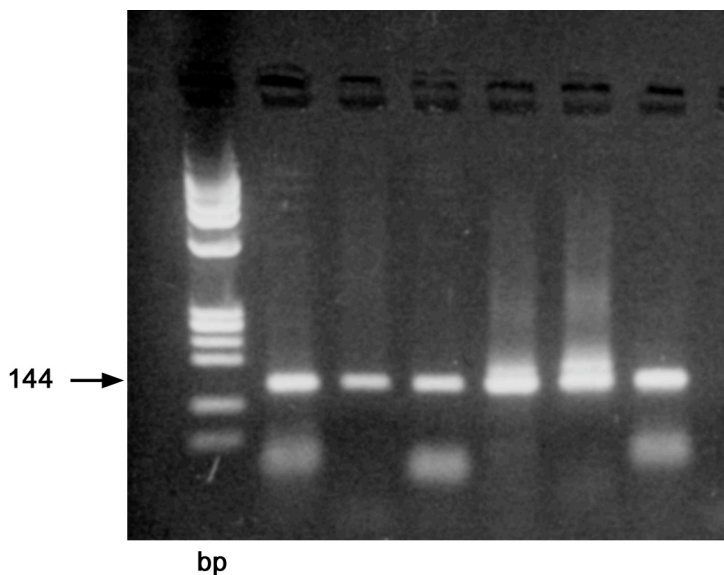
Die DNS konservierten Gewebes ist aufgrund der dazu nötigen Vorbehandlung in einem höheren Maße fragmentiert, als dies bei leukozytärer DNS der Fall ist. Deshalb wurden bei diesen Proben Primer gewählt, die zu einem kürzeren PCR-Amplifikat führten. Diese Primer wurden eigens dafür hergestellt. Es wurde das Versuchsprotokoll wie unter 2.1.2.2 beibehalten, nur wurde eine Annealingtemperatur von 61 °C gewählt. Um eine höhere Ausbeute an PCR-Produkten zu erlangen, wurde der Reaktionszyklus 35mal wiederholt. Es entstand ein PCR-Produkt von 144bp Länge (Abb. 4).

#### Sequenz Primer 1 (Cat-D 2-1 kurz)

Up: 5'-CCG CTG CAC AAG TTC ACG-3'

#### Sequenz primer 2 (Cat-D 2-2 kurz)

Low: 5'-CTT GAG CAC CTC GGG AAT G-3'



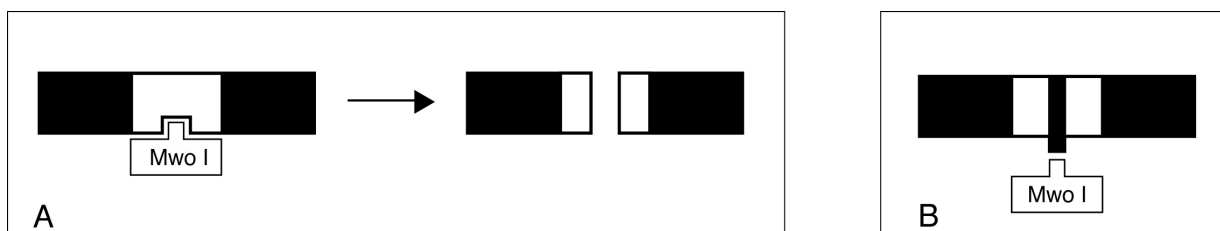
**Abb. 4** Die Abbildung zeigt PCR-Produkte der DNS von sechs verschiedenen Alzheimer Patienten, die aus deren Hirngewebe gewonnen wurde. Sie sind je 144 bp lang. Die Spalte ganz links im Bild zeigt den Längenstandard.

#### **2.1.2.4 Kontaminationskontrolle**

Die korrekte Auswertung der Ergebnisse bei der Arbeit mit der PCR-Methode ist durch Verunreinigung mit „fremder“ DNS oder PCR-Produkten besonders gefährdet, da es sich um ein äußerst sensibles Verfahren handelt. Es wurden daher stets Handschuhe und Pipettierspitzen mit Aerosolfilter für den einmaligen Gebrauch sowie sterile Kittel benutzt. Außerdem erfolgten die Zubereitung des Reaktionsansatzes, das Hinzufügen der DNS und die Reaktion selber in voneinander getrennten Räumen. Darüber hinaus wurden bei jedem Versuch drei Leerkontrollen mitgeführt, um dennoch eine mögliche Kontamination erkennen zu können.

### 2.1.3 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Restriktionsenzyme sind Endonucleasen, die aus Bakterien stammen (s. Abb. 5) Sie erkennen eine ganz spezifische Sequenz weniger Basen innerhalb der DNS und spalten dort das Molekül (A). Liegt innerhalb einer solchen Erkennungssequenz eine Veränderung der Basenfolge vor, kann das Enzym nicht an der Stelle schneiden (B). Man erhält im Vergleich zum Wildtyp ein Fragment unterschiedlicher Länge.



**Abb. 5** Prinzip des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus. Erläuterungen im Text.

#### 2.1.3.1 Versuchsmaterialien

- Wasserbad
- Reaktionsgefäße (Eppendorf)
- Puderfreie Einmal-Latex-Handschuhe (SafeSkin)
- Sterile Pipettenspitzen (biozym)
- Restriktionsendonuklease MWO I (5.000 U/ml, New England Biolabs), mit dem vom Hersteller empfohlenen Inkubationspuffer

#### 2.1.3.2 Versuchsprotokoll

Zu 8,5 µl des PCR-Produkts wurden je 1 µl Inkubationspuffer und 0,5 µl des Restriktionsenzym MWO I pipettiert. Der Verdau erfolgte für 2,5 Stunden in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 60°C.



### **2.1.3.3 Anwendung des RFLP zur Genotypisierung einer C→T Transition an Position 224 im Exon 2 des Cathepsin D-Gens bei klinisch diagnostizierten Fällen**

Zur Detektion der C→T Transition an Position 224 im Exon 2 der cDNS des CatD-Gens auf Chromosom 11 wurde die Restriktionsendonuclease MWO I benutzt.

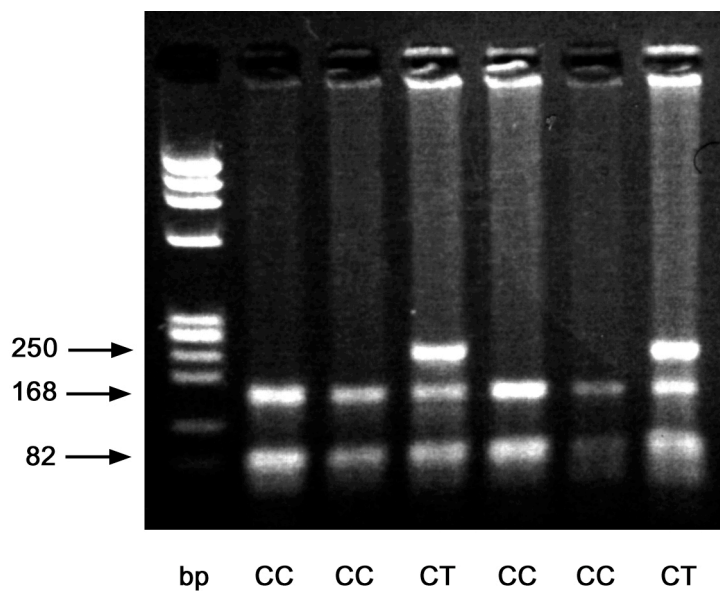
Ihre Erkennungssequenz lautet: 5'-GC xxxxxxx GC-3'. Zwischen dem zweifach hintereinander vorkommenden 5'-GC-Motiv liegen sieben Basen, deren Sequenzfolge für die Erkennung des Enzyms unerheblich ist. MWO I schneidet die DNS charakteristischerweise zwischen der fünften und sechsten Base nach dem ersten erkannten 5'-GC Motiv. Die in dieser Arbeit untersuchte C→T Transition betrifft die Pyrimidinbase Cytosin dieses Motivs.

Das C-Allel von aus Leukozyten gewonnener DNS wird in zwei Fragmente von je 168 und 82 bp Länge zerlegt. Das T-Allel ist nach Ablauf der Inkubationszeit 250 bp lang (Abb. 6).

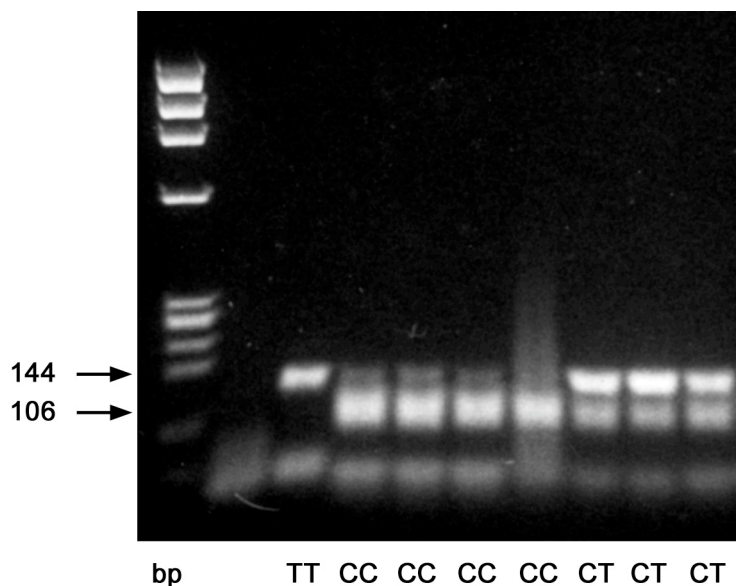
### **2.1.3.4 Anwendung des RFLP zur Genotypisierung einer C→T Transition an Position 224 im Exon 2 des Cathepsin D-Gens bei neuropathologisch gesicherten Fällen**

Im Falle der aus Hirngewebe extrahierten DNS wurde das 144 bp lange Amplifikat der Primer CatD 2-1 kurz und CatD 2-2 kurz bei Vorliegen des Wildtyps in zwei je 106 und 38 bp lange Stücke geschnitten. Lag die Transition vor, so blieb das Amplifikat unberührt (Abb. 7).

Die Beurteilung der Restriktionsenzymanalyse erfolgte mit Hilfe der unter 2.1.4 beschriebenen Gelelektrophoresetechnik. Es wurden so die Genotypen der jeweiligen Fälle bestimmt (Abb. 6, Abb. 7).



**Abb. 6** Die Abbildung zeigt Verdauungsprodukte von MWO I von sechs verschiedenen Alzheimer Patienten, bei denen die Diagnose klinisch gestellt wurde. Zu erkennen sind zwei verschiedene Genotypen: CT und CC. Individuen, die für die 224C→T Transition heterozygot sind (CT), zeigen drei Banden: zum einen die des C-Allels mit zwei Fragmenten von je 82 und 168 bp Länge, zum anderen die des T-Allels mit 250 bp Länge. Homozygote Individuen (CC) zeigen zwei Banden beider C-Allele mit je 82 und 168 bp Länge.



**Abb. 7** Die Abbildung zeigt Verdauungsprodukte von MWO I von sechs verschiedenen Alzheimer Patienten, bei denen die Diagnose neuropathologisch gestellt wurde. Zu erkennen sind drei verschiedene Genotypen: CT, CC und TT. Individuen, die für die 224C→T Transition heterozygot sind (CT), zeigen zwei Banden: die des C-Allels mit einem Fragmenten von 106 bp Länge, wobei das bei der Spaltung vorkommende kurze Stück der Länge von 38 bp bei der Gelelektrophorese hier nicht erfasst wurde, und die des T-Allels mit 144 bp Länge. Homozygote Individuen, bei denen die Transition nicht vorliegt (CC), zeigen zwei Banden beider C-Allele mit 106 bp Länge. Die schwache Bande der Länge von 144 bp bei diesen Individuen entspricht unverdaulichem PCR-Produkt. Zu beachten ist das für das T-Allel homozygote Individuum (TT), bei dem beide Allele mit je 144 bp Länge zu sehen sind.

### 2.1.4 Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurde das Ergebnis der PCR und des RFLP überprüft.

Bei dieser Methode werden die Proben mit einer fluoreszierenden Substanz versetzt und in ein Agarosegel pipettiert. Das Gel befindet sich in einer Elektrophoresekammer. Wird dort ein elektrisches Feld erzeugt, so werden die DNS-Fragmente ihrer elektrischen Teilladung entsprechend innerhalb des Feldes angezogen und legen eine bestimmte Distanz in dem Gel zurück. Die negativ geladene DNS wandert also zum Pluspol.

Die zurückgelegte Distanz der Fragmente ist ganz allgemein von der Größe der Moleküle, ihrer Teilladung, der angelegten Spannung sowie der Konzentration des Agarosegels abhängig. Je größer und schwerer die Fragmente sind, desto geringer ist die Distanz, die sie im Gel zurücklegen. Bei jedem Versuch wird ein Längenstandard mitgeführt. Darin sind DNS-Fragmente bekannter Länge enthalten, so dass durch den Vergleich der Lage der experimentell gewonnenen Stücke zu den Banden des Längenstandards ihre Länge bestimmen werden kann.

Anschließend wurde das Gel mit UV-Licht bestrahlt und dabei fotografiert. Die Position der Proben wird auf diese Weise anhand fluoreszierender Banden sichtbar gemacht (Abb. 3,4,6,7).

#### 2.1.4.1 Versuchsmaterialien

- Elektrophoresekammer Horizon 58 (Gibco BRL) mit passenden
- Formen und Kämmen
- Spannungsquelle Power Pac 300 (Bio Rad)
- UV-Lampe Macro-Vue, UV-25 (Hoefler)
- Polaroid-Kamera Photoman (Hoefler)
- Polaroid-Film
- Agarose (Gibco BRL)
- Ethidiumbromid (Sigma)
- TBE- Puffer (12,11g Trisma Base, 6,18g Boric acid, 0,74g EDTA, 1l dH<sub>2</sub>O)
- Längenstandard  $\Phi$  X174 RF DNS/ Hae III Fragments, GibcoBRL
- Gel Loading Solution (SIGMA)

### 2.1.4.2 Durchführung

Für die Herstellung des 2%-igen Gels wurde 6 mg Agarose in 30 ml TBE-Puffer unter Hitze verrührt, zweimal aufgekocht und anschließend 0,7 µl Ethidiumbromid (100 µg/µl) hinzugefügt. Das flüssige Gel wurde dann in die Gelkammer gegossen, ein Gelkamm darauf aufgesetzt und erstarren gelassen. So entstanden Taschen mit 10 µl Volumen.

In der Elektrophoresekammer befand sich das Gel in der TBE-Flüssigkeit. Die erste Tasche wurde mit 0,5 µl Längenstandard, 8,5 µl TBE und 1 µl Gel Loading Solution gefüllt.

In die weiteren Taschen kamen jeweils 9 µl des PCR-Produktes mit je 1 µl der Gel Loading Solution.

Die Elektrophorese lief bei 120mV Gleichstrom für die Dauer von 25 Minuten bei den PCR-Produkten, die aus Leukozyten stammen und für 35 Minuten bei denen, die aus in Paraffin eingebettetem Hirngewebe stammen.

Anschließend wurde das im UV-Licht fluoreszierende Ergebnis mit der Polaroid-Kamera fotografiert.

Stellte sich heraus, dass eine Probe nicht zu beurteilen war, wurde entweder eine nested-PCR angeschlossen, oder es wurde die PCR erneut mit der doppelten Menge an DNS durchgeführt, wenn zu wenig PCR-Produkt darin enthalten war. War die Beurteilung durch eine zu hohe Menge an PCR-Produkten beeinträchtigt, so wurde die Probe nachträglich mit 1 µl sterilem und nucleinasefreiem doppelt destilliertem Wasser verdünnt und anschließend der Elektrophorese unterzogen. Die Probe wurde aus der späteren Analyse ausgeschlossen, wenn auch diese Maßnahmen zu keinem befriedigenden Ergebnis führten.

## **2.2 Vorgehen bei neuropathologisch diagnostizierten Fällen**

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob es einen Unterschied hinsichtlich der wesentlichen neuropathologischen Veränderungen in Abhängigkeit des CatD T-Allels zu erkennen gibt. Hierzu wurde die DNS von in Paraffin eingebetteten Gewebeproben aus dem Gehirn von 19 Individuen extrahiert, bei denen die Diagnose der Alzheimerschen Krankheit postmortem gestellt wurde. Danach wurden die Proben mit Hilfe der PCR und des RFLP genotypisiert. Anschließend wurden die Daten von Anzahl und Fläche von Plaques, neuritischen Plaques (NP), neurofibrillären Tangles (NFT) und aktivierter Mikroglia in Abhängigkeit des T-Allels miteinander mit dem Mann-Whitney Verteilungstest verglichen. Die Daten hierzu stammen aus vorangegangenen Untersuchungen (Details Kap. 2.2.2).

An den Schnitten, die jeweils dem Frontallappen und dem Temporallappen mit Hippokampus entstammten, wurde zusätzlich eine immunhistochemische Doppelfärbung mit CatD und  $\beta$ A4 durchgeführt.

### 2.2.1 DNS-Extraktion aus neuropathologischem Archivmaterial

Um die DNS der neuropathologisch diagnostizierten Fälle für die Genotypisierung zugänglich machen zu können, musste sie erst aus den Präparaten extrahiert werden. Dieser Schritt gliedert sich in drei Teile. Zunächst wurde das Gewebe entparaffiniert. Danach erfolgte der Gewebeerddau mittels einer Proteinase und anschließend wurde die DNS gereinigt und in eine angemessene Konzentration verdünnt.

#### 2.2.1.1 Versuchsmaterialien

Alle verwendeten Materialien sollten hochrein sein ("Molecular Biology Grade" oder "HPLC Grade")

- o-Xylol (Sigma, 29.588-4)
- Mineralöl (Sigma, M 5904)
- Ethanol (Sigma, 270741)
- 0,2M TE (0,2M Tris, 10mM EDTA, pH 8,0)
- 10% SDS (Sigma, L 5422)
- Proteinase K (Biometra, 210-706 oder Merck)
- Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Biometra, 210-883)
- Chloroform (Sigma, C 2432)
- Microco-30 (Millipore, 42410)
- Ultrafree MC 0,2µm (Millipore, UFC GV25)
- ddH<sub>2</sub>O
- Einmalskalpellklingen
- Filterspitzen (100 und 1000 µl)
- Eppendorffzentrifuge
- Wasserbad, Wärmeblock oder Brutschrank

### 2.2.1.2 Versuchsprotokoll

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung des Gewebes. Dazu wurde die Oberfläche des Paraffinblockes mit o-Xylol gereinigt. Nachdem einige Tropfen Mineralöl aufgetropft wurden, wurde das Gewebe mit einer Skalpellklinge abgeschabt. Nun wurden die Gewebespäne in ein Eppendorfgefäß mit 1200 $\mu$ l o-Xylol versetzt und für ca. zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch bei einer Geschwindigkeit von 13.000 Umdrehungen pro Minute (U/M) für die Dauer von fünf Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Xylol-Überstand abpipettiert und verworfen. Nachdem die letzten drei Schritte wiederholt wurden, wurde das Gewebepellet in 1200 $\mu$ l 100%-igem Ethanol resuspendiert und ca. zehn Minuten inkubiert. Das Gemisch wurde nun erneut bei einer Geschwindigkeit von 13.000 U/M insgesamt für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Anschließend wurden die letzten beiden Schritte nun mit 70%-igem Ethanol wiederholt. Der Überstand wurde erneut abpipettiert und verworfen. Das offene Eppendorfgefäß wurde bei 50°C solange inkubiert, bis das Ethanol verdunstet war.

Nachdem die DNS erfolgreich aus dem Paraffinblock extrahiert wurde, erfolgte der Verdau der DNS mit einer Protease. Hierzu wurde zu dem Pellet 280 $\mu$ l 0,2M TE, 40 $\mu$ l 10% SDS und 80 $\mu$ l Proteinase-K Stammlösung (20mg/ml) mit einer Endkonzentration von 4mg/ml hinzugefügt. Das Gemisch wurde über Nacht bei 50°C im Wasserbad oder Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag folgte dann die Aufreinigung der DNS. Zu diesem Zweck wurde das verdaute Gewebe mit 380 $\mu$ l Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol in die untere Phase versetzt und fünf bis zehn Minuten im Eppendorfgefäß ausgeschüttelt. Danach wurde das Gemisch fünf Minuten bei 13.000 U/M Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde die obere wässrige Phase, die die DNS enthält, vorsichtig in ein TEBU Phaselock Tube pipettiert und dieses Mal mit 380 $\mu$ l Chloroform versetzt und für fünf Minuten ausgeschüttelt und danach für weitere fünf Minuten bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Nun musste die obere Phase aufgenommen werden und in einen Microcon-30 Konzentrator pipettiert werden, bevor sie für zwölf Minuten mit einer Geschwindigkeit von 14.000 U/M zentrifugiert werden konnte. Nun wurde der auf den Kopf gestellte Konzentrator in ein neues Eppendorfgefäß plziert, und es wurde 40 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O zugeben. Dieses Gemisch wurde mit einer Geschwindigkeit von 3.500 U/M sechs Minuten lang zentrifugiert. Das Zentrifugat sollte nun durch eine Ultrafree-MC Millipore-Filter (0,22 $\mu$ m) zentrifugiert werden (40



Sekunden bei 14.000 U/M). Die gereinigte DNS war im Zentrifugat. Abschließend erfolgte eine DNS-Konzentrationsbestimmung. Die DNS konnte nun bei -20°C gelagert werden.

### **2.2.2 Quantifizierung von Plaques, Tangles und Mikroglia**

In vorangegangenen Untersuchungen (Egensperger et al., 1998) wurde an Schnitten der Gewebeproben eine quantitative Analyse der Anzahl und der Fläche von Plaques, neuritischen Plaques (NP), und aktivierter Mikroglia (CR3), sowie von neurofibrillären Tangles (NFT) im Temporal- und im Frontalhirn durchgeführt.

Die Schnitte wurden für die Detektion von Plaques und neuritischen Plaques und den neurofibrillären Tangles immunhistochemisch mit  $\beta$ A4-, PHF-tau- und tau-Antikörpern behandelt und gefärbt. Um aktivierte mikrogliale Zellen sichtbar zu machen, wurde der CR3/43 Antikörper verwendet. Dieser Antikörper bindet an alle Produkte der MHC Klasse II Gene HLA-DR, -DQ und -DP und wird als Marker für aktivierte Mikroglia von in Paraffin eingebettetem menschlichem Hirngewebe benutzt.

Die Schnitte wurden mit dem Computer-basierten Bildverarbeitungssystem Optimas (Version 5.1, Optimas Corporation, Seattle, Washington) hinsichtlich der Anzahl und der Fläche CR3/43 gefärbter Mikroglia,  $\beta$ A4 immunoreaktiver Plaques und  $\beta$ A4/ tau-positiver neuritischer Plaques (NP), sowie der Anzahl von NFT analysiert. Die Fläche, die der Analyse der Anzahl der aktivierten Mikroglia, NFT und den NP zu Grunde liegt, beträgt 1,08 mm<sup>2</sup> (0,90 x 1,20 mm) und 2,48 mm<sup>2</sup> (1,38 x 1,80 mm) für die  $\beta$ A4-positiven Plaques.

Die Verteilung der Werte dieser Variablen wurde in Abhängigkeit des T-Allels mit dem Mann-Whitney Test (Kap. 2.3) analysiert. Dazu wurden die 19 Fälle in 12 mit dem C/C Genotyp (T-) und in 7 mit dem C/T, bzw. T/T Genotyp (T+) unterteilt.

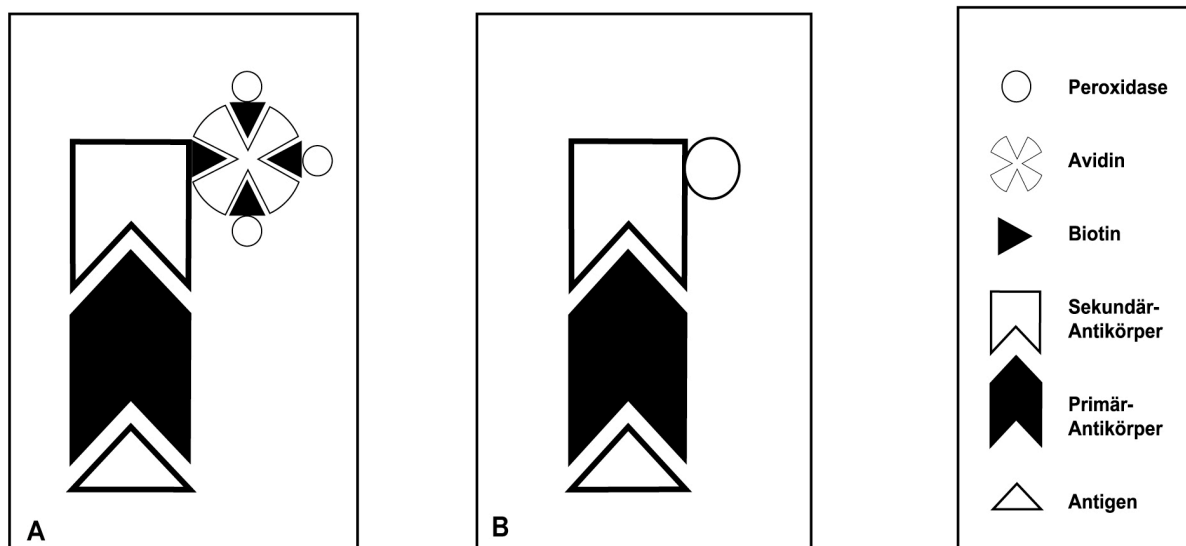
### **2.2.3 Immunhistochemie**

Mit Hilfe der Immunhistochemie kann das Vorkommen und die Verteilung von Eiweißen in konserviertem Gewebe nachgewiesen und beurteilt werden. Dabei wird das Prinzip der spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung genutzt. Es lassen sich auch mehrere unterschiedliche Eiweiße in einem Präparat nachweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Erstfärbung von Cathepsin D mit der Avidin-Biotin Methode durchgeführt.

Dazu wurde das Gewebe in einem ersten Schritt mit einem Primär-Antikörper behandelt, der eine spezifische Region des gesuchten Proteins erkennt und daran bindet. In

dem darauf folgenden Schritt wurde ein Sekundär-Antikörper dazugegeben, der wiederum an den ersten Antikörper bindet. An diesen Sekundär-Antikörper ist ein Molekül des Vitamins Biotin konjugiert. Abschließend inkubierte man das Präparat mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex. Gab man nun einen Farbstoff hinzu, so setzte die Peroxidase ihn in einer chemischen Reaktion in Farbe um. So wurden bei entsprechender Vorbehandlung nur die Stellen im Gewebe sichtbar, an denen sich der beschriebene Antigen-Antikörper Komplex befand.

Für die Zweitfärbung mit  $\beta$ A4 wurde die indirekte Methode benutzt. Dazu wurde nach Inkubation eines Primär-Antikörpers ein Peroxidase-konjugierter Sekundär-Antikörper hinzugefügt. Die Farbreaktion erfolgte wie oben beschrieben mit einem andersfarbigen Chromogen (Bourne, 1983) (s.Abb. 8).



**Abb.8:** Immunhistochemie. **A:** Avidin-Biotin Methode als Erstfärbung für Cathepsin D. **B:** Indirekte Methode als Zweitfärbung für  $\beta$ A4. Erläuterungen im Text.

### 2.2.3.1 Versuchsmaterialien

- Brutschrank
- Objektträger
- Deckgläser
- „Kleber“
- Puderfreie Einmal-Latex-Handschuhe (SafeSkin)
- Xylol
- N-tert-Butyl

- 
- Ameisensäure, 98-100 %
  - Ethanol
  - Methanol
  - Puffer Phosphate Buffered Saline (PBS: 0,01 M, 0,9% NaCl, pH=7,5)
  - Puffer Tris Buffered Saline (TBS: 900ml NaCl (25,5g auf 3l Aqua dest.) und 100ml Tris-HCl, pH= 7,6)
  - Bovine Serum Albumine, 1% (BSA)
  - Schweine-Null-Serum (SOS)
  - Humanserum (HUS)
  - Strept-AB-Komplex
  - diaminobenzidin (DAB)
  - Vector Substrate Kit, Farbe blau
  - Primär-Antikörper (CatD, polyklonal: Dako,  $\alpha$ -Amyloid, monoklonal: Dako)
  - Sekundär-Antikörper (biotinyliert, polyklonal)
  - Sekundär-Antikörper (Peroxidase konjugiert, monoklonal)
  - dH<sub>2</sub>O
  - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 %

### 2.2.3.2 Versuchsprotokoll

Es wurden 19 Alzheimer-Fälle und 2 Kontrollen verwandt. Die Präparate stammten jeweils aus dem Frontal- und dem Temporallappen mit Hippokampus.

Nachdem die Schnitte einer Dicke von 10  $\mu\text{m}$  auf Objektträger aufgebracht worden waren, kamen sie für 30 Minuten bei einer Temperatur von 59°C in den Brutschrank, damit das Gewebe besser auf dem Objektträger haften konnte. Danach wurden die Präparate in einem Xylol-Bad entparaffiniert. In einer absteigenden Alkoholreihe wurde dann dem Gewebe Wasser zugeführt.

Zwei Gegebenheiten stören die korrekte Auswertung dieses Versuchs durch eine unspezifische Hintergrundfärbung, wenn sie nicht vor dem weiteren Vorgehen beseitigt werden.

Zum einen betrifft dies die endogene Peroxidase-Aktivität. Die Umsetzung des Farbstoffes beruht auf einer Reaktion mit der Peroxidase. Dieses Enzym ist in jeder Körperzelle vorhanden, und es würde so bei Kontakt mit dem Chromogen eine generalisierte Färbung entstehen. Um dies zu vermeiden wurde das Präparat durch den Zusatz einer 1%-igen Wasserstoffperoxid-Methanol Lösung behandelt, und die gewebsständige Peroxidase wurde auf diesem Weg verbraucht.

Zum anderen bieten Bindegewebsstrukturen, wie beispielsweise das Kollagen, eine Angriffsfläche für den Primär-Antikörper, was zu einer generalisierten Bindung führt. Behandelt man das Präparat jedoch zuvor mit einem unspezifischen Antikörper, so deckt er diese „störenden“ antigenen Strukturen ab. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Gewebeschnitte deshalb für 30 Minuten mit einer Lösung aus Schweine-Null-Serum (SOS) und TBS inkubiert (1:50).

Daran anschließend wurde der CatD Primär-Antikörper (Fa. Dako, polyklonal, 1:2.400 in 1% BSA) aufgetragen. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Am nächsten Tag wurde der biotinylierte Sekundär-Antikörper (polyklonal, 1:100, 5% HUS, TBS) aufgetragen und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach den ersten 30 Minuten wurde der Avidin-Biotin-Komplex (Strept-AB-Komplex) für die Dauer von weiteren 30 Minuten nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers angesetzt. Nach Ablauf der 60minütigen Inkubationszeit mit dem Sekundär-

Antikörper konnten die Präparate nun für 30 Minuten mit dem Strept-AB-Komplex behandelt werden. Im Anschluss daran erfolgte die Färbung mit DAB in braun.

Für die nun folgende Zweitfärbung musste das Gewebe dem  $\beta$ -Amyloid Primär-Antikörper erst zugänglich gemacht werden. Erreicht wurde das mit einem zweiminütigen Bad in 98-100 %-iger Ameisensäure. Danach konnte der Primär-Antikörper (Fa. Dako, monoklonal, 1:100 in BSA 1%) aufgetragen werden. Die Inkubationszeit betrug 60 min bei Raumtemperatur.

Die Schnitte wurden daraufhin ebenfalls für 60 Minuten mit dem Sekundär-Antikörper (monoklonal, Peroxidase-konjugiert, 1:60 in Hus 5 %, TBS) bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach abschließender Färbung mit dem Vector Substrate Kit in blau konnten die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und eingedeckelt werden.

Zwischen jedem Schritt wurden die Schnitte jeweils drei mal fünf Minuten in TBS-Puffer gewaschen, außer nach der Behandlung mit Schweine-Null-Serum.

### 2.3 Statistik

Zur Analyse von Häufigkeitsunterschieden des CatD und des APOE-Genotyps, bzw. der Allelfrequenzen wurde der Chi<sup>2</sup>-Test nach Pearson verwendet. Mit ihm wird die Hypothese geprüft, ob zwei oder mehrere Merkmale unabhängig voneinander auftreten (sog. Nullhypothese) oder abhängig voneinander auftreten (sog. Alternativhypothese). Die Nullhypothese lautet: Es besteht kein Zusammenhang zwischen dem CatD 224C→T Polymorphismus und Morbus Alzheimer. Die Nullhypothese wird verworfen, wenn der zweiseitige asymptotische Signifikanzwert < 5% beträgt. In diesem Fall würde die Alternativhypothese angenommen, dass doch ein Zusammenhang besteht.

Zur Berechnung des Risikos eines Merkmals an Morbus Alzheimer zu erkranken, wurde die Odds Ratio (OR) mit dem dazugehörigen 95% Konfidenzintervall (KI) ermittelt. Die OR ist der Quotient aus dem Risiko, als Träger des CatD T-Allels an der Alzheimerschen Krankheit erkrankt zu sein, und dem Risiko, als Nicht-Träger erkrankt zu sein. Die Berechnung des 95% KI ermöglicht die Aussage darüber, innerhalb welchen Bereiches das ermittelte Ergebnis mit einer 95%-igen Wahrscheinlichkeit mit derjenigen der Grundgesamtheit übereinstimmt.

Um den Einfluss mehrerer Variablen auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit von Morbus Alzheimer zu untersuchen, wurde die multiple logistische Regressionsanalyse verwendet. Als unabhängige Variablen wurden die binär codierten Faktoren, Geschlecht und APOE 4-Allel, sowie das Alter gewählt. Abhängige Variable war die Diagnose Alzheimer. Außerdem wurden die einfachen Wechselwirkungen zwischen CatD T mit den übrigen Prädiktoren berechnet. Methode war simultaner Einschluss aller Prädiktoren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit interessierte die Frage, ob das Vorhandensein, bzw. Nicht-Vorhandensein des CatD T-Allels einen Einfluss auf die wesentlichen neuropathologischen Veränderungen der Alzheimerschen Krankheit hat. Hierzu wurde der Mann-Whitney Test verwendet. Er testet, ob die Verteilungen zwischen zwei Grundgesamtheiten übereinstimmen und erlaubte in der vorliegenden Untersuchung eine Aussage über signifikante Verteilungsunterschiede der Fläche und der Anzahl von  $\beta$ A4-positiven Plaques,  $\beta$ A4/tau-positiven neuritischen Plaques und aktivierter Mikroglia, sowie der Anzahl von neurofibrillären Tangles zwischen Trägern und Nicht-Trägern des CatD T-Allels.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Klinisch diagnostizierte Fälle

Es wurde die Hypothese getestet, dass der CatD 224C→T Polymorphismus einen Risikofaktor bei Morbus Alzheimer darstellt. Gesucht wurde nach einem signifikanten Unterschied in der Verteilung des T-Allels bei Alzheimer-Patienten im Vergleich zu Kontrollfällen.

Hierzu wurden 186 klinisch diagnostizierte Alzheimer-Patienten und 247 Kontrollen genotypisiert, von denen 191 gesunde und 56 neurologische Kontrollen waren. Danach wurde die Verteilung des CatD-Genotyps und der Allelfrequenzen verglichen. Es wurde die Verteilung in den vier Altersstufen bis 60, 61-70, 71-80 und über 81 Jahre mit dem  $\chi^2$ -Test nach Pearson analysiert, um einen möglichen altersabhängigen Effekt auf zu spüren (Kap.3.1.1; 3.1.2).

Für das Erkrankungsrisiko für CatD T-Allelträger an Morbus Alzheimer zu erkranken, wurde die Odds Ratio (OR) mit dem dazugehörigen 95%-Konfidenzintervall (KI) ermittelt (3.1.4).

Das APOE 4-Allel gilt bislang als einziger replikabler und valider genetischer Suszeptibilitätsfaktor bei Morbus Alzheimer. Um eine mögliche Interaktion zwischen dem CatD- und APOE-Genotyp zu berücksichtigen, wurde der CatD-Genotyp daher in Abhängigkeit des APOE 4-Allels untersucht (Kap. 3.1.3).

Variablen wie das Alter und das Geschlecht können eine komplexe und nicht voraus-sagbare Interaktion mit Genen eingehen. Deshalb wurde eine logistische Regressionsana-lyse für das Alter, das Geschlecht und das APOE 4-Allel durchgeführt, um solche Zusam-menhänge zu erkennen (Kap. 3.1.5).

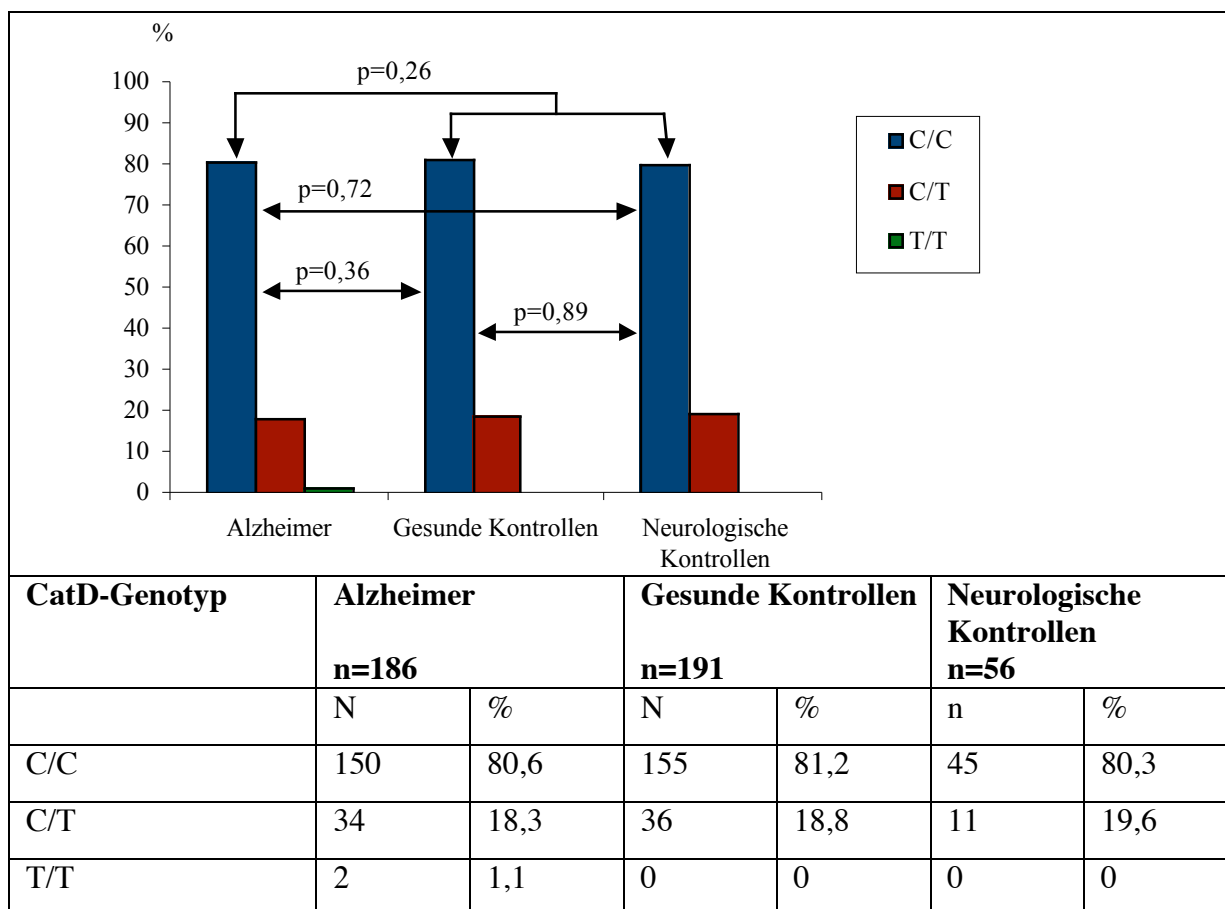
### 3.1.1 Verteilung des Cathepsin D-Genotyps

#### 3.1.1.1 Cathepsin D-Genotyp in allen Altersstufen

Die drei möglichen Allelkombinationen des CatD-Gens C/C, C/T, T/T verteilten sich auf die insgesamt 433 Probanden aller Altersstufen wie folgt: Von 186 Alzheimer-Patienten kam bei 150 die Allelkombination C/C (80,6%), bei 34 C/T (18,3%) und bei 2 T/T (1,1%) vor. Von den 191 gesunden Kontrollen lag bei 155 C/C (81,2%) und bei 36 C/T (18,8%) vor. Von 56 neurologischen Kontrollfällen kam bei 45 C/C (80,3%) und bei 11 C/T (19,6%) vor.

Die Analyse der Genotypverteilung mit dem Chi<sup>2</sup>-Test nach Pearson bei den Alzheimer-Patienten gegenüber allen Kontrollen ergab einen Wert von 2,69 ( $p=0,26$ ), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen 2,07 ( $p=0,36$ ), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den neurologischen Kontrollen 0,65 ( $p=0,72$ ) und bei den Kontrollen untereinander 0,02 ( $p=0,89$ ).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede.



**Abb.9:** Die Verteilung des CatD-Genotyps in allen Altersstufen zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen M. Alzheimer, gesunden Kontrollen und neurologischen Kontrollen.

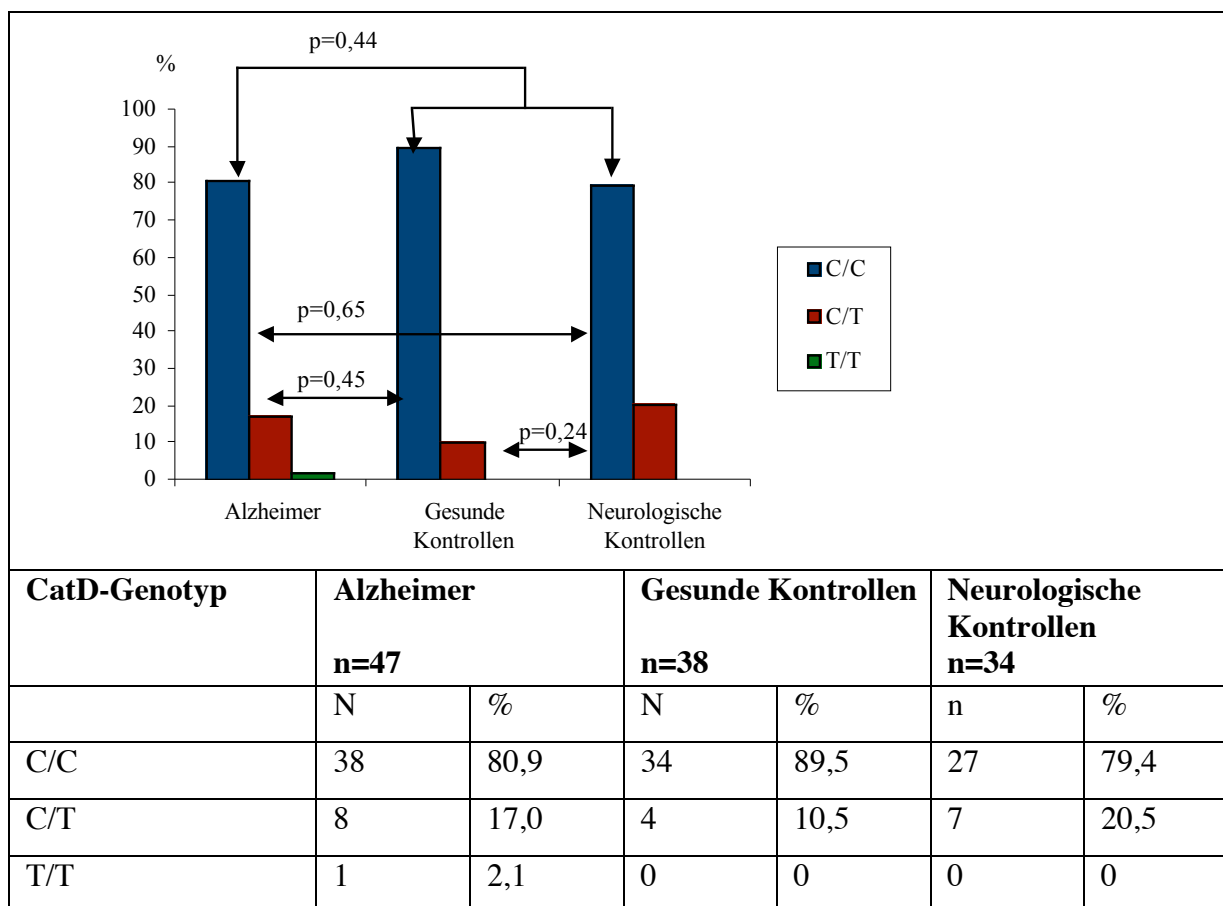


### 3.1.1.2 Cathepsin D-Genotyp in der Altersstufe bis 60 Jahre

Die drei möglichen Allelkombinationen des CatD-Gens C/C, C/T, T/T verteilten sich auf die insgesamt 119 Probanden in der Altersstufe bis 60 Jahre wie folgt: Von 47 Alzheimer-Patienten kam bei 38 die Allelkombination C/C (80,9%), bei 8 C/T (17,0%) und bei 1 T/T (2,1%) vor. Von den 38 gesunden Kontrollen lag bei 34 C/C (89,5%) und bei 4 C/T (10,5%) vor. Von 34 neurologischen Kontrollfällen kam bei 27 C/C (79,4%) und bei 7 C/T (20,5%) vor.

Die Analyse der Genotypverteilung mit dem Chi<sup>2</sup>-Test nach Pearson bei den Alzheimer-Patienten gegenüber allen Kontrollen ergab einen Wert von 1,64 (p=0,44) bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen 1,62 (p=0,45), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den neurologischen Kontrollen 0,86 (p=0,65) und bei den Kontrollen untereinander 1,4 (p=0,24).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede.



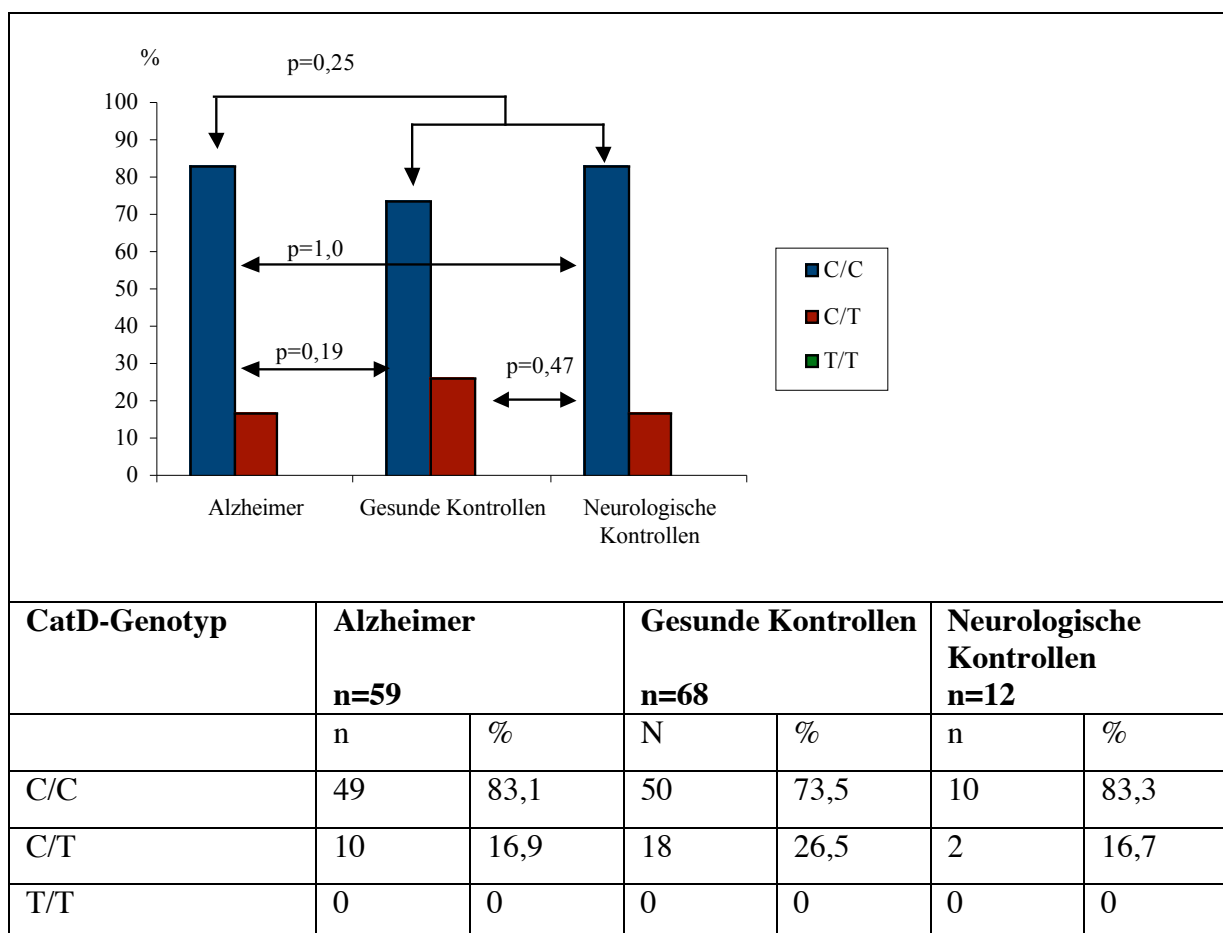
**Abb.10:** Die Verteilung des CatD-Genotyps in der Altersstufe bis 60 Jahre zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen M. Alzheimer, gesunden Kontrollen und neurologischen Kontrollen.

### 3.1.1.3 Cathepsin D-Genotyp in der Altersstufe 61-70 Jahre

Die drei möglichen Allelkombinationen des CatD-Gens C/C, C/T, T/T verteilten sich auf die insgesamt 139 Probanden der 61 bis 70-jährigen wie folgt: Von 59 Alzheimer-Patienten kam bei 49 die Allelkombination C/C (83,1%) und bei 10 C/T (16,9%) vor. Von den 68 gesunden Kontrollen lag bei 50 C/C (73,5%) und bei 18 C/T (26,5%) vor. Von 12 neurologischen Kontrollfällen kam bei 10 C/C (83,3%) und bei 2 C/T (16,7%) vor.

Die Analyse der Genotypverteilung mit dem Chi<sup>2</sup>-Test nach Pearson bei den Alzheimer-Patienten gegenüber allen Kontrollen ergab einen Wert von 1,3 ( $p=0,25$ ), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen 1,67 ( $p=0,19$ ), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den neurologischen Kontrollen 0,001 ( $p=1,0$ ) und bei den Kontrollen untereinander 0,52 ( $p=0,47$ ).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede.



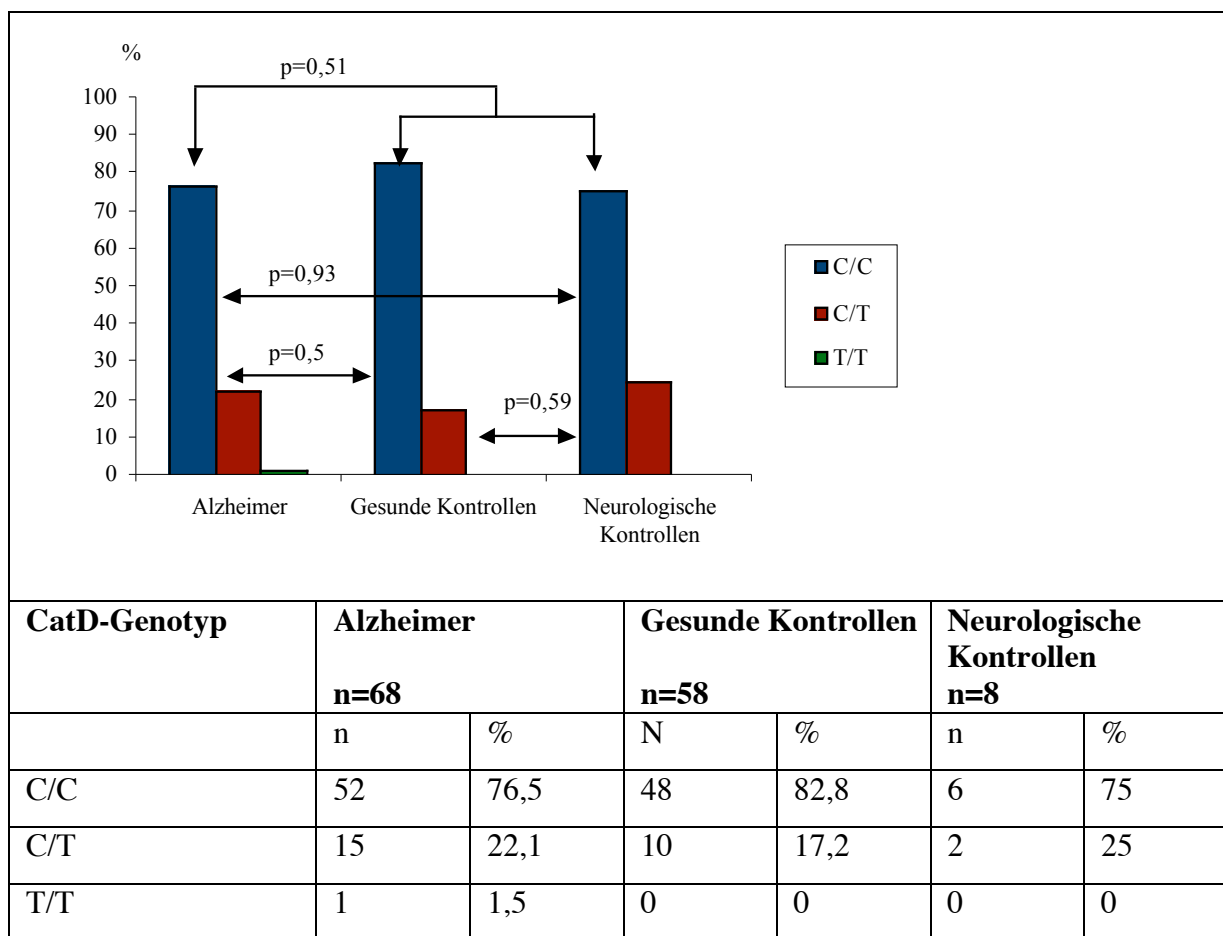
**Abb. 11:** Die Verteilung des CatD-Genotyps in der Altersstufe 61-70 Jahre zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen M. Alzheimer, gesunden Kontrollen und neurologischen Kontrollen.

### 3.1.1.4 Cathepsin D-Genotyp in der Altersstufe 71-80 Jahre

Die drei möglichen Allelkombinationen des CatD-Gens C/C, C/T, T/T verteilten sich auf die insgesamt 134 Probanden der 71 bis 80-jährigen wie folgt: Von 68 Alzheimer-Patienten kam bei 52 die Allelkombination C/C (76,5%) bei 15 C/T (22,1%) und bei 1 T/T (1,5%) vor. Von den 58 gesunden Kontrollen lag bei 48 C/C (82,8%) und bei 10 C/T (17,2%) vor. Von 8 neurologischen Kontrollfällen kam bei 6 C/C (75%) und bei 2 C/T (25%) vor.

Die Analyse der Genotypverteilung mit dem Chi<sup>2</sup>-Test nach Pearson bei den Alzheimer-Patienten gegenüber allen Kontrollen ergab einen Wert von 1,34 (p=0,51), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen 1,38 (p=0,5), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den neurologischen Kontrollen 0,15 (p=0,93) und bei den Kontrollen untereinander 0,28 (p=0,59).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede.



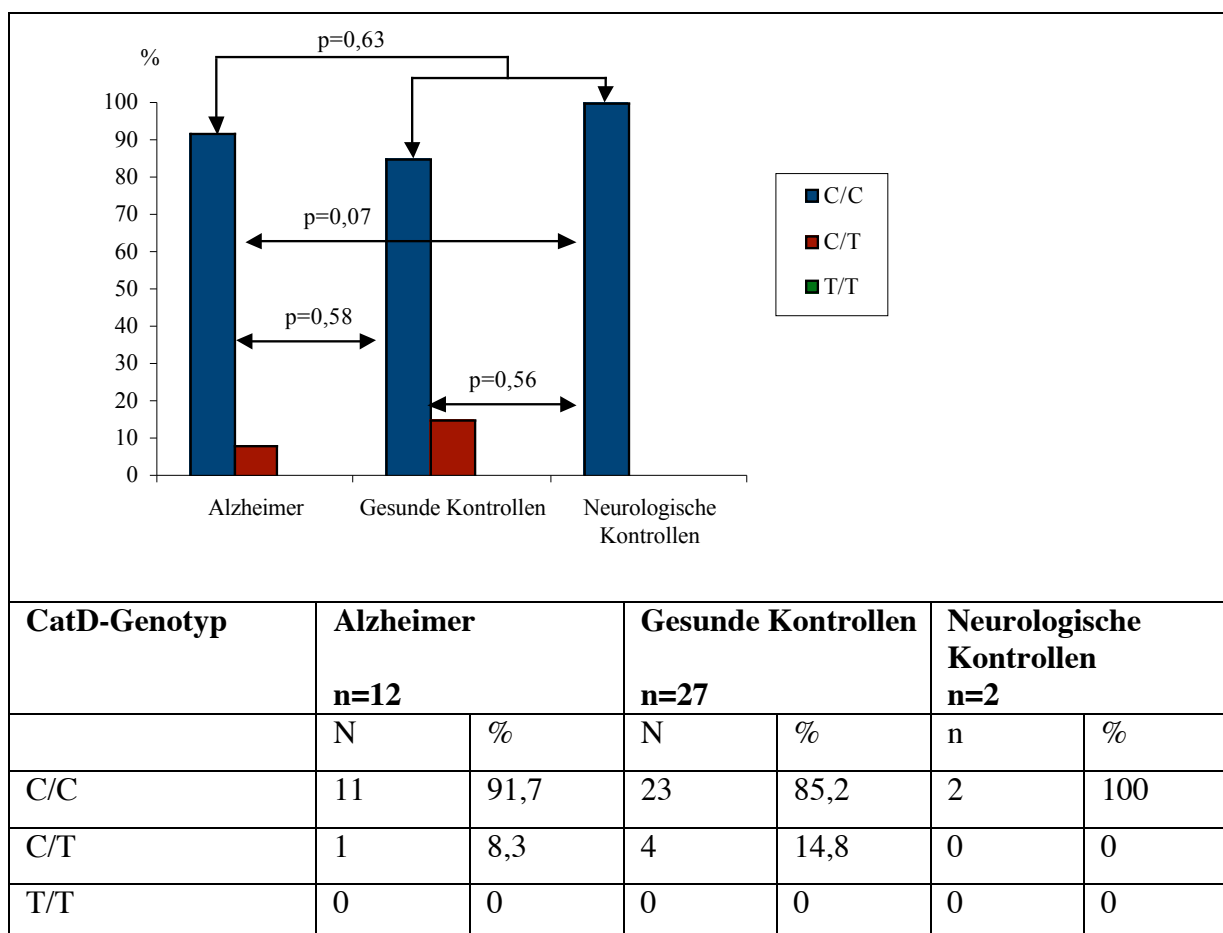
**Abb. 12:** Die Verteilung des CatD-Genotyps in der Altersstufe 71-80 Jahre zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen M. Alzheimer, gesunden Kontrollen und neurologischen Kontrollen.

### 3.1.1.5 Cathepsin D-Genotyp in der Altersstufe über 81 Jahre

Die drei möglichen Allelkombinationen des CatD-Gens C/C, C/T, T/T verteilten sich auf die insgesamt 41 Probanden über 81-jährigen wie folgt: Von 12 Alzheimer-Patienten kam bei 11 die Allelkombination C/C (91,7%) und bei 1 C/T (8,3%) vor. Von den 27 gesunden Kontrollen lag bei 23 C/C (85,2%) und bei 4 C/T (14,8%) vor. Von 2 neurologischen Kontrollfällen kam bei beiden C/C (100%) vor.

Die Analyse der Genotypverteilung mit dem Chi<sup>2</sup>-Test nach Pearson bei den Alzheimer-Patienten gegenüber allen Kontrollen ergab einen Wert von 0,24 (p=0,63), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen 0,31 (p=0,58), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den neurologischen Kontrollen 0,18 (p=0,07) und bei den Kontrollen untereinander 0,34 (p=0,56).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 13:** Die Verteilung des CatD-Genotyps in der Altersstufe über 81 Jahre zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen M. Alzheimer, gesunden Kontrollen und neurologischen Kontrollen.

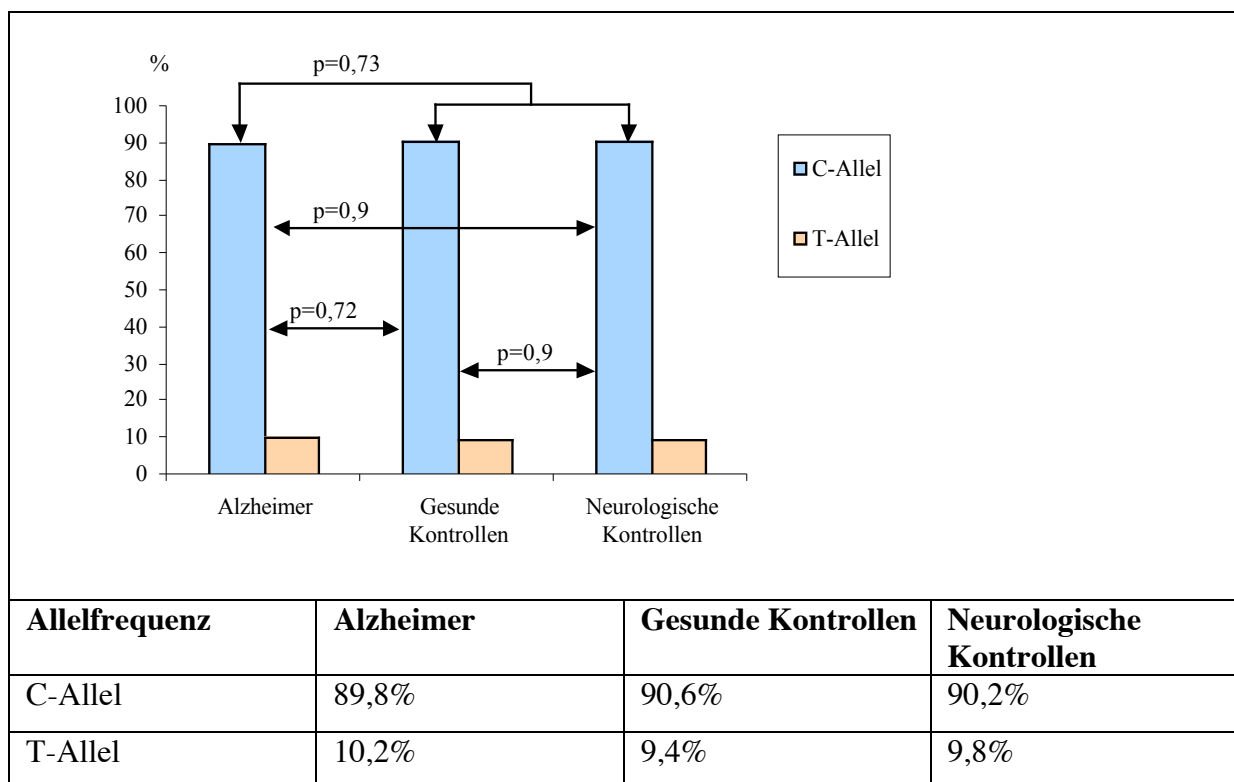
### 3.1.2 Verteilung der Cathepsin D-Allelfrequenzen

#### 3.1.2.1 Cathepsin D-Allelfrequenzen in allen Altersstufen

Bei den insgesamt 433 Probanden kam das C-Allel bei Alzheimer-Patienten mit einer Häufigkeit von 89,8%, bei den gesunden Kontrollen von 90,6% und den neurologischen Kontrollen von 90,2% vor. Für das T-Allel ergaben sich die Werte für Alzheimer-Patienten mit 10,2%, für die gesunden Kontrollen mit 9,4% und für die neurologischen Kontrollen mit 9,8%.

Die Analyse der Allelfrequenzen mit dem Chi<sup>2</sup>-Test nach Pearson bei den Alzheimer-Patienten gegenüber allen Kontrollen ergab einen Wert von 0,12 ( $p=0,73$ ), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen 0,13 ( $p=0,72$ ), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den neurologischen Kontrollen 0,02 ( $p=0,9$ ) und bei den Kontrollen untereinander 0,02 ( $p=0,9$ ).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede.



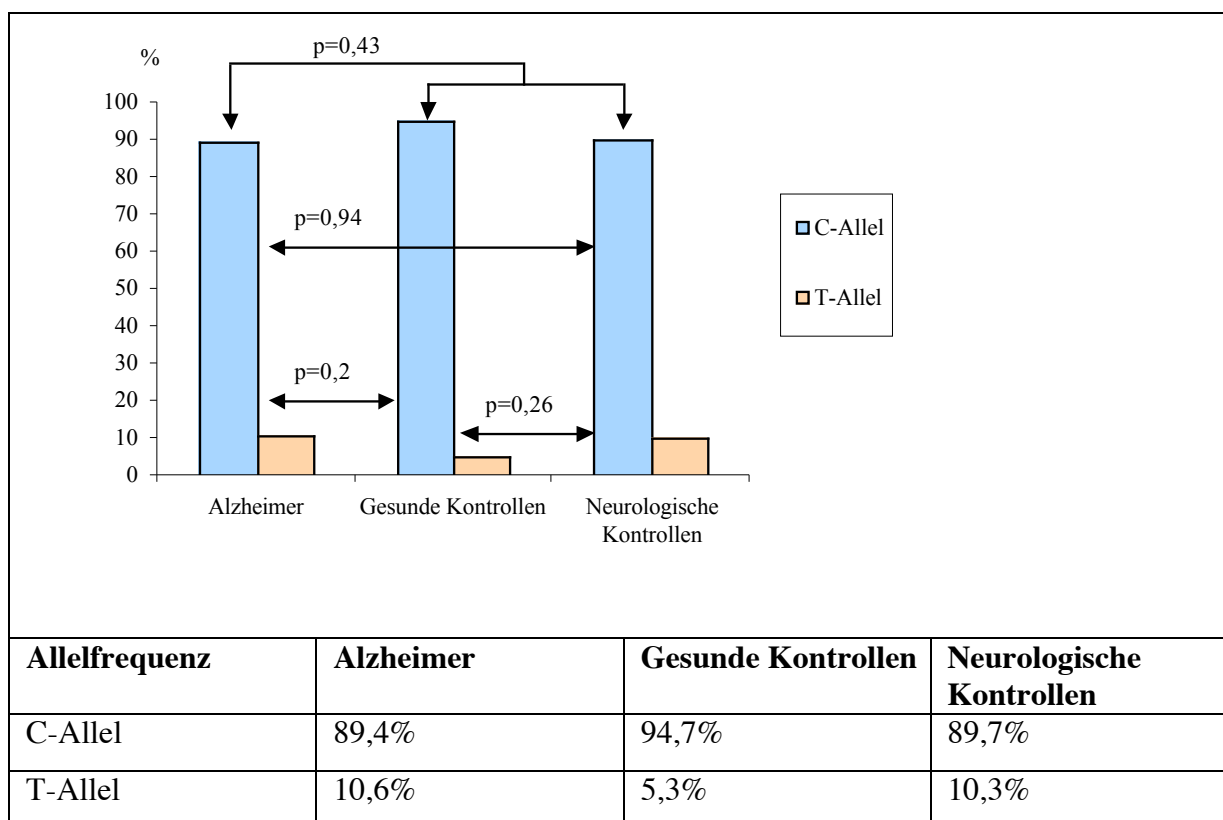
**Abb. 14:** Die Verteilung der Allelfrequenzen des Cathepsin D-Gens in allen Altersstufen zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen M. Alzheimer, gesunden Kontrollen und neurologischen Kontrollen.

### 3.1.2.2 Cathepsin D-Allelfrequenzen in der Altersstufe bis 60 Jahre

Bei den insgesamt 119 Probanden der bis einschließlich 60 Jahre alten Probanden kam das C-Allel bei Alzheimer-Patienten mit einer Häufigkeit von 89,4%, bei den gesunden Kontrollen von 94,7% und den neurologischen Kontrollen von 89,7% vor. Für das T-Allel ergaben sich die Werte für Alzheimer-Patienten mit 10,6%, für die gesunden Kontrollen mit 5,3% und für die neurologischen Kontrollen mit 10,3%.

Die Analyse der Allelfrequenzen mit dem  $\chi^2$ -Test nach Pearson bei den Alzheimer-Patienten gegenüber allen Kontrollen ergab einen Wert von 0,64 ( $p=0,43$ ), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen 1,6 ( $p=0,2$ ), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den neurologischen Kontrollen 0,005 ( $p=0,94$ ) und bei den Kontrollen untereinander 1,29 ( $p=0,26$ ).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede.



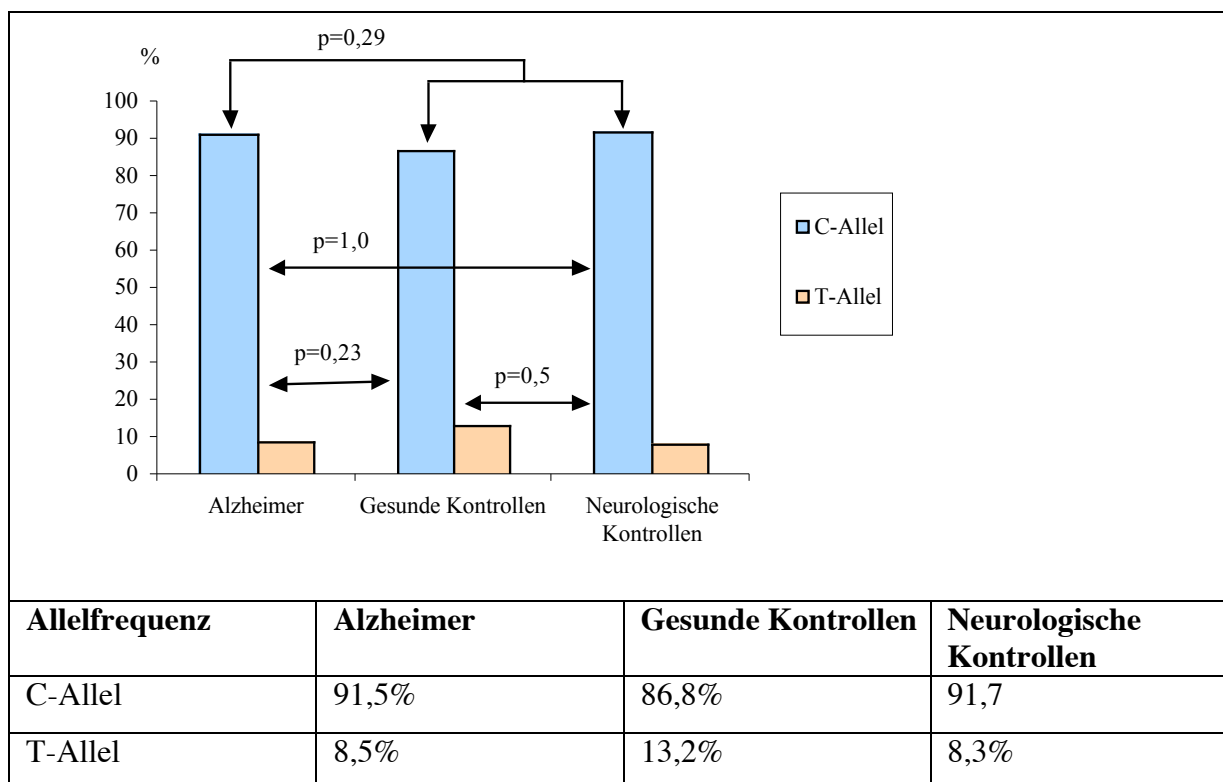
**Abb. 15:** Die Verteilung der Allelfrequenzen des Cathepsin D-Gens in der Altersstufe bis 60 Jahre zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen M. Alzheimer, gesunden Kontrollen und neurologischen Kontrollen.

### 3.1.2.3 Cathepsin D-Allelfrequenzen in der Altersstufe 61–70 Jahre

Bei den insgesamt 139 Probanden der Altersstufe 61 bis 70 Jahre kam das C-Allel bei Alzheimer-Patienten mit einer Häufigkeit von 91,5%, bei den gesunden Kontrollen von 86,8% und den neurologischen Kontrollen von 91,7% vor. Für das T-Allel ergaben sich die Werte für Alzheimer-Patienten mit 8,5%, für die gesunden Kontrollen mit 13,2% und für die neurologischen Kontrollen mit 8,3%

Die Analyse der Allelfrequenzen mit dem  $\chi^2$ -Test nach Pearson bei den Alzheimer-Patienten gegenüber allen Kontrollen ergab einen Wert von 1,15 ( $p=0,29$ ), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen 1,45 ( $p=0,23$ ), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den neurologischen Kontrollen 0,001 ( $p=1,0$ ) und bei den Kontrollen untereinander 0,45 ( $p=0,5$ ).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede.



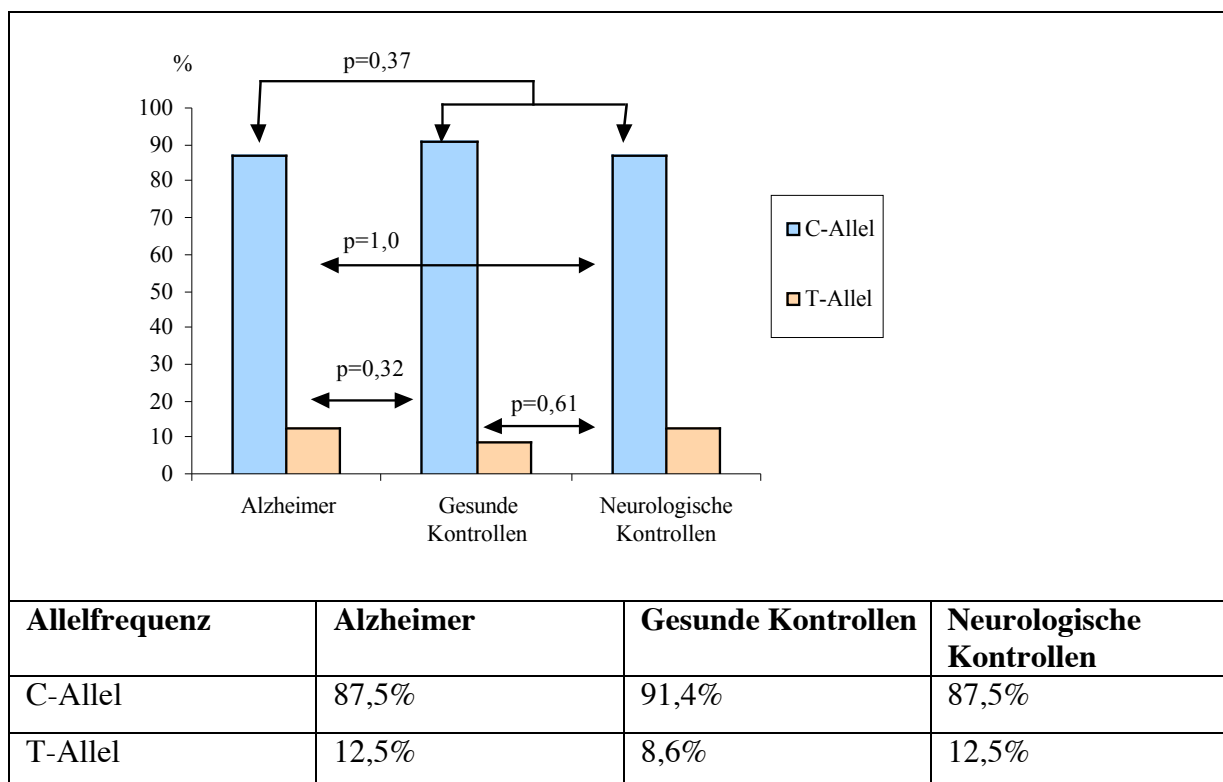
**Abb. 16:** Die Verteilung der Allelfrequenzen des Cathepsin D-Gens in der Altersstufe 61-70 Jahre zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen M. Alzheimer, gesunden Kontrollen und neurologischen Kontrollen.

### 3.1.2.4 Cathepsin D-Allelfrequenzen in der Altersstufe 71-80 Jahre

Bei den insgesamt 134 Probanden der Altersstufe 71 bis 80 Jahre kam das C-Allel bei Alzheimer-Patienten mit einer Häufigkeit von 87,5%, bei den gesunden Kontrollen von 91,4% und den neurologischen Kontrollen von 87,5% vor. Für das T-Allel ergaben sich die Werte für Alzheimer-Patienten mit 12,5%, für die gesunde Kontrollen mit 8,6% und für die neurologischen Kontrollen mit 12,5%.

Die Analyse der Allelfrequenzen mit dem  $\chi^2$ -Test nach Pearson bei den Alzheimer-Patienten gegenüber allen Kontrollen ergab einen Wert von 0,8 ( $p=0,37$ ) bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen 0,99 ( $p=0,32$ ), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den neurologischen Kontrollen 0,001 ( $p=1,0$ ) und bei den Kontrollen untereinander 0,26 ( $p=0,61$ ).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 17:** Die Verteilung der Allelfrequenzen des Cathepsin D-Gens in der Altersstufe 71-80 Jahre zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen M. Alzheimer, gesunden Kontrollen und neurologischen Kontrollen.

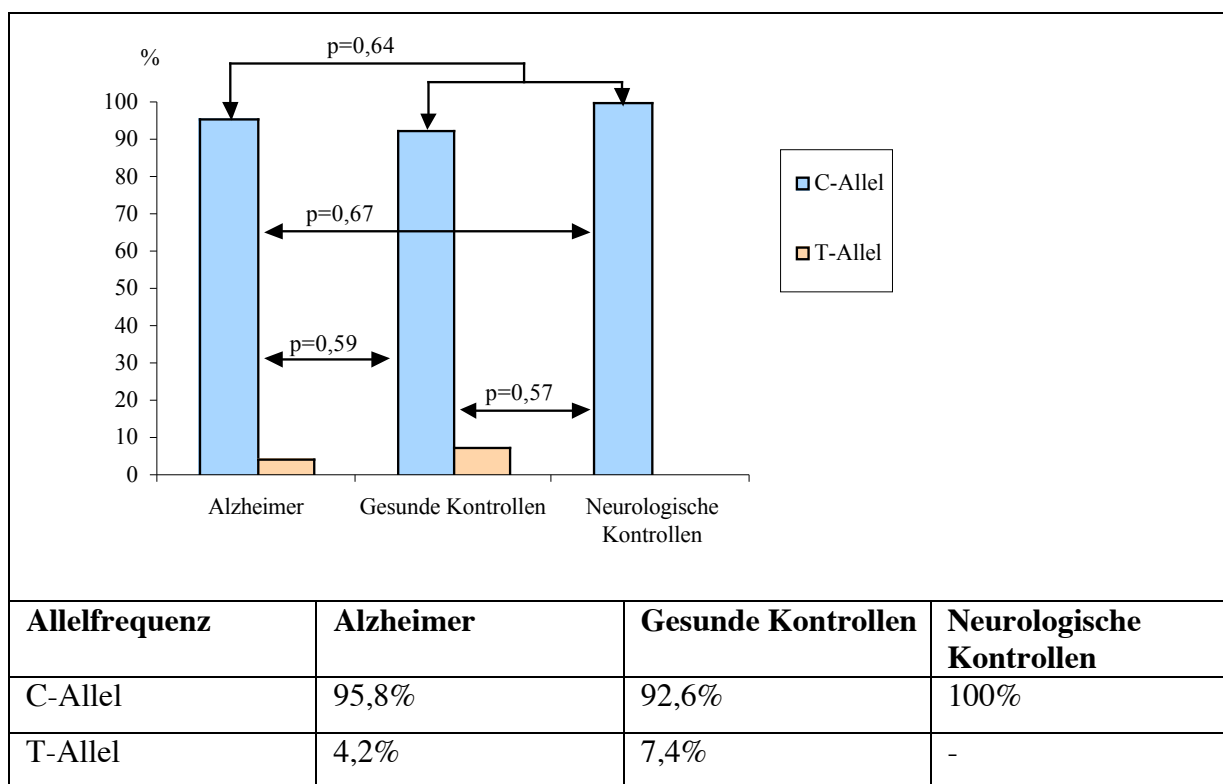


### 3.1.2.5 Cathepsin D-Allelfrequenzen in der Altersstufe über 81 Jahre

Bei den insgesamt 41 Probanden kam das C-Allel bei Alzheimer-Patienten mit einer Häufigkeit von 95,8%, bei den gesunden Kontrollen von 92,6% und den neurologischen Kontrollen von 100% vor. Für das T-Allel ergaben sich die Werte für Alzheimer-Patienten mit 4,2% und für die gesunden Kontrollen mit 7,4%.

Die Analyse der Allelfrequenzen mit dem Chi<sup>2</sup>-Test nach Pearson bei den Alzheimer-Patienten gegenüber allen Kontrollen ergab einen Wert von 0,22 ( $p=0,64$ ), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen 0,29 ( $p=0,59$ ), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den neurologischen Kontrollen 0,17 ( $p=0,67$ ) und bei den Kontrollen untereinander 0,32 ( $p=0,57$ ).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 18:** Die Verteilung der Allelfrequenzen des Cathepsin D-Gens in der Altersstufe über 81 Jahre zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen M. Alzheimer, gesunden Kontrollen und neurologischen Kontrollen.

### 3.1.3 Der APOE-Genotyp und Cathepsin D

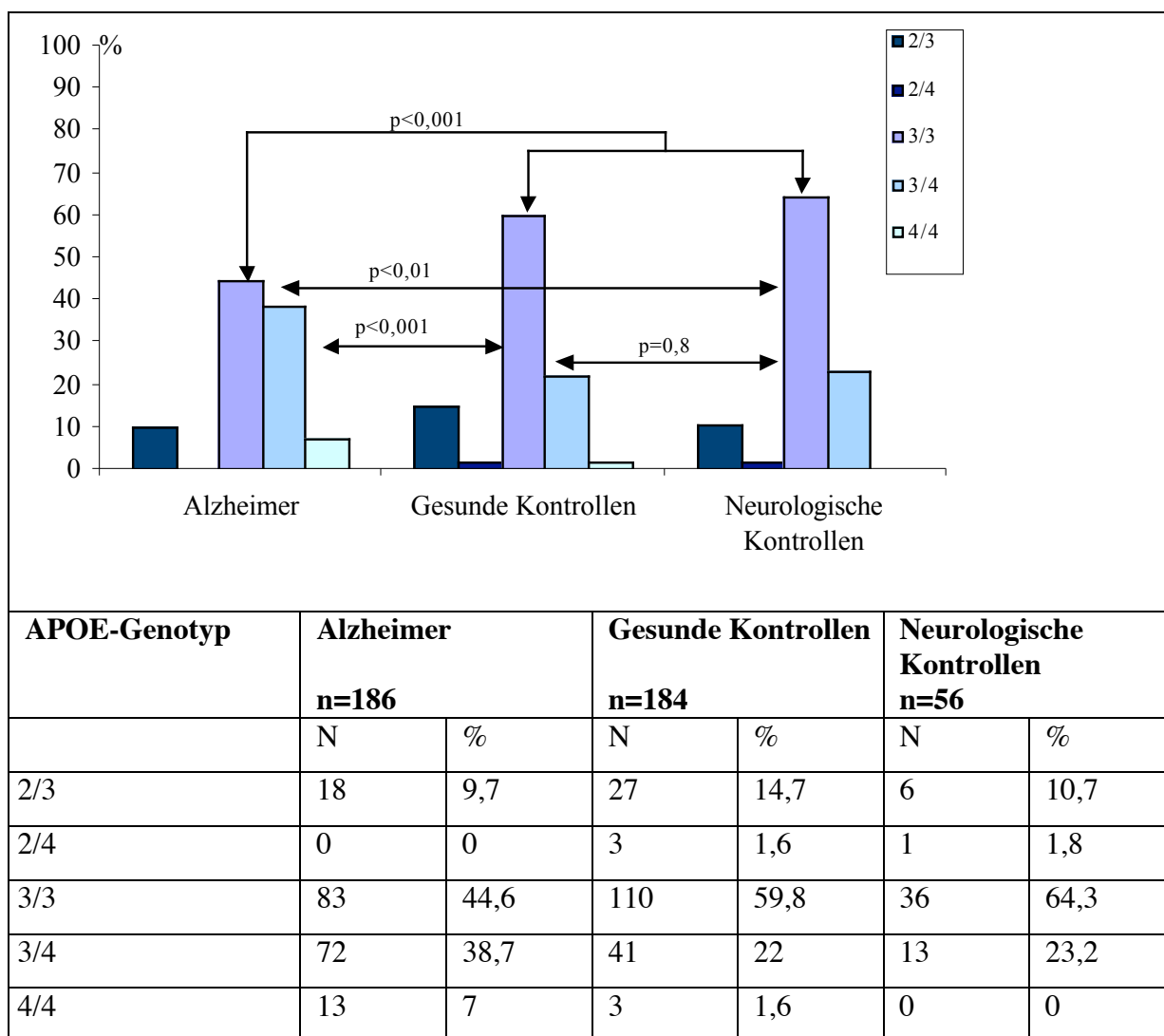
Da das APOE 4-Allel den bisher einzigen replizierbaren genetischen Suszeptibilitätsfaktor darstellt, ist es wichtig zu wissen, ob die Resultate der vorliegenden Arbeit durch den Effekt des APOE 4-Allels „überlagert“ werden. So wurde der Frage nachgegangen, ob sich das Risiko durch das CatD T-Allel an Morbus Alzheimer zu erkranken, in Abhängigkeit des APOE-Genotyps verändert. Zunächst wurde allein die Verteilung der APOE-Genotypen sowie der Allelfrequenzen bei Alzheimer Patienten, gesunden und neurologischen Kontrollen mit dem  $\chi^2$ -Test nach Pearson untersucht. Da das APOE 4-Allel das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken signifikant erhöht, wurden alle Probanden in eine Gruppe bei denen das APOE 4-Allel vorliegt und in eine zweite, bei denen das APOE 4-Allel nicht vorliegt unterteilt. Diese zwei Gruppen wurden wiederum nach Ihrem CatD-Genotyp unterteilt in eine Gruppe, in der das T-Allel vorliegt, sowie in eine zweite Gruppe, in der das CatD T-Allel nicht vorliegt. Die Verteilungshäufigkeiten zwischen Alzheimer Patienten, gesunden und neurologischen Kontrollen wurden hier wiederum mittels des  $\chi^2$ -Tests nach Pearson analysiert. Außerdem wurde das relative Risiko (Odds Ratio, Abk. OR) an Morbus Alzheimer zu erkranken für das APOE 4-Allel berechnet; sowie getrennt für das APOE 4-Allel und das CatD T-Allel, bzw. für das Nicht-Vorliegen des APOE 4-Allels bei gleichzeitigem Vorliegen des CatD T-Allels.

### 3.1.3.1 Verteilung des APOE-Genotyps

Die Genotypen des APOE-Gens 2/3, 2/4, 3/3, 3/4 und 4/4 verteilten sich auf insgesamt 426 Probanden aller Altersstufen wie folgt (s.Abb. 20): Von 186 Alzheimer-Patienten kam bei 18 die Allelkombination 2/3 (9,7%), bei 0 2/4 (0%), bei 83 3/4 (44,6%) und bei 13 4/4 (7%) vor. Von den 184 gesunden Kontrollen kam bei 27 2/3 (14,7%), bei 3 2/4 (1,6%), bei 110 3/3 (59,8%), bei 41 3/4 und bei 3 4/4 (1,6%) vor. Von 56 neurologischen Kontrollfällen kam bei 6 2/3 (10,7%), bei 1 2/4 (1,8%), bei 36 3/3 (64,3%), bei 13 3/4 (23,2%) und bei 0 4/4 (0%) vor.

Die Analyse der Allelfrequenzen mit dem  $\chi^2$ -Test nach Pearson bei den Alzheimer-Patienten gegenüber allen Kontrollen ergab einen Wert von 29,22 ( $p < 0,001$ ), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen von 23,32 ( $p < 0,001$ ), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den neurologischen Kontrollen von 13,61 ( $p < 0,01$ ) und bei den Kontrollen untereinander von 1,6 ( $p = 0,8$ ).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der Alzheimer-Fälle gegenüber den gesunden, den neurologischen sowie den Kontrollen insgesamt hinsichtlich des APOE-Genotyps. Kein signifikanter Unterschied wurde bei den Kontrollen untereinander beobachtet (Abb. 19).



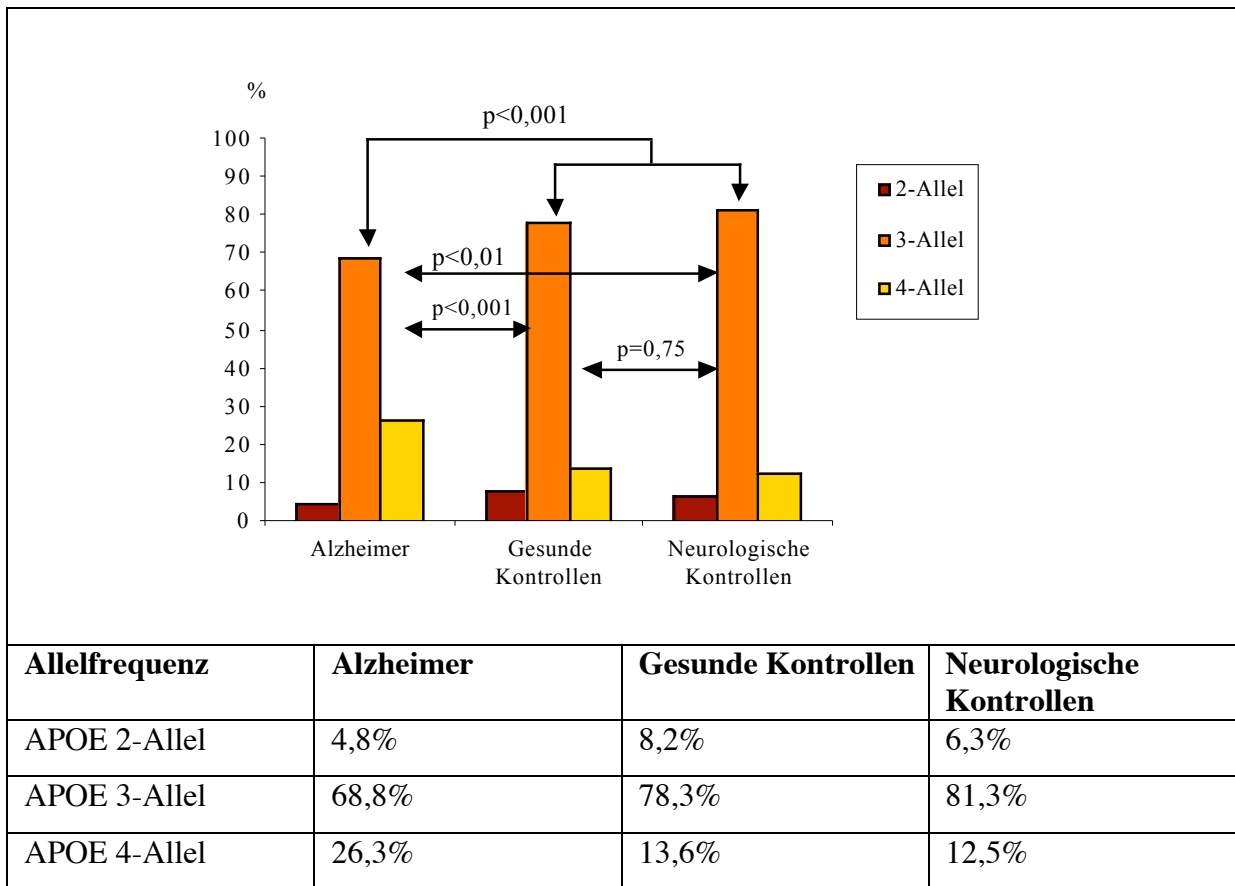
**Abb. 19:** Die Verteilung des APOE-Genotyps in allen Altersstufen bei Alzheimer Patienten, gesunden und neurologischen Kontrollen. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Verteilung zwischen den Alzheimer Patienten und den den Kontrollen, aber nicht zwischen den Kontrollen untereinander.

### 3.1.3.2 Verteilung der APOE-Allelfrequenzen

Bei insgesamt 426 Probanden kam das APOE 2-Allel bei Alzheimer-Patienten mit einer Häufigkeit von 4,8%, bei den gesunden Kontrollen von 8,2% und den neurologischen Kontrollen von 6,3% vor (s.Abb. 20). Für das APOE 3-Allel ergaben sich Werte für Alzheimer-Patienten mit 68,8%, für gesunde Kontrollen mit 7,4% und für neurologische Kontrollen mit 81,3%. Die APOE 4-Allelfrequenz verteilte sich auf die Alzheimer-Fälle mit 26,3%, auf gesunde Kontrollen mit 13,6% und auf neurologische Kontrollen mit 12,5%.

Die Analyse der Allelfrequenzen mit dem  $\chi^2$ -Test nach Pearson bei den Alzheimer-Patienten gegenüber allen Kontrollen ergab einen Wert von 24,22 ( $p < 0,001$ ), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen 24,22 ( $p < 0,001$ ), bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den neurologischen Kontrollen 9,32 ( $p = 0,009$ ) und bei den Kontrollen untereinander 0,58 ( $p = 0,75$ ).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der Alzheimer-Fälle gegenüber den gesunden, den neurologischen sowie den Kontrollen insgesamt. Kein signifikanter Unterschied wurde bei den Kontrollen untereinander beobachtet (Abb. 20).



**Abb. 20:** Die Verteilung der Allelfrequenzen des APOE-Gens in allen Altersstufen zeigt signifikante Unterschiede zwischen M. Alzheimer, gesunden Kontrollen und neurologischen Kontrollen, aber nicht zwischen den gesunden und den neurologischen Kontrollen.

### 3.1.3.3 Cathepsin D-Genotyp in Abhängigkeit des APOE 4-Allels

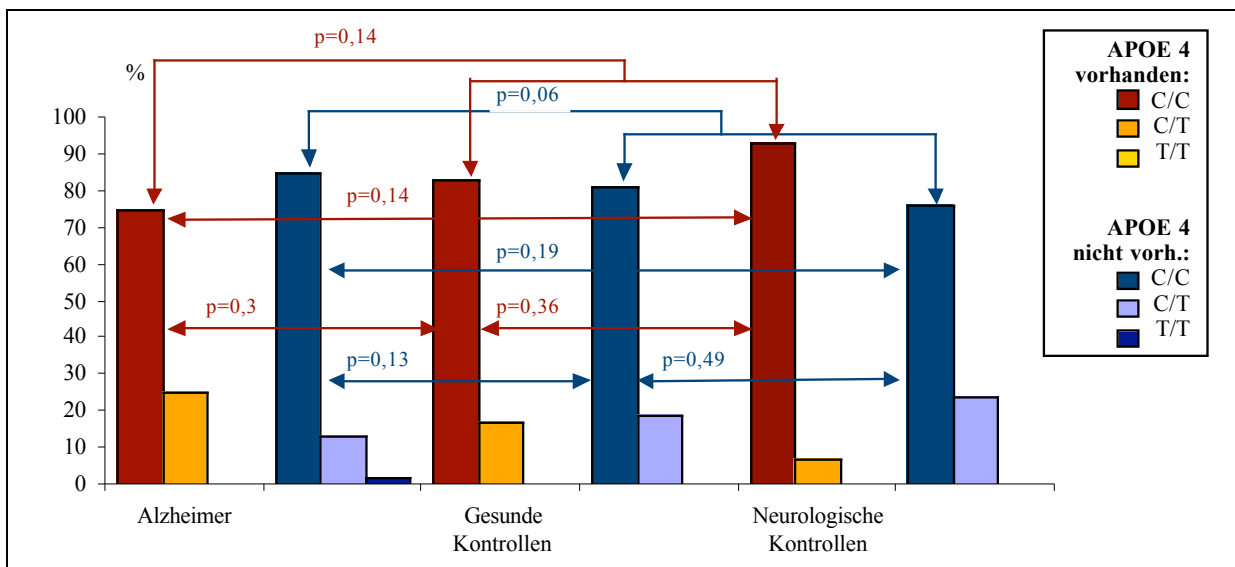
Von 146 Trägern des APOE 4-Allels kam bei 64 (75%) der 85 Alzheimer Patienten der CatD-Genotyp C/C und bei 21 (25%) C/T vor. Unter den insgesamt 280 Nicht-Trägern des APOE 4-Allels lag bei 86 (85%) der 101 Alzheimer Patienten, der Genotyp C/C, bei 13 (13%) C/T und bei 2 (2%) T/T vor.

Von den 47 gesunden Kontrollfällen mit dem APOE 4-Allel lag bei 39 Individuen (83%) C/C und bei 8 (17%) C/T vor. Unter den Nicht-Trägern des APOE 4-Allels waren 137 gesunde Kontrollfälle, von denen wiederum bei 111 (81%) der C/T Genotyp und bei 26 (19%) der C/C Genotyp vorlag.

Von den 14 neurologischen Kontrollfällen mit dem APOE-4-Allel lag bei 13 (93%) C/C und bei 1 (7%) C/T vor. Unter den Nicht-Trägern des APOE 4-Allels waren 42 neurologische Kontrollfälle, von denen bei 32 C/C (76%) und bei 10 C/T (24%) vorlag.

Beim Vorliegen des APOE 4-Allels ergab die Analyse der Cathepsin D-Genotypverteilung mit dem  $\chi^2$ -Test nach Pearson bei den Alzheimer-Patienten gegenüber allen Kontrollen einen Wert von 2,15 ( $p=0,14$ ), und bei Nicht-Trägern des APOE 4-Allels einen Wert von 5,69 ( $p=0,06$ ). Zwischen den Alzheimer Patienten und den gesunden Kontrollen ergab sich für die APOE 4-Allelträger ein Wert von 1,04 ( $p=0,3$ ), und bei Nicht-Trägern des APOE 4-Allels von 4,16 ( $p=0,13$ ). Zwischen den Alzheimer Patienten und den neurologischen Kontrollfällen ergab sich bei Vorliegen des APOE 4-Allels ein Wert von 2,15 ( $p=0,14$ ) und bei die Nicht-Vorliegen des APOE 4-Allels ein Wert von 3,33 ( $p=0,19$ ). Wurden die Kontrollen untereinander verglichen, so ergab sich für die APOE 4-Allelträger ein Wert von 0,84 ( $p=0,36$ ) und für die Nicht-Träger ein Wert von 0,47 ( $p=0,49$ ).

Zusammenfassend zeigt sich kein Unterschied hinsichtlich der Verteilung des Cathepsin D-Genotyps in Abhängigkeit des APOE 4-Allels (s. Abb. 21).



**Abb. 21:** Ein Vergleich der Verteilung des CatD-Genotyps unter den Trägern (rot), bzw. Nicht-Trägern (blau) des APOE 4-Allels zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen M. Alzheimer, gesunden Kontrollen und neurologischen Kontrollen.



### 3.1.4 Ermittlung des Erkrankungsrisikos für Morbus Alzheimer

Es wurde das Erkrankungsrisiko für das CatD T-Allel, für das APOE 4-Allel und für das CatD T-Allel abhängig vom Vorliegen des APOE 4-Allels ermittelt. Die Resultate ergaben kein erhöhtes Erkrankungsrisiko für CatD T-Allelträger (OR 1,04; 95% KI: 0,6-1,7) (s. Tab.2.). Das wurde auch durch die Analyse in Abhängigkeit des APOE 4-Allels bestätigt (Tab. 3). Somit konnte das erhöhte Erkrankungsrisiko bei Vorliegen des APOE 4-Allels bestätigt werden.

Vergleichsgruppen	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall
Alzheimer / Gesamtkontrollen	1,04	0,6-1,7
Alzheimer / Neurologische Kontrollen	0,98	0,46-2,09
Alzheimer / Gesunde Kontrollen	1,03	0,62-1,73

**Tab. 2:** Das Risiko bei Vorliegen des CatD T-Allels an Morbus Alzheimer zu erkranken, ist nicht erhöht.

Allelverteilung				
Vergleichsgruppen	APOE 4+		APOE 4-	
	T+	T-	T+	T-
Alzheimer Fälle	85 (45,7%)		101 (54,3%)	
	21 (24,7%)	64 (75,3%)	15 (14,9%)	86 (85,1%)
Gesunde Kontrollen	47 (25,5%)		137 (74,5%)	
	8 (17,1%)	39 (82,9%)	26 (18,9%)	111 (81,1%)
Neurologische Kontrollen	14 (25%)		42 (75%)	
	1 (7,1%)	13 (92,9%)	10 (23,8%)	32 (76,2%)
Kontrollen gesamt	61 (25,4%)		179 (74,6%)	
	9 (14,8%)	52 (85,2%)	36 (20,1%)	143 (79,9%)
Erkrankungsrisiko				
	APOE 4+	APOE 4 + T+	APOE 4- T+	
OR	2,5	1,9	0,7	
95% KI	1,6-3,7	0,8-4,4	0,4-1,3	

**Tab. 3:** Verteilung des APOE 4-Allels und des CatD T-Allels bei Alzheimer Fällen, gesunden und neurologischen Kontrollen (s.a. Kap. 3.1.3.3 und Abb. 21) (+: vorhanden, -: nicht vorhanden). Das APOE 4-Allel erhöht das Erkrankungsrisiko signifikant um das 2,5-fache (OR: Odds Ratio, 95% KI: 95 % Konfidenzintervall). Jedoch ist das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken für CatD T-Allelträger unabhängig des APOE 4-Status nicht erhöht.

### 3.1.5 Der Einfluss von Alter, Geschlecht und APOE 4-Allel und ihre Wechselwirkungen mit dem Cathepsin D T-Allel auf das Erkrankungsrisiko

Um die komplexe Wechselwirkung der Variablen Geschlecht, Alter und APOE 4-Allel mit dem Cathepsin D T-Allel auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit von Morbus Alzheimer zu bestimmen, wurde eine multiple logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Das Ergebnis ist in Tab. 4 dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass das Geschlecht einen signifikanten Einfluß auf das Erkrankungsrisiko besass. Geschlecht und CatD T-Allel hatten in ihrer Interaktion ein signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko. Erwartungsgemäß war das Erkrankungsrisiko für Träger des APOE 4-Allels ebenfalls signifikant erhöht, die Wechselwirkung des APOE 4-Allels mit dem Cathepsin D T-Allel hatte hingegen keinen signifikanten Einfluß auf das Erkrankungsrisiko. Diese Aussage entspricht dem Ergebnis, wie es in Kapitel 3.1.3.3. und 3.1.4. dargestellt wurde.

Obwohl das Alter als Risikofaktor für die Alzheimersche Demenz gilt, erhöhte es in dieser Stichprobe das Erkrankungsrisiko nicht signifikant. Es gilt dabei zu beachten, dass die Fälle und die Kontrollen alterszugehörig ausgewählt wurden.

Variable	P	OR	95% Konfidenzintervall
Alter	0,18	0,96	0,91-1,01
Geschlecht	0,009	0,24	0,08-0,70
CatD T-Allel	0,73	0,46	0,006-35,80
APOE 4 Allel	0,002	5,83	1,95-17,43
Geschlecht mit CatD T-Allel	0,003	5,77	1,78-18,66
Alter mit CatD T-Allel	0,76	1,00	0,95-1,07
APOE 4-Allel mit CatD T-Allel	0,09	0,36	0,11-1,07

**Tab. 4:** Ergebnis der logistischen Regression zur Bestimmung des Einflusses von Alter, Geschlecht, CatD T-Allel und APOE 4-Allel auf das Erkrankungsrisiko von Morbus Alzheimer, sowie der Interaktion dieser Variablen mit dem CatD T-Allel. Die Wechselwirkung des Geschlechts mit dem CatD T-Allel erhöhte das Erkrankungsrisiko signifikant. Die Wechselwirkung von APOE 4 mit CatD T war nicht signifikant.

### 3.1.5.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich des Erkrankungsrisikos

Da das Geschlecht in seiner Interaktion mit dem CatD T-Allel das Erkrankungsrisiko offenbar signifikant verändert (s. Tab. 4), wurde der Frage nach geschlechtsspezifischen Unterschieden genauer nachgegangen, indem die Fälle nach Männern und Frauen getrennt untersucht wurden.

Zunächst wurde die Verteilung des Cathepsin D T- und des APOE 4-Allels betrachtet (s. Tab. 5). Dabei zeigte sich, dass das CatD T-Allel bei Männern im Gegensatz zu Frauen das Erkrankungsrisiko signifikant erhöht. APOE 4 erhöht das Erkrankungsrisiko bei beiden Geschlechtern signifikant, bei den Männern tendenziell etwas mehr als bei den Frauen.

	Männer		Frauen	
	Alzheimer	Kontrollen	Alzheimer	Kontrollen
CatD T positiv	20 (32%)	13 (15%)	16 (14%)	31 (21%)
CatD T negativ	43 (68%)	76 (85%)	101 (86%)	114 (79%)
P	0,01		0,11	
OR (95% KI)	2,72 (1,23-6,00)		0,58 (0,30-1,13)	
APOE 4 positiv	32 (46%)	22 (25%)	53 (45%)	26 (25%)
APOE 4 negativ	37 (54%)	67 (75%)	64 (55%)	109 (75%)
p	0,004		0,001	
OR (95% KI)	2,63 (1,34-5,17)		2,51 (1,49-4,23)	

**Tab 5.** Die CatD T- und APOE 4-Allelverteilung getrennt nach Geschlechtern. CatD T erhöht das Erkrankungsrisiko signifikant bei männlichen Alzheimerpatienten im Gegensatz zu den weiblichen. APOE 4 ist bei beiden Geschlechtern ein Risikofaktor.

Als nächstes interessierte die Frage, wie es sich mit dem Erkrankungsrisiko bei Männern verhält, wenn mehrere Variablen (Alter, CatD T, APOE 4 und die Wechselwirkung APOE 4 mit CatD T) in die Betrachtung einbezogen werden. Dazu wurde analog zu dem Vorgehen in Kapitel 3.1.5. vorgegangen, indem eine multiple logistische Regressionsanalyse durchgeführt wurde (s. Tab. 6). Hierbei bestätigte sich die vorangegangene Beobachtung, dass das CatD T-Allel das Erkrankungsrisiko signifikant erhöht (s.Tab.5). Die Interaktion APOE 4 mit CatD T ist allerdings nicht signifikant.

<b>Variable</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>	<b>95% Konfidenzintervall</b>
Alter	0,30	0,99	0,96-1,01
CatD T-Allel	0,02	11,58	1,37-97,87
APOE 4 Allel	0,02	15,00	1,63-138,21
APOE 4-Allel mit CatD T-Allel	0,08	0,12	0,01-1,25

**Tab. 6:** Multiple logistische Regressionsanalyse zur simultanen Bestimmung des Einflusses von Alter, CatD T, APOE 4 und der Interaktion APOE4 und CatD T auf das Erkrankungsrisiko bei Männern. CatD T erhöht das Erkrankungsrisiko signifikant, ebenso wie APOE 4. Die Interaktion zwischen APOE 4 und CatD T ist nicht signifikant.

### 3.2 Neuropathologisch diagnostizierte Fälle

In diesem Teil der Arbeit wurde die Hypothese getestet, ob der CatD 224C→T Polymorphismus einen Einfluss auf die wesentlichen pathologischen Veränderungen der Alzheimerschen Krankheit, Plaques, neurofibrilläre Tangles und aktivierte Mikroglia aufweist, und somit einen funktionellen Effekt zeigt. Hierzu wurde das Cathepsin D-Gen an 19 neuropathologisch diagnostizierten Fällen (Durchschnittsalter 75,9 Jahre, Standardabweichung 7,3) genotypisiert. Der Genotyp wurde sodann mit morphometrischen Daten über die Anzahl und die Fläche von Plaques, neuritischen Plaques (NP) und aktivierter Mikroglia (CR3), sowie der Anzahl von neurofibrillären Tangles (NFT) jeweils aus dem Frontal- und dem Temporallappen verglichen. Diese Daten stammen aus vorangegangenen Untersuchungen mittels eines Computer-basierten Bildverarbeitungsprogramms (Egensperger et al., 1998). Die unterschiedliche Verteilung der einzelnen phänotypischen Variablen zwischen Alzheimer Patienten, bei denen das CatD T-Allel entweder vorlag oder nicht vorlag, wurde mit dem Mann-Whitney Test analysiert. Der Signifikanzgrenzwert wurde bei  $p \leq 0,05$  festgelegt.

Zusätzlich wurde eine immunhistochemische Doppelfärbung der Schnitte mit CatD und  $\beta$ -Amyloid-Protein durchgeführt. Die Co-Immunlokalisation des  $\beta$ -Amyloid-Proteins erfolgte, weil es der Hauptbestandteil der senilen Plaques ist.

#### 3.2.1 Effekt des Cathepsin D-Genotyps auf neuropathologische Veränderungen bei Morbus Alzheimer

Die Genotypisierung der 19 Alzheimer-Patienten brachte folgendes Ergebnis: 12 Individuen wiesen die Allelkombination C/C (63,2%), 6 C/T (31,6%) und 1 T/T (5,2%) auf. Das C-Allel kam mit einer Häufigkeit von 78,9% und das T-Allel mit einer Häufigkeit von 21,1% vor.

Die Analyse der Verteilung von Anzahl und Fläche der Plaques, neuritischer Plaques (NP) und der aktivierten Mikroglia (CR3), sowie der Anzahl von NFT in Abhängigkeit des Vorhandenseins des CatD T-Allels ergab keinen signifikanten Unterschied (s. Tab. 6 a,b). Jedoch war ein schwacher Hinweis für einen Einfluss des T-Allels auf die Anzahl der neuritischen Plaques zu beobachten (0,08).

**Tab. 6a:** Verteilungsanalyse der Anzahl und der Fläche von Plaques, NP und CR3, sowie nur der Anzahl von NFT in Abhängigkeit des CatD T-Allels. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Schwacher Hinweis für Verteilungsunterschied bei Anzahl der neuroitischen Plaques im Frontalhirn ( $p=0,08$ ).

CatD T-Allel	<sup>a</sup> Anzahl Plaques Frontal		Anzahl Plaques Temporal		<sup>b</sup> Fläche Plaques Frontal		Fläche Plaques Temporal		Anzahl NP Frontal		Anzahl NP Temporal		Fläche NP Frontal	
	<sup>c</sup> MR	<sup>d</sup> (p)	MR	(p)	MR	(p)	MR	(p)	MR	(p)	MR	(p)	MR	(p)
T-	9,25	0,48	9,67	0,77	9,71	0,77	9,67	0,77	8,29	0,08	8,88	0,26	8,67	0,19
T+	11,29		10,57		10,50		10,57		12,93		11,93		12,29	

<sup>a</sup>Anzahl Plaques/ 2,47 mm<sup>2</sup>

<sup>a</sup>Anzahl NP, NFT & CR3/ 1,08 mm<sup>2</sup>

<sup>b</sup>Fläche in mm<sup>2</sup>

<sup>c</sup>Mittlerer Rang

<sup>d</sup>exakte zweiseitige Signifikanz beim Mann-Whitney Test ( $p \leq 0,05$ )

**Tab. 6b:** Verteilungsanalyse der Anzahl und der Fläche von Plaques, NP und CR3, sowie nur der Anzahl von NFT in Abhängigkeit des CatD T-Allels. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

CatD T-Allel	Fläche NP Temporal		Anzahl NFT Frontal		Anzahl NFT Temporal		Anzahl CR3 Frontal		Anzahl CR3 Temporal		Fläche CR3 Frontal		Fläche CR3 Temporal	
	MR	(p)	MR	(p)	MR	(p)	MR	(p)	MR	(p)	MR	(p)	MR	(p)
T-	8,50	0,14	9,42	0,59	9,42	0,59	10,25	0,84	10,25	0,84	10,13	0,90	10,71	0,48
T+	12,57		11,00		11,00		9,57		9,57		9,79		8,79	

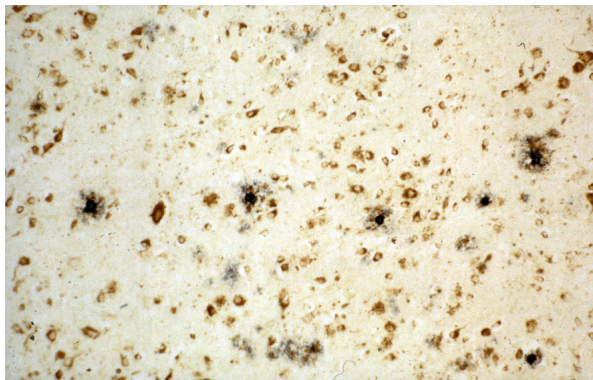


### **3.2.2 Immunhistochemische Doppelfärbung von $\beta$ -Amyloid und Cathepsin D**

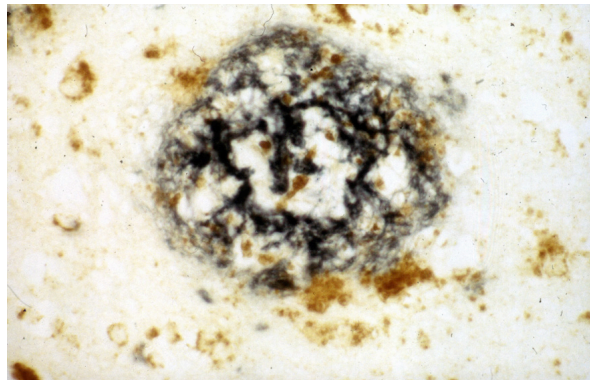
Bei der Betrachtung der immunhistologischen Ergebnisse (s. Abb 22-30) von Alzheimer-Patienten war zu erkennen, dass CatD in Nervenzellen durchweg stark intrazytoplasmatisch exprimiert wurde. In glialen Zellen wurde CatD nur geringfügig exprimiert. In neuritischen Plaques war Cathepsin intraindividuell vergleichsweise stärker als in diffusen Plaques angefärbt. Überall dort, wo  $\beta$ A4 extrazellulär nachweisbar war, kam auch CatD.

Hinsichtlich der räumlichen Verteilung der CatD-Expression im Temporal- und Frontallappen ließ sich kein Unterschied beobachten.

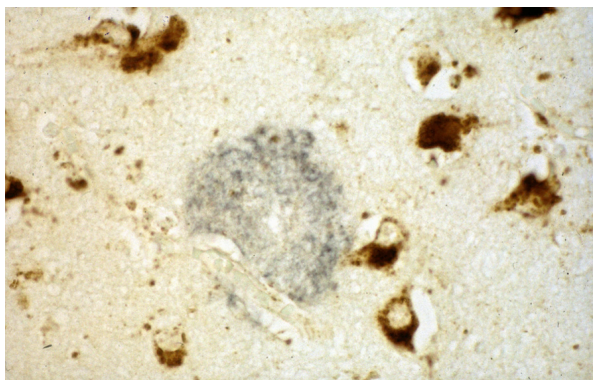
Bei den beiden Kontrollfällen wurden keine Plaques beobachtet. Die Farbreaktion in Nervenzellen war durchweg stark und unterschied sich diesbezüglich nicht von den Alzheimerfällen.



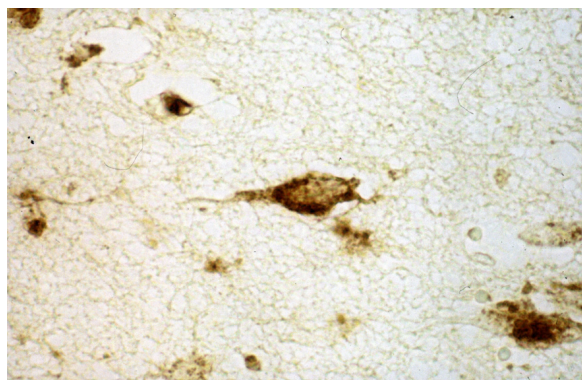
**Abb. 22:** Neuritische Plaques. Typische Struktur: zentral dichter Kern, umgeben von lichtem Hof. Im Inneren zelluläre Restbestandteile, am Rand umgeben von untergegangenen Zellen. Genotyp: CatD:C/C, APOE 3/4. Vergrößerung 2,5X20.



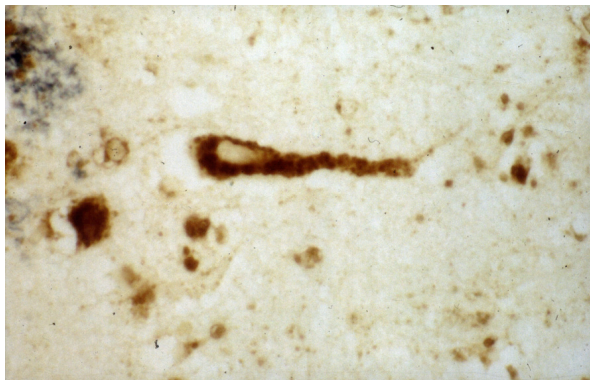
**Abb. 23:** Neuritischer Plaque, selber Fall wie Abb. 22. Im Innern des Plaque CatD gefärbte Zellbestandteile. Randzone: untergegangene Neurone. Genotyp: CatD:C/C, APOE 3/4. Vergrößerung:4x40.



**Abb. 24:** Das Foto zeigt einen diffusen Plaque im Frontallappen eines Alzheimer-Patienten . Die  $\beta$ A4- Reaktion ist für diffuse Plaques schwach; CatD ist im Plaque kaum angefärbt worden. Genotyp: CatD: C/T; APOE 3/4. Vergrößerung: 4x40.



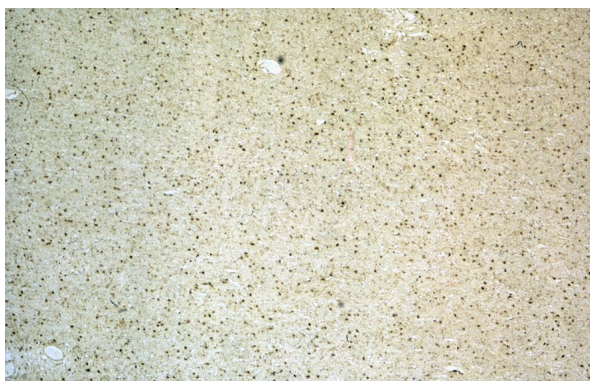
**Abb. 25:** Bipolares Neuron aus dem Temporallappen eines Alzheimer-Patienten. Es stellen sich die neurofibrillären Tangles durch die Anfärbung der CatD enthaltenden Lysosomen dar. Genotyp: CatD: C/T; APOE 3/4. Vergrößerung: 5 X 40.



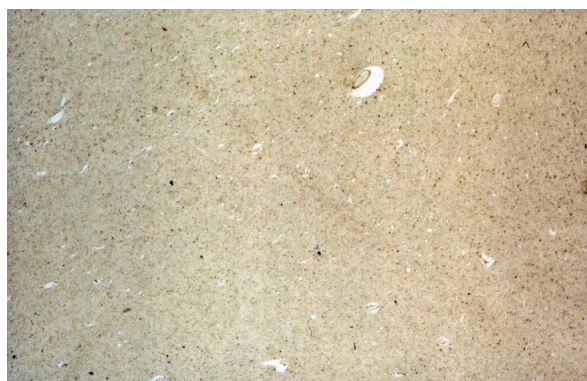
**Abb. 26:** Unipolare Nervenzelle aus dem Frontalhirn eines Alzheimer-Patienten, dicht bepackt mit Lysosomen. Vergleiche Abb. 23. Starke CatD Anfärbung. Im Bild links oben angeschnitten ist ein diffuser Plaque. Genotyp: CatD: C/C; APOE 3/4. Vergrößerung: 5x40.



**Abb. 27:** Unipolare Nervenzelle aus dem Frontalhirn eines Kontrollfalles. Im Vergleich zu Abb. 26 deutlich weniger und kleinere Lysosomen. Vergrößerung: 3,3x40.

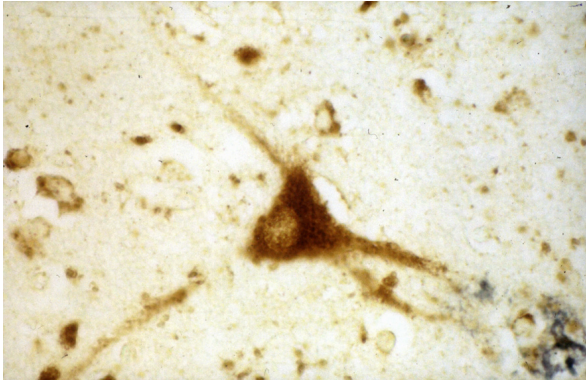


**Abb. 28:** Glia aus dem Temporallappen eines Alzheimer-Patienten: intensive Anfärbung der Lysosomen, vgl. mit Abb. 29. Genotyp: CatD:C/C; APOE 3/3. Vergrößerung: 2,5x4.



**Abb. 29:** Die Übersichtsaufnahme zeigt Glia aus dem Frontallappen eines Kontrollfalles. CatD ist nur geringfügig angefärbt,  $\beta$ A4 gar nicht. Vgl. Abb. 25. Vergrößerung: 2,5X4.





**Abb. 30:** Multipolare Pyramidalzelle aus dem Frontalhirn eines Alzheimer-Patienten . Zellkörper dicht bepackt mit Lysosomen, bis in die auslaufenden Zellfortsätze hinein erkennbar. Genotyp: CatD C/C, APOE 3/4. Vergrößerung: 5x40.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Besteht eine Assoziation zwischen dem Cathepsin D224C→T Polymorphismus und Morbus Alzheimer?

Ein Polymorphismus im Profragment des Cathepsin D-Gens (224C→T Transition in Exon 2, Austausch von Alanin zu Valin) führt zu einer vermehrten Sekretion des Proenzym von Cathepsin D und zu einer veränderten Funktion des reifen Cathepsin D in menschlichen Brustkrebszellen und trägt auf diese Weise zur Metastasierung bei (Touitou et al., 1994).

1999 wurde erstmals die Hypothese aufgestellt, dass in Analogie dazu, der Cathepsin D-Polymorphismus das Risiko erhöht, an Morbus Alzheimer zu erkranken, in dem es durch die veränderte Funktion zu einer pathologischen Mitbeteiligung an der APP-Prozessierung kommt (Papassotiropoulos et al., 1999), was zu einer vermehrten Amyloidbildung beiträgt. Um diese Hypothese zu überprüfen, führten die Autoren zwei Fall-Kontroll-Studien durch, in denen sie eine Überrepräsentation des CatD T-Allels bei Morbus Alzheimer im Vergleich zu Kontrollen fanden (Papassotiropoulos et al., 1999, 2000a).

Beyer (Beyer et al., 2005) beschrieb den Cathepsin D-Polymorphismus als „Minor Locus“, da sie herausfand, dass das Erkrankungsrisiko in einer bestimmten Altersgruppe (75-79 Jahre) erhöht ist. Beim Vergleich der Alzheimer Fälle mit den Kontrollen aller Altersstufen war dieser Zusammenhang jedoch nicht erkennbar.

Zwei Autoren fanden heraus, dass der Cathepsin D-Polymorphismus ein geschlechtsspezifischer Risikofaktor zu sein scheint, weil er das Erkrankungsrisiko für Männer, nicht aber für Frauen steigert (Menzer et al., 2001; Jhoo et al., 2005).

Die Frage, ob es sich bei einem genetischen Merkmal um einen Risikofaktor handelt oder nicht, lässt sich nicht anhand von einigen wenigen Studien beantworten. Es bedarf zahlreicher Studien unterschiedlichen Aufbaus (Bevölkerungsbezogene Fall-Kontroll Studien, Familienstudien, Kopplungsanalysen) (Editorial, 1999; Emahazion et al., 2001).

Insgesamt wurden 23 genetische Assoziationsstudien zum Cathepsin D 224C→T Polymorphismus und Morbus Alzheimer veröffentlicht, wovon zwei Arbeiten eine positive Assoziation beschrieben (Papassotiropoulos et al., 1999, 2000a) und drei weitere einen Zusammenhang zwischen alters- und geschlechtsbezogenen Untergruppen und dem Erkrankungsrisiko herausfanden (Beyer et al., 2005; Jhoo et al., 2005; Menzer et al., 2001). Die übrigen 18 Studien ließen keinen signifikanten Zusammenhang erkennen (Bagnoli et

al., 2002; Bhojak et al., 2000; Blomqvist et al., 2005; Capurso et al., 2005; Crawford et al., 2000; Emahzion et al., 2001; Ingegneri et al., 2003; Kölsch et al., 2004; Mateo et al., 2002; McIlroy et al., 1999; Prince et al., 2001; Styczynska et al., 2003; Li et al., 2004; Matsui et al., 2001; Bertram et al., 2000, 2001) (s. Tab.7).

Der Vergleich mit den beiden positiven Assoziationsstudien und den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen zeigt eine deutliche Diskrepanz bei der Verteilung des C/T Genotyps und der T-Allelfrequenz. Der Studie von Papassotiropoulos (Papassotiropoulos et al., 1999) lagen 453 Proben zu Grunde, von denen 102 Alzheimer Fälle und 351 Kontrollen (davon 191 gesunde und 160 neurologische Kontrollen) waren. Der C/T Genotyp war bei den Alzheimer Fällen mit  $n=27$  (27%) vertreten und bei den Kontrollen mit  $n=26$  (14%). Die T-Allelfrequenz betrug bei den Alzheimer Fällen 14% und bei den Kontrollen 7% ( $p=0,001$ ). Sie ermittelten ein 2,4-fach erhöhtes Risiko bei Vorliegen des Cathepsin D T-Allels an Morbus Alzheimer zu erkranken (95% KI: 1,4-4,2). In einer Replikationsstudie mit 311 Proben (davon 127 Alzheimer Fälle, 184 Kontrollen) derselben Autoren (Papassotiropoulos et al., 2000a) wurde erneut eine signifikante Häufung des T-Allels unter den Alzheimer Fällen festgestellt (C/T Alzheimer/Kontrollen:  $n=30$  (24%)/  $n=18$  (10%); T-Allelfrequenz Alzheimer/Kontrollen: 12%/ 5%,  $p<0,001$ ). Die Odds Ratio betrug hier 3,1.

Demgegenüber zeigten die Ergebnisse dieser Studie mit einem Stichprobenumfang von 433 Proben mit 186 Alzheimer Fällen und 247 Kontrollen (davon 191 gesunde und 56 neurologische Kontrollen) keine signifikante Häufung des C/T Genotyps (Alzheimer/Kontrollen:  $n=155$  (81%)/  $n=200$  (81%) und der T-Allelfrequenz (10,2%/ 9,5%,  $p=0,73$ ). Es wurde eine Odds Ratio von 1,04 (95% KI: 0,6-1,7) ermittelt (Vgl. Abb. 9, Abb. 14 und Tab. 2).

Um sicher zu gehen, dass der beobachtete Unterschied von Papassotiropoulos (Papassotiropoulos et al., 1999) hinsichtlich der Verteilung des T-Allels spezifisch für die Alzheimer Fälle ist, wurden die Kontrollfälle in eine gesunde und eine neurologische Kontrollgruppe, d.h. Patienten die an einer nicht-demenziellen Erkrankung aus dem neuropsychiatrischen Bereich erkrankt sind, unterteilt und jeweils miteinander verglichen. Hierbei bestätigte sich die positive Assoziation (Alzheimer/ gesunde Kontrollen:  $p=0,01$ ; Alzheimer/ neurologische Kontrollen:  $p=0,02$ ; gesunde/ neurologische Kontrollen:  $p>0,5$ ).

Demgegenüber zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit auch bei dieser Vorgehensweise keinen signifikanten Unterschied (Alzheimer/ gesunde Kontrollen:  $p=0,72$ ; Alzheimer/ neurologische Kontrollen:  $p=0,9$ ; gesunde/ neurologische Kontrollen:  $p=0,9$ ).

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Studie ungeachtet des Geschlechts, so stehen sie in Einklang mit der Mehrheit der anderen genetischen Assoziationsstudien, die ebenfalls keine signifikante Assoziation bezüglich des Cathepsin D-Polymorphismus und Morbus Alzheimer feststellen können (Vgl. Tab. 7). Zwar wurde eine leichte Häufung des T-Allels bei Alzheimer Fällen in drei Studien beschrieben (Crawford et al., 2000; McIlroy et al., 1999b; Menzer et al., 2001). Dieser Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant. Crawford et al. (2000) beschrieben eine leichte Häufung des C/T Genotyps und der T-Allelfrequenz in Abhängigkeit der Ethnie. Sie beobachteten, dass beide Variablen bei erkrankten Kaukasiern häufiger als bei Alzheimer-Patienten aus Kuba vertreten waren. McIlroy (McIlroy et al., 1999) beschrieb ebenfalls eine leichte, statistisch nicht signifikante, Häufung des T-Allels bei den Alzheimer Fällen seiner Stichprobe aus der Nordirischen Bevölkerung. Auch Menzer et al. (2001) stellten eine geringfügige Überrepräsentierung des T-Allels fest und diskutierten als Ursache, dass ihrer Studie eine gemischte Population aus Deutschland, der Schweiz und Italien zu Grunde lag, wobei die T-Allelfrequenz nur in der italienischen Subgruppe erhöht war.

Ergebnis der vorliegenden Arbeit war jedoch, dass der Cathepsin D-Polymorphismus bei Männern das Erkrankungsrisiko signifikant erhöhte. Daher kann die Vermutung untermauert werden, dass CatD ein geschlechtsspezifischer Risikofaktor in der Ätiologie der Alzheimerschen Krankheit zu sein scheint (Jhoo et al., 2005, Menzer et al., 2001) (s. Kap. 4.2.2.).

Vergleicht man alle genetischen Assoziationsstudien zu Cathepsin D ist generell zu beachten, dass sich die Zusammensetzung der Stichproben bezüglich demographischer Variablen, wie dem Alter, der Geschlechtszugehörigkeit und der ethnischen Herkunft teilweise erheblich unterscheiden, und deshalb ein Vergleich unter besonderer Berücksichtigung dieser Faktoren vorgenommen werden muß (s. dazu Kap. 4.2.).

**Tabelle 7:** Übersicht der genetischen Assoziationsstudien zu Cathepsin D (Bertram et al., 2006).

Autor	Studienart	Bevölkerung	Alzheimer		Kontrollen		T-Allelfrequenz (%)		Signifikanz (p)	Odds Ratio (95% KI)	Assoziation besteht
			Anzahl (% Frauen)	Altersdurchschnitt	Anzahl (% Frauen)	Altersdurchschnitt	Alzheimer	Kontrollen			
Eigene (2007)	B <sup>a</sup>	Deutschland	186 (67%)	68,3 ±10,6	248 (59%)	67,04 ±11,68	10,2%	9,5%	0,01	2,72 (1,23-6,00)	ja <sup>b</sup>
Bagnoli (2002)	B	Italien	197 (42%)	65,7 ±8,6	126 (67%)	72,9 ±24	12%	11%	0,26		nein
Beyer (2005)	B	Spanien	206 (62%)	72,6 <sup>c</sup>	181 (60%)	69,6 -	8%	8%	0,002 <sup>d</sup>	2,4 <sup>d</sup> (1,2-4,9)	ja <sup>e</sup>
Bhojak (2000)	B	USA	531 (65%)	76,1 ±7,1	337 -	74,5 ±4,3	10%	9%	0,53	-	nein
Blomqvist (2005)	B	Schweden	819 (63%)	76,2 ±7,1	240 (59%)	73,2 ±9,3	6%	6%	0,1	0,29 (0,03-2,94)	nein
Capurso (2005)	B	Italien	168 (65%)	-	218 (67%)	75,5 ±8,5	9%	10%	1	-	nein
Crawford (2000)	B	USA	210 (59%)	-	120 (51%)	75,7 ±6,3	10%	8%	0,4	0,8 (0,5-1,4)	nein
Crawford (2000)	B	Kuba	79 (70%)	-	112 (59%)	72,6 ±5,5	8%	14%	0,4	0,54 (0,3-1,0)	nein
Emahazion (2001)	B	Schottland	121 -	-	152 -	-	5%	11%	n.s. <sup>f</sup>	-	nein
Ingegneri (2003)	B	Italien	142 (67%)	-	120 (75%)	71,7	13%	10%	n.s.	-	nein

<sup>a</sup>Bevölkerungsbezogene Fall-Kontrollstudie<sup>b</sup>Positive Assoziation für männliches Geschlecht. Beide Geschlechter: p=0,73, OR: 1,02(0,63-1,66)<sup>c</sup>keine Angabe<sup>d</sup>p=1 für alle Altersstufen. p=0,002 für die Altersstufe 75-79 Jahre. OR gilt nur für die Altersstufe 75-79 Jahre<sup>e</sup>Assoziation besteht nur für Altersstufe 75-79 Jahre (Fallzahl in dieser Gruppe: Alzheimer n=41, Kontrollen n=21)<sup>f</sup>nicht signifikant



Autor	Studi- di- enart	Bevöl- kerung	Alzheimer		Kontrollen		T-Allel-frequenz (%)		Signifi- kanz (p)	Odds Ra- tio (95% KI)	Asso- ziation besteht
			Anzahl (% Frau- en)	Alters- durch- schnitt	Anzahl (% Frau- en)	Alters- durch- schnitt	Alzheimer	Kontrollen			
Kölsch (2004)	B	Deutsch- land	188 (72%)	74,1 ±9	259 (55%)	68,8 ±11,8	-	-	0,33	-	nein
Mateo (2002)	B	Spanien	311 (67%)	75,3 ±8,9	346 (70%)	80,4 ±7,6	9%	10%	0,98	1,01 (0,68-1,5)	nein
Matsui (2002)	B	USA	69 -	77,8 ±8,0	50 -	61,1 ±14,6	7%	8%	n.s.	-	nein
Matsui (2002)	B	Japan	275 (78%)	74,4 ±8,9	479 -	74,9 ±6,1	1%	1%	n.s.	-	nein
McIlroy (1999b)	B	Nordirland	183 (66%)	77,7 ±5,9	187 (69%)	77,1 ±6	8%	5%	0,1	-	nein
Menzer (2001)	B	Europa (gemischt)	324 (72%)	74,2 ±9,2	302 (60%)	67,8 ±12,5	8%	6%	0,2	1,75 <sup>s</sup> (0,80-3,85)	nein
Papassoti- ropoulos (1999)	B	Deutsch- land	102 (67%)	74,4 ±10,3	351 (52%)	70,6 ±11,4	14%	7%	<0,001	2,4 (1,4-4,2)	ja
Papassoti- ropoulos (2000a)	B	Deutsch- land	127 (61%)	72 ±10	184 (61%)	69 ±10	12%	5%	<0,001	3,1 (1,58-6,16)	ja
Prince (2001)	B	Schweden	204 (61%)	-	186 (58%)	-	7%	6%	0,9	0,9 (0,6-1,9)	nein
Styczynska (2003)	B	Polen	100 (66%)	76,4 ±4,7	100 (58%)	74,2 ±6,6	7%	5%	n.s.	-	nein

<sup>s</sup> Angegebene OR gilt für männliches Geschlecht. OR für weibliches Geschlecht: 1,13; 95% KI (0,62-2,05)

Autor	Studienart	Bevölkerung	Alzheimer		Kontrollen		T-Allelfrequenz (%)		Signifikanz (p)	Odds Ratio (95% KI)	Assoziation besteht
			Anzahl (% Frauen)	Altersdurchschnitt	Anzahl (% Frauen)	Altersdurchschnitt	Alzheimer	Kontrollen			
Jhoo (2005)	B	Korea	107 (65%)	72,9 ±9	216 (78%)	70,1 ±7,1	4%	3%	n.s.	1,77 (0,70-4,46)	nein
Li (2004)	B	China	156 (53%)	74 ±9,1	183 (45%)	69,9 ±7,7	4%	5%	0,5	-	nein
Bertram (2001)	B	USA	200 -	-	182 -	66,5 ±11,5	9%	9%	0,9	-	nein
Bertram (2001)	F <sup>h</sup>	USA	496 -	-	174 -	-	10%	9%	0,68	-	nein

<sup>h</sup> Familienbasierte Studie

## 4.2 Faktoren, die das Erkrankungsrisiko des Cathepsin D T-Allels für Morbus Alzheimer beeinflussen

Komplexe Interaktionen zwischen Alter, Geschlecht, und dem APOE-Genotyp bezüglich des Erkrankungsrisikos für Morbus Alzheimer sind beschrieben worden (Farrer et al., 1997). Interessanterweise zeigten einige der Studien zu Cathepsin D (s. Tab. 7), in deren statistischer Auswertung einzelne dieser Variablen gezielt berücksichtigt wurden, teilweise ein statistisch signifikantes Ergebnis oder ließen zumindest einen Trend zu einer vermehrten Häufung des T-Allels bei Alzheimer Fällen erkennen, obwohl sie bei der Gesamtbetrachtung der Daten klar zu einem nicht signifikanten Ergebnis kamen.

### 4.2.1 Das Alter

Es ist bekannt, dass das APOE 4-Allel das Erkrankungsalter von Morbus Alzheimer beeinflusst (Meyer et al., 1998). Der Einfluss des Alters sollte daher in genetischen Assoziationsstudien Berücksichtigung finden.

So fanden Beyer et al. (2005) heraus, dass die Verteilung der Cathepsin D T-Allelfrequenz vom Alter abhängt. Die untersuchten Fälle wurden in sechs Altersstufen unterteilt (<60, 60-64, 65-69, 70-74, 75-79 und >80 Jahre). Der Unterschied der T-Allelfrequenzen machte sich am deutlichsten in der Altersgruppe 75-79 Jahre bemerkbar (T-Allelfrequenz: Alzheimer/ Kontrollen 17%/ 6%;  $p=0,19$ ; bei Alzheimer  $n=41$  und Kontrollen  $n=21$ ). Die Odds Ratio betrug 2,4 (95% KI: 1,2-4,9). Bei Betrachtung aller Altersstufen miteinander hebte sich dieser Unterschied jedoch deutlich auf (Alzheimer/ Kontrollen: 8%/ 8%;  $p=1$ ; bei Alzheimer  $n=206$  und Kontrollen  $n=181$ ).

Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter altersabhängiger Unterschied festgestellt werden. Es wurde eine Unterteilung in vier Altersstufen (<60, 61-70, 71-80 und >80 Jahre) vorgenommen. Überraschenderweise konnte sogar ein umgekehrter Effekt festgestellt werden. In der Altersstufe der 61-70-jährigen war der Unterschied hinsichtlich der T-Allelfrequenz am deutlichsten, jedoch mit einer erhöhten T-Allelfrequenz der Kontrollen gegenüber Morbus Alzheimer. Dieser war jedoch nicht signifikant, und das Risiko in dieser Altersgruppe war nicht erhöht (Alzheimer/ Kontrollen:  $n=59/ n=80$ ; T-Allelfrequenz Alzheimer/ Kontrollen: 8,5%/ 12,5%;  $p=0,29$ ; OR: 0,6; 95% KI: 0,6-1,4).

Ein wesentlicher Grund für diese diskrepanten Ergebnisse ist vermutlich statistischer Natur und liegt in dem geringen Stichprobenumfang von Beyer (Beyer et al., 2005) nach der Altersunterteilung begründet. Wahrscheinlich handelt es sich deshalb um ein zufälliges Ergebnis.

In diesem Zusammenhang soll hervorgehoben werden, dass in den zwei Studien, die initial einen positiven Zusammenhang beschrieben (Papassotiropoulos et al., 1999, 2000a), keine Unterteilung nach dem Alter vorgenommen wurde. Unter der Annahme, dass Merkmale wie das Alter bei Erkrankungen mit komplexem Vererbungsmuster einen unvorhersehbaren Einfluss auf das Zustandekommen der Krankheit besitzen, müssen jedoch Fälle und Kontrollen derselben Altersstufe miteinander verglichen werden. So sind die Alzheimer Fälle in diesen beiden Studien im Durchschnitt bis zu vier Jahre älter als die Kontrollfälle (Vgl. Tab. 7).

Im Gegensatz dazu gleichen sich die Durchschnittsalter der Alzheimer Fälle und der Kontrollen in der vorliegenden Untersuchung weitgehend, so dass die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen Papassotiropoulos et al. (1999, 2000a) und dieser Untersuchung möglicherweise auch dadurch zustande kommen, dass die Alterszugehörigkeit bei Papassotiropoulos et al. nicht ausreichend berücksichtigt wurde. Ein weiterer Unterschied liegt auch darin, dass Papassotiropoulos et al. verhältnismäßig wenige Alzheimer Fälle im Vergleich zu Kontrollen untersucht haben (Alzheimer/ Kontrollen:  $n=102/ n=351$ ), wohingegen in dieser Arbeit mit 186 Fällen und 248 Kontrollen ein relativ ausgewogenes Verhältnis vorliegt.

Ein Effekt in der Interaktion des Alters mit dem CatD-Genotyp wurde auch von Crawford et al. (2000) beschrieben. In ihrer Studie an Proben iberischen Ursprungs (Kuba) errechneten sie anhand einer logistischen Regressionsanalyse, dass die Wechselwirkung des Alters mit dem Cathepsin D T-Allel das Erkrankungsrisiko für Morbus Alzheimer signifikant erhöht ( $p=0,04$ ). Nach Einteilung der Proben in zwei Gruppen unter bzw. über 73 Jahre zeigte sich jedoch kein signifikantes Ergebnis. Die Aussagekraft dieses Ergebnisses ist jedoch aufgrund des geringen Probenumfangs (Alzheimer/ Kontrollen:  $n=79/ n=112$ ) eingeschränkt zu bewerten.

Demgegenüber wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der multiplen logistischen Regressionsanalyse keine signifikante Wechselwirkung des Alters mit CatD T ( $p=0,76$ ) errechnet. Bemerkenswerterweise erhöhte das Alter für sich betrachtet in dieser Stichprobe nicht das Erkrankungsrisiko ( $p=0,18$ ; OR: 0,96; 95% KI: 0,91-1,02) obwohl es nachgewiesenermaßen als Risikofaktor für die Entwicklung der Alzheimer Demenz gilt. Dabei ist zu beach-

ten, dass die Proben dem Alter nach zugeordnet waren, und das Risikopotential des Alters daher nicht wie in einer heterogenen Bevölkerungsgruppe objektiv dargestellt werden konnte.

Eine Alterszuteilung wurde nicht in jeder der anderen Studien unternommen. McIlroy et al. (1999b) fanden zwar wie bereits erwähnt eine leicht gehäufte Verteilung des T-Allels bei den Alzheimer Fällen, eine Altersunterteilung wurde jedoch nicht vorgenommen.

Von den Studien, die das Alter berücksichtigten, erfolgte die Zuteilung hauptsächlich in EOAD und LOAD, wobei die Altersgrenzen uneinheitlich festgelegt wurden. Einige nahmen als Altersgrenze 65 Jahre (Jhoo et al., 2005; Li et al., 2004; Prince et al., 2001) und andere 70 Jahre (Capurso et al., 2005; Mateo 2002). Ihnen gemein ist, dass sie keinen altersabhängigen Einfluss des CatD T-Allels auf das Erkrankungsrisiko herausfanden.

Zusammengefasst wird deutlich, dass das Alter ungenügende und uneinheitliche Beachtung bei der Durchführung von genetischen Assoziationsstudien zu Cathepsin D findet. Positive Effekte basieren wegen geringer Fallzahlen ( $n < 100$ ) möglicherweise auf Zufall. Sowohl in der vorliegenden wie auch in den meisten anderen Studien, in denen das Alter Berücksichtigung fand, wurde kein signifikanter Einfluss festgestellt.

#### **4.2.2 Das Geschlecht**

Die Geschlechtszugehörigkeit kann eine bedeutende Rolle in der komplexen Interaktion zwischen einem genetischen Suszeptibilitätsfaktor und einer komplex vererbten Krankheit spielen. So ist bekannt, dass Frauen ein höheres Risiko haben, an Morbus Alzheimer zu erkranken als Männer (Andersen et al., 1999).

Bei Berücksichtigung des Geschlechts, stellte sich in einigen Studien heraus, dass CatD T das Erkrankungsrisiko für Männer stärker als für Frauen beeinflusst (Menzer et al., 2001; Jhoo et al., 2005). Menzer unterteilte die Proben in Männer und Frauen und errechnete, dass das Erkrankungsrisiko bei gleichzeitigem Vorliegen des CatD T-Allels und des APOE 4-Allels für Männer signifikant erhöht ist, und zwar nahezu um das fünffache im Vergleich zu Frauen (Männer:  $p=0,006$ ; OR: 20,0; 95% KI: 2,05-195,0/ Frauen:  $p=0,023$ ; OR: 4,32; 95% KI: 1,30-14,38). Das Erkrankungsrisiko war nur für CatD T jedoch weder bei Männern noch bei Frauen signifikant erhöht.

Ein weiterer Hinweis für ein geschlechtsabhängiges Erkrankungsrisiko kommt von einer koreanischen Assoziationsstudie (Jhoo et al., 2005), in der festgestellt wurde, dass

das CatD T-Allel bezogene Erkrankungsrisiko für Männer höher als für Frauen ist, und wie bei Menzer et al. (2001), sich eine signifikante Interaktion zwischen CatD T und APOE 4 nur bei Männern zeigte (Daten nicht angegeben).

Die Daten dieser Untersuchung stimmen mit den genannten Ergebnissen insofern überein, als hier ein geschlechtsspezifisches Erkrankungsrisiko für CatD T bei Männern beobachtet werden konnte. In einer multiplen logistischen Regressionsanalyse für beide Geschlechter stellte sich zunächst heraus, dass das Geschlecht in seiner Interaktion mit CatD T das Erkrankungsrisiko signifikant erhöhte ( $p=0,003$ ; OR: 5,77; 95% KI: 1,78-18,66). Untersuchte man diesen Zusammenhang mit Hilfe einer Kreuztabelle, zeigte sich, dass das Erkrankungsrisiko für CatD signifikant für Männer erhöht war ( $p=0,012$ ; OR: 2,72; 95% KI: 1,23-6,00), jedoch nicht für Frauen ( $p=0,11$ ; OR: 0,58; 95% KI: 0,30-1,13). Deshalb wurde eine multiple logistische Regressionsanalyse nur für Männer durchgeführt, um so analog zu Jhoo und Menzer (Menzer et al., 2001; Jhoo et al., 2005) die Interaktion von APOE 4 und CatD bei Männern zu untersuchen. Es konnte jedoch im Gegensatz zu den beiden Autoren keine signifikante Wechselwirkung der beiden Allele festgestellt werden.

Demgegenüber stehen einige andere Assoziationsstudien, die keine geschlechtsspezifischen Unterschiede feststellen konnten (Capurso et al., 2005; Mateo et al., 2002; Papanotiropoulos et al., 1999, 2000a; Crawford et al., 2000; Li et al., 2004).

Zusammengefasst stützen die vorliegenden Ergebnisse die Ansicht, dass es sich bei dem Cathepsin D-Polymorphismus um einen geschlechtsspezifischen Risikofaktor für Männer bei Morbus Alzheimer handeln könnte. Es bleibt jedoch unklar, ob sich die genannten Hinweise für ein erhöhtes Risiko der männlichen CatD T-Allelträger auf pathophysiologische Vorgänge zurückführen lassen, oder ob sie wegen des jeweils geringen Stichprobenumfangs auf Zufall beruhen. Bisher gibt es keine pathobiochemischen Studien über einen geschlechtsabhängigen Unterschied in der Interaktion von Lysosomen oder seinen Bestandteilen und den charakteristischen neuropathologischen Veränderungen bei Morbus Alzheimer. Wie auch schon bei der Betrachtung des altersabhängigen Einflusses (s. 4.2.1.) wird klar, dass ein bedeutender limitierender Faktor für die Beurteilung dieses Sachverhaltes die Verringerung des Stichprobenumfangs bei sukzessiver Unterteilung in Untergruppen darstellt, der die Aussagekraft dieser Teilergebnisse deshalb deutlich reduziert. Um deshalb eine valide Aussage über das geschlechtsabhängige Erkrankungsrisiko für Cathepsin D zu treffen, müssten Untersuchungen an homogenen und großen Gruppen ( $n \geq 1000$ ) stattfinden.

### 4.2.3 Das APOE 4-Allel

Das APOE 4-Allel ist bis heute der einzige genetische Risikofaktor für Morbus Alzheimer (Saunders et al., 1993), der in zahlreichen Studien belegt werden konnte (Farrer et al., 1997). Auch die vorliegenden Ergebnisse entsprechen den in der Literatur angegebenen Ergebnissen (s. Kap. 3.1.3; 3.1.4; Tab. 3). Bei der Untersuchung von genetischen Suszeptibilitätsfaktoren ist es daher von Bedeutung, das Erkrankungsrisiko und die Verteilung des in Frage kommenden Risikogens in Abhängigkeit des APOE-Genotyps zu analysieren, um festzustellen, ob es sich um einen unabhängigen Risikofaktor handelt oder nicht.

Daher wurde das Vorliegen des Cathepsin D T-Allels in Abhängigkeit des APOE 4-Allels untersucht und das jeweilige Risiko bestimmt. So kam Papassotiropoulos (Papassotiropoulos et al., 1999) zu dem Schluss, das Cathepsin D unabhängig von APOE das Erkrankungsrisiko erhöht. Die Odds ratio für das Erkrankungsrisiko des APOE 4-Allels wurde mit OR: 4,1 (95% KI: 2,6-4,4) und das für APOE 4 positive CatD T-Allelträger mit OR: 2,7 (95% KI: 1,2-6,1) angegeben. Wurden beide Risiken kombiniert, so ermittelten die Autoren eine OR von 5,9 (95% KI: 2,6-12,3), was ihnen zu Folge anzeigt, dass Cathepsin D ein von APOE unabhängiger Risikofaktor sei.

Ein Hinweis für einen, wenn auch schwach ausgeprägten, synergistischen Effekt von APOE 4 und CatD kommt von einer chinesischen Studie (Li et al., 2004), in der das Erkrankungsrisiko für APOE 4 positive Individuen ohne CatD T-Allel mit OR: 3,4 (95% KI: 1,97-5,69) und für das gleichzeitige Vorkommen beider Risikoallele mit OR: 4,23 (95% KI: 1,09-16,38) angegeben wurde.

Diese Ergebnisse können jedoch anhand der hier vorliegenden Daten nicht bestätigt werden (s. Tab. 3). Die OR für das APOE 4-Allel betrug 2,5 (95% KI: 1,9-3,6). Bei Vorliegen des APOE 4-Allels betrug das Erkrankungsrisiko für das CatD T-Allel 1,9 (95% KI: 0,8-4,4) und war damit nicht erhöht. Auch der  $\chi^2$ -Test zeigte keine signifikanten Häufigkeitsunterschiede (s. Kap. 3.1.4, Tab. 3). Auch mit Hilfe der logistischen Regressionsanalyse konnte keine signifikante Wechselwirkung des APOE 4-Allels mit CatD T berechnet werden ( $p=0,094$ ).

Damit decken sich die vorliegenden Ergebnisse mit denen der übrigen Studien, die das Erkrankungsrisiko des CatD T-Allels in Abhängigkeit des APOE 4-Allels untersucht haben (Bhojak et al., 2000; Mateo et al., 2002; Matsui et al., 2002; Bertram et al., 2000, 2001; Crawford et al., 2000; Prince et al., 2001; Bagnoli et al., 2002; Ingegneri et al., 2003; Emahazion et al., 2001).

Zusammengefasst scheint das APOE 4-Allel einen von CatD T unabhängigen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko auszuüben. Es gibt bislang keinen Hinweis auf eine signifikante Wechselwirkung von CatD T und APOE 4.

### 4.3 Grenzen und Fehlerquellen genetischer Assoziationsstudien

Genetische Assoziationsstudien, die den Zusammenhang zwischen einem sog. „Single-Nucleotide-Polymorphism“ (SNP) und einer Krankheit mit komplexem Vererbungsmuster wie Diabetes Mellitus oder Morbus Alzheimer untersuchen, sind, neben Kopplungsanalysen, ein weit verbreitetes Instrument, um die Genetik dieser komplexen Krankheiten aufzuschlüsseln. Da es aufgrund technischer und logistischer Begrenzungen meistens nicht möglich ist, eine große Anzahl von SNP's an einer großen Anzahl von Individuen zu testen, beschränkt man sich in der Regel auf die Analyse einer überschaubaren Anzahl an SNP in „Kandidatengen“, von deren Genprodukten angenommen wird, dass sie in der Pathogenese der Krankheit eine wesentliche Rolle spielen, und deren Polymorphismen pathophysiologisch relevant sind. Dennoch lässt sich ein positives Ergebnis nur von wenigen, unabhängig durchgeführten Studien replizieren, was zu einer wachsenden Skepsis über den Nutzen von genetischen Assoziationsstudien (Editorial, 1999) und zu Zweifeln darüber, inwieweit sich Resultate auf andere Populationen mit verschiedenen genetischen und umweltbezogenen Faktoren übertragen lassen (Terwilliger und Goring, 2000), geführt hat.

Der Aussagefähigkeit von genetischen Assoziationsstudien sind durch bestimmte Faktoren, die zu falsch-positiven oder falsch-negativen Resultaten führen können, gewisse Grenzen gesetzt. Dazu zählt u.a. der sog. „Publication bias“, d.h. dass durch eine selektive Veröffentlichung von positiven Resultaten und der Nicht-Veröffentlichung einer (meistens) größeren Anzahl negativer Befunde ein verzerrtes Bild der tatsächlichen Auswirkung eines „Kandidatengens“ entsteht (Blomqvist et al., 2006). Eine konsequente Verpflichtung von Autoren und Zeitschriften zur Veröffentlichung von negativen Befunden (bei Einhaltung von bestimmten Qualitätsstandards) in eigens dafür geschaffenen Foren (Becker et al., 2004; Bertram et al., 2006) könnte dem entgegenwirken.

Eine Erhöhung der Stichprobengröße minimiert die Wahrscheinlichkeit einen Fehler 1. Art zu begehen, d.h. einen falsch-positiven Zusammenhang zu erkennen, der auf Zufall beruht, und verstärkt die Aussagekraft einer Studie. Logistischen Einschränkungen könnte durch kollaborative Zusammenschlüsse von Laboratorien, die sich an der Durchführung



von Multizenter Studien beteiligen oder durch die Durchführung von Meta-Analysen entgegengewirkt werden. Fehler erster Art treten aber auch dann umso wahrscheinlicher auf, je mehr Tests an um so mehr Kandidatengenomen durchgeführt werden, oder je mehr Sub-Phänotypen einer Krankheit in Bezug zu einem bestimmten Gen untersucht werden. In diesem Zusammenhang ist die Assoziationsstudie von Beyer (Beyer et al., 2005) zu nennen, in der die Stichprobe in sechs Altersgruppen von jeweils 5 Jahren Abstand unterteilt wurden, und eine signifikant positive Assoziation von CatD mit der Alzheimerschen Krankheit in der Gruppe der 70-75 jährigen beschrieben worden ist (Kap. 4.1.2.1). Möglicherweise liegt hier ein Fehler erster Art vor.

Weitere Faktoren, die den Vergleich genetischer Assoziationsstudien miteinander erschweren können und für die vorliegende Arbeit bedeutsam sind, werden im Folgenden näher beleuchtet.

#### **4.3.1 Genetischer Hintergrund der Studienpopulation**

Ein wesentlicher Grund für die unsichere Vergleichbarkeit genetischer Assoziationsstudien miteinander, liegt in der genetischen Heterogenität der zu Grunde liegenden Stichprobe begründet. Selbst Populationen einer Ethnie können sich bezüglich der Ausprägung genetischer Merkmale und der Gen-Umwelt Interaktion so deutlich voneinander unterscheiden, dass man für eine valide Risikoabschätzung eines Gens seiner Studie unterschiedliche Populationsschichten zu Grunde legen sollte.

Konkret handelt es sich hier um Bevölkerungs- und Familienbezogene Studien. Je nach Studientyp variiert der Blickwinkel, unter dem die Fragestellung betrachtet wird. Unsicherheiten in der Vergleichbarkeit sind in der Struktur des jeweiligen Studientyps begründet. Nur bei Vorliegen einer größeren Anzahl genetischer Assoziationsstudien unterschiedlichen Designs kann eine sicherere Aussage über das Für und Wider der zugrunde liegenden Hypothese getroffen werden.

Außer der Studie von Bertram (Bertram et al., 2000) haben alle anderen Gruppen bevölkerungsbezogene Fall-Kontroll-Studien durchgeführt (Vgl. Tab. 7). Diese eignen sich zwar hervorragend dazu Assoziationen aufzuspüren. Als Voraussetzung dafür muss die Stichprobenauswahl eine in ihrer Zusammensetzung heterogene Bevölkerungsgruppe umfassen. Nur so lassen sich falsch-positive Resultate, die durch ein Kopplungsungleichgewicht entstehen, minimieren (s. dazu Kap 4.3.2). Würden beispielsweise konträr dazu nur miteinander verwandte Individuen in die Analyse miteinbezogen, die beide denselben Ge-

notyp eines Polymorphismus aufweisen, so ließe sich schwer eine Aussage darüber treffen, ob das Gen unabhängig von weiteren, gemeinsam geteilten genetischen Faktoren sein Risikopotential aufweist oder nicht.

Andererseits liegt in der heterogenen Zusammensetzung der Stichprobenauswahl auch ein wesentlicher Nachteil. Suszeptibilitätsgene können bei einigen Individuen durch ihre alleinige Präsenz, d.h. unabhängig von weiteren Faktoren, den Phänotyp einer Krankheit beeinflussen. Bei anderen Individuen wiederum entfaltet derselbe Risikofaktor seine Wirkung erst durch eine komplexe synergistische Wechselwirkung mit weiteren genetischen Faktoren oder äußeren Umwelteinflüssen. Welcher Natur diese sind, hängt stark von der ethnischen Zusammensetzung einer Bevölkerung sowie von regionalen Gegebenheiten ab. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, diese mögliche Fehlerquelle zu umgehen, indem Individuen miteinander verglichen werden, die einen möglichst gemeinsamen genetischen und regionalen Hintergrund besitzen. Dies wird durch die Anwendung von Familienstudien erreicht. Von Horvath (Horvath et al., 1998) wurde erstmalig der „sibship disequilibrium test“ (SDT) vorgestellt, bei dem Geschwister miteinander verglichen werden. Spielman (Spielman et al., 1998) veröffentlichte eine Arbeit über den „sib transmission disequilibrium test“ (s-TDT). Dieser Test ist ebenfalls eine Familienstudie und bezieht die Elterngeneration ein. Bertram (Bertram et al., 2000, 2001) führte den SDT sowie den s-TDT durch, um die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese zu überprüfen. Allerdings konnte er auch mit dieser Methode keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem CatD-Polymorphismus und dem Auftreten der Alzheimerschen Krankheit feststellen (SDT:  $p=0,68$ ; s-TDT:  $p=0,81$ ).

#### **4.3.2 Kopplungsungleichgewicht**

Kopplungsungleichgewicht bedeutet, dass nicht das als Risikofaktor in Frage kommende Gen, sondern ein davon verschiedenes, chromosomal eng benachbartes und möglicherweise bisher nicht identifiziertes Gen oder ein anderer Polymorphismus innerhalb des untersuchten Gens den eigentlichen Risikofaktor darstellt, und man deshalb ein falsch positives Ergebnis erhält. Eine simple Methode, ein mögliches Kopplungsungleichgewicht auf zu decken, besteht darin bei einer positiven Assoziation, das gleiche Gen oder benachbarte Gene auf das Vorliegen weiterer Polymorphismen hin zu untersuchen.

Papassotiropoulos (Papassotiropoulos et al., 2000b) überprüfte die Hypothese, ob das Gen für Cathepsin D im Kopplungsungleichgewicht zu FE65 liegt, dessen Gen in Nach-

barschaft auf demselben Chromosom 11p15 liegt. Diese Hypothese konnte nicht bestätigt werden.

Im Cathepsin D-Gen wurden zwei weitere Polymorphismen in den Introns 5 und 8 beobachtet (Majores et al., 2002). Diese sollten ebenfalls auf eine Assoziation mit Morbus Alzheimer untersucht werden, um ein Kopplungsungleichgewicht auszuschließen.

Weitere Untersuchungen über benachbarte Genorte zum CatD-Genort sollten folgen, um der Frage nach einem Kopplungsungleichgewicht nachzugehen.

### 4.3.3 Die funktionelle Bedeutung eines Kandidatengens

Idealerweise sollte das Genprodukt eines Risikofaktors in der Pathogenese eine relevante Rolle spielen, und die genetische Veränderung dieses „Kandidatengens“ sollte eine funktionelle Konsequenz nach sich ziehen, die in der Ätiologie einer Krankheit von Bedeutung ist (Roses, 1998). Je unbedeutender die Rolle eines Genprodukts in der Pathogenese ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Gen tatsächlich einen Risikofaktor darstellt (s. Kap. 4.3).

In Kapitel 1.2.2.2 und in Kapitel 1.4.1 wurde eingehend über die vielfältigen Hinweise, die für die Rolle von CatD bei der Entstehung des Amyloid-Proteins sprechen, berichtet. Allerdings wurde bezüglich des CatD-Polymorphismus bisher nur eine Arbeit veröffentlicht, die einen direkten Zusammenhang zwischen dem Cathepsin D C/T Genotyp und einer Hypersekretion von proCatD in Brustkrebszellen beschreibt (Touitou et al., 1994). Zu beachten ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass es bisher ungenügend erforscht ist, ob und welchen biologischen Effekt der CatD 224C→T Polymorphismus auf das reife und aktive Enzym hat und ob es einen relevanten Einfluß hinsichtlich der Alzheimer Pathologie hat. Der von Touitou (Touitou et al., 1994) beobachtete Effekt wurde zudem nur an einer kleinen Anzahl von Zellproben beobachtet, und deutete nach Aussage der Autorin lediglich einen Trend an, war statistisch jedoch nicht signifikant. Deshalb muß kritisch angemerkt werden, dass der Rückschluss von diesem Ergebniss an Brustkrebszellen auf Nervenzellen (Papassotiropoulos et al., 1999) rein theoretischer Natur ist und experimentell unzureichend validiert ist.

Zwar wurde über eine Zunahme der mRNA Expression von CatD bei Alzheimer-Patienten und einer Konzentrationszunahme des Enzyms nach Zugabe von  $\beta$ -Amyloid in Neuronen berichtet (Hoffman et al., 1998; Cataldo et al., 1995). Diese Ergebnisse lassen

allerdings den CatD-Genotyp unberücksichtigt und sollten deshalb um eine Genotypisierung ergänzt werden.

Bislang wurde nur eine Arbeit veröffentlicht, die sich der biologischen Bedeutung des CatD 224C→T Polymorphismus in Exon 2 bei Morbus Alzheimer widmet. Papassotiropoulos (Papassotiropoulos et al., 2002) fand heraus, dass CatD T-Allelträger einen signifikant niedrigeren Liquorspiegel von A $\beta$ 42 aufweisen als Patienten ohne dieses Allel. Dies deutete gemäß den Autoren darauf hin, dass der CatD 224C→T Polymorphismus zu einem vermehrten Abbau von APP zu dem neurotoxischen A $\beta$ 42 durch CatD im Gehirn führe entsprechend einer vermehrten Ablage des neurotoxischen Proteins in den senilen Plaques. Erniedrigtes peripheres A $\beta$ 42 ist bereits durch Mehta (Mehta et al., 2000) bei Alzheimer-Patienten signifikant gehäuft beobachtet worden. Die Hypothese von Papassotiropoulos wird jedoch in ihrer Aussagekraft dadurch geschwächt, dass der Studie eine Zahl von nur 41 Alzheimer-Fällen und 24 Kontrollen zugrunde liegt. Zudem fehlen Angaben über gesicherte Erkenntnisse, die für einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem Liquorspiegel von  $\beta$ A42 und der Prozessierung von APP im Gehirn sprechen.

#### **4.4 Beeinflusst der Cathepsin D 224C→T Polymorphismus die neuropathologischen Veränderungen bei Morbus Alzheimer?**

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Forderung danach aufgegriffen, dass ein relevanter genetischer Risikofaktor einen biologischen Effekt in der Pathophysiologie einer Erkrankung aufweisen sollte (Roses, 1998). Bislang fehlen Studien, die einen Zusammenhang zwischen dem CatD 224C→T Polymorphismus und den neuropathologischen Veränderungen der Alzheimerschen Krankheit (Plaques, Tangle und Mikroglia) untersuchen.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal untersucht, ob diesbezüglich ein Zusammenhang existiert (s. dazu Kap. 3.2). Es konnte nicht festgestellt werden, dass das CatD T-Allel mit den Alzheimerspezifischen Veränderungen in Zusammenhang steht. Dieser Untersuchung lagen Hirnschnitte aus dem Frontal- und dem Temporallappen von 19 Alzheimer Patienten zugrunde, deren Cathepsin D-Genotyp bestimmt wurde. Morphometrische Daten über die Fläche und die Anzahl von Plaques, Tangles und aktivierten Mikrogliazellen wurden an diesen Schnitten bereits erhoben (Egensperger et al., 1998). Die Verteilung der Mittelwerte der jeweiligen Variablen wurde mit den Trägern, bzw.

Nicht-Trägern des CatD T-Allels in Beziehung gesetzt. Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (s. Kap. 3.2.1).

Die Untersuchung an den neuropathologisch diagnostizierten Fällen wurde noch durch eine immunhistochemische Doppelfärbung von Cathepsin D und  $\beta$ A4 (s. Kap. 3.2.2) ergänzt. Interessanterweise waren die  $\beta$ A4 positiven Plaques ausnahmslos auch mit CatD angefärbt. Diese Beobachtung lässt den Rückschluss darauf zu, dass CatD in den Entstehungsprozess des  $\beta$ A4 involviert sein könnte. Sie stimmt insofern mit den Ergebnissen vorangegangener histopathologischer Untersuchungen überein, die ebenfalls diese Beobachtung gemacht haben (Bernstein et al., 1989; Cataldo et al., 1990; Nakamura et al. 1991) (Kap. 1.2.2.2)

Abschließend betrachtet konnte kein Einfluss des Cathepsin D-Polymorphismus auf die neuropathologischen Veränderungen bei Morbus Alzheimer festgestellt werden. Zwar konnte der Literatur entsprechend bestätigt werden, dass in den Plaques auch Cathepsin D enthalten ist. Jedoch lassen die Ergebnisse der vorliegenden Studie keinen Rückschluss darauf zu, ob es sich dabei um einen kausalen Zusammenhang oder um ein unspezifisches Begleitphänomen handelt. Da die Sekretasen, die an der APP-Prozessierung beteiligt sind (Aguzzi und Haass, 2003) inzwischen identifiziert worden sind, erscheint die Beteiligung von CatD als wesentlicher pathophysiologischer Faktor bei der APP-Prozessierung zwar unwahrscheinlich. Dennoch untermauern die Ergebnisse aus der hier vorgestellten genetischen Assoziationsstudie die Vermutung, dass es sich bei Cathepsin D um einen geschlechtsspezifischen Risikofaktor für Männer handeln könnte (Kap. 4.2.2.). Zukünftige pathophysiologische Studien sollten daher diesen geschlechtsspezifischen Aspekt berücksichtigen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Morbus Alzheimer ist ein multifaktorielles Syndrom, dem genetisch heterogene Erkrankungen zugrunde liegen. Während bei etwa 5% der Erkrankten autosomal-dominant vererbte Gendefekte ursächlich sind, wird für 95% ein komplexes Vererbungsmuster angenommen. Neben dem mittlerweile als Suszeptibilitätsgen für die Alzheimersche Krankheit etablierten Apolipoprotein E wurden weitere Risikogene, darunter auch Cathepsin D, beschrieben.

Für das Cathepsin D-Gen wurde eine positive Assoziation einer C→T Transition in Exon 2 des Profragments mit der Alzheimerschen Krankheit beschrieben. Cathepsin D ist die Hauptprotease des endosomal-lysosomalen Systems. In diesem System findet die Prozessierung des Amyloid Precursor Proteins zu  $\beta$ -Amyloid statt, dem Hauptbestandteil der Alzheimerschen Plaques.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Assoziation zwischen dem Cathepsin D-Genotyp und Morbus Alzheimer an einer unabhängigen Stichprobe überprüft. Zum anderen wurde untersucht, ob das Cathepsin D T-Allel einen erkennbaren Einfluß auf die wesentlichen neuropathologischen Veränderungen, den amyloidhaltigen Plaques, neurofibrillären Tangles und aktivierter Mikroglia aufweist.

Im ersten Teil der Arbeit zeigte sich, dass der Cathepsin D-Polymorphismus das Erkrankungsrisiko für Männer signifikant um das bis zu sechsfache erhöht. Bei Frauen hat es dagegen keinen signifikanten Einfluss. Dieses Ergebnis stimmt mit zwei weiteren Studien überein, die ein geschlechtsspezifisches Erkrankungsrisiko von CatD für Männer berechnet haben und unterstützt die Vermutung, dass es sich bei dem Cathepsin D-Polymorphismus um einen geschlechtsspezifischen, nur bei Männern relevanten Risikofaktor für Morbus Alzheimer handeln könnte.

Die Resultate im zweiten Teil der Arbeit lieferten keinen Anhalt für einen wesentlichen pathophysiologischen Effekt des Cathepsin D T-Allels. Interessanterweise waren  $\beta$ -amyloidhaltige Läsionen immer in Verbindung mit CatD angefärbt, was dafür spricht, dass dieses Enzym in die Entstehung der amyloidhaltigen Plaques verwickelt ist.

Das geschlechtsspezifische Risiko von Cathepsin D ist bisher kaum untersucht worden. Daher sollte dieser Aspekt zukünftig genauer beleuchtet werden. So könnten mit einer Meta-Analyse der bisher erhobenen Daten, die das Geschlecht explizit berücksichtigt, wertvolle Erkenntnisse hinsichtlich dieser Frage erzielt werden. Die vorliegenden Beobachtungen untermauern weiterhin die Ansicht, dass CatD als wesentlicher Bestandteil des lysosomalen Systems in die Pathogenese des Morbus Alzheimer involviert sein könnte.

## 6 LITERATUR

- 1) Aguzzi A, Haass C (2003): Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease. *Science* 302, 814-8.
- 2) Alzheimer A (1907): Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeitschr Psychiatr.* 64, 146-8.
- 3) Andersen K, Launer LJ, Dewey ME, Letenneur L, Ott A, Copeland JR, Dartigues JF, Kragh-Sorensen P, Baldereschi M, Brayne C, Lobo A, Martinez-Lage JM, Stijnen T, Hofman A (1999): Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. *Neurology* 53, 1992-7.
- 4) Anonymous (1995): Statement on Use of Apolipoprotein E Testing for Alzheimer Disease. American College of Medical Genetics/ American Society of Human Genetics Working Group on ApoE and Alzheimer Disease. *JAMA* 274, 1627-9.
- 5) Anonymous (1998): Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. *Neurobiol.Aging* 19, 109-116.
- 6) Augereau P, Garcia M, Mattei MG, Cavailles V, Depadova F, Derocq D, Capony F, Ferrara P, Rochefort H (1988): Cloning and sequencing of the 52K cathepsin D complementary deoxyribonucleic acid of MCF7 breast cancer cells and mapping on chromosome 11. *Mol Endocrinol.* 2, 186-92.
- 7) Bagnoli S, Nacmias B, Tedde A, Guarnieri BM, Cellini E, Ciantelli M, Petrucci C, Bartoli A, Ortenzi L, Serio A, Sorbi S (2002): Cathepsin D-Polymorphism in Italian sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 328, 273-6.
- 8) Bahr BA, Bendiske J (2002): The neuropathogenic contributions of lysosomal dysfunction. *J Neurochem.* 83, 481-9.
- 9) Baner C, Braak H, Fischer P, Jellinger KA (1993): Neuropathological staging of Alzheimer lesions and intellectual status in Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett.* 162, 179-82.
- 10) Barrett AJ. Cellular proteolysis:an overview. In: Banner CDB, Nixon RA (Eds.): *Proteases and Protease Inhibitors in Alzheimer's Disease Pathogenesis. Annals of the New York Academy of Sciences* 674, S103-117. New York: New York Academy of Sciences.
- 11) Baum L, Chen L, Masliah E, Chan YS, Ng HK, Pang CP (1999): Lipoprotein lipase mutations and Alzheimer's disease. *Am J Med Genet.* 88, 136-9.
- 12) Becker, K.G., Barnes, K.C., Bright, T.J. , Wang, S.A (2004): The Genetic Association Database. *Nature Genetics* 36, 431-432.
- 13) Berg T, Gjoen T, Bakke O (1995): Physiological functions of endosomal proteolysis. *Biochem J.* 307, 313-26.
- 14) Bernstein HG, Wiederanders B, Rinne A, Dorn A (1985): Distribution of Cathepsin D immunoreactivity in the central nervous system of rat and selected brain regions of man. *Acta Histochemica* 77, 139-42.
- 15) Bernstein HG, Bruszis S, Schmidt D, Wiederanders B, Dorn A (1989): Immunodetection of Cathepsin D in neuritic Plaques found in brains of patients with dementia of Alzheimer type . *J Hirnforsch.* 30, 613-8.
- 16) Bertram L, Blacker D, Crystal A, Mullin K, Keeney D, Jones J, Basu S, Yhu S, Guenette S, McInnis M, Go R, Tanzi R (2000): Candidate genes showing no evidence for association or linkage with Alzheimer's Disease using family-based methodologies. *Experimental Gerontology* 35, 1353-1361.

- 17) Bertram L, Guenette S, Jones J, Keeney D, Mullin K, Crystal A, Basu S, Yhu S, Deng A, Rebeck GW, Hyman BT, Go R, McInnis M, Blacker D, Tanzi R (2001): No evidence for genetic association or linkage of the Cathepsin D (CTSD) exon 2 polymorphism and Alzheimer disease. *Ann Neurol* 49, 114-6.
- 18) Bertram L, McQueen M, Mullin K, Blacker D, Tanzi R (2006): The AlzGene Database. *Alzheimer Research Forum*. Available at: <http://www.alzgene.org>.
- 19) Beyer K, Lao JI, Latorre P, Ariza A (2005): Age at onset. An essential Variable for the Definition of Genetic Risk Factors for Sporadic Alzheimer's Disease. *Ann N Y Acad Sci* 1057, 260-278.
- 20) Bhojak TJ, DeKosky ST, Ganguli M, Kambh MI (2000): Genetic polymorphisms in the Cathepsin D and interleukin-6 genes and the risk of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 288, 21-4.
- 21) 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, 139-47.
- 22) Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, Rodes L, Horvath SM, Go RC, Perry R, Watson B, Jr., Bassett SS, McInnis MG, Albert MS, Hyman BT, Tanzi RE (1998): Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nature Genetics* 19-4, 357-60.
- 23) Blomqvist ME, Reynolds C, Katzov H, Feuk L, Andreasen N, Bogdanovic N, Blennow K, Brookes AJ, Prince JA (2006): Towards compendia of negative genetic association studies: an example for Alzheimer disease. *Hum Genet* 119, 29-37.
- 24) Bourne JA (1983): *Handbook of Immunoperoxidase Staining Methods*. Santa Barbara, USA: DAKO CORPORATION.
- 25) Braak H, Braak E (1991): Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239-259.
- 26) Brandi ML, Becherini L, Gennari L, Racchi M, Bianchetti A, Nacmias B, Sorbi S, Mecocci P, Senin U, Govoni S (1999): Association of the estrogen receptor alpha gene polymorphisms with sporadic Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 265, 335-8.
- 27) Brookes AJ, Howell WM, Woodburne K, Johnstone EC, Carothers A (1997): Presenilin I, Presenilin II, and VLDL-R associations in early onset Alzheimer's Disease. *Lancet* 350, 336-7.
- 28) Bullido MJ, Aldudo J, Frank A, Coria F, Avila J, Valdivieso F (2000): A polymorphism in the tau gene associated with risk for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 278, 49-52.
- 29) Cao X, Sudhof TC (2001): A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115-20.
- 30) Capurso C, Solfrizzi V, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso SA, Mastroianni F, Liaci M, Vendemi-ale G, Capurso A, Panza F (2005): The Cathepsin D-Gene exon 2 (C224T) polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in European populations. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60.8, 991-6.
- 31) Cataldo AM, Thayer CY, Bird ED, Wheelock TR, Nixon RA (1990): Lysosomal proteinase antigens are prominently localized within senile Plaques of Alzheimer's disease: evidence for a neuronal origin. *Brain Research* 513, 181-92.
- 32) Cataldo AM, Barnett JL, Berman SA, Li J, Quarless S, Bursztajn S, Lippa C, Nixon RA (1995): Gene expression and cellular content of Cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal- lysosomal system. *Neuron* 14, 671-80.



- 33) Cataldo AM, Barnett JL, Pieroni C, Nixon RA (1997): Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis. *J Neurosci.* 17(16), 6142-51.
- 34) Chevallier N, Vizzavona J, Marambaud P, Baur CP, Spillantini M, Fulcrand P, Martinez J, Goedert M, Vincent JP, Checler F (1997): Cathepsin D displays in vitro beta-secretase-like specificity. *Brain Res.* 750, 11-9.
- 35) Cole GM, Bell L, Truong QB, Saitoh T (1992): An endosomal-lysosomal pathway for degradation of amyloid precursor protein. In: Banner CDB, Nixon RA (Eds.): *Proteases and Protease Inhibitors in Alzheimer's Disease Pathogenesis.* Annals of the New York Academy of Sciences 674, S103-117. New York: New York Academy of Sciences.
- 36) Combarros O, Escribano J, Sanchez-Velasco P, Leyva-Cobian F, Oterino A, Leno C, Berciano J (1998): Association of the HLA-A2 allele with an earlier age of onset of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand.* 98, 140-1.
- 37) Combarros O, Alvarez-Arcaya A, Oterino A, Berciano J, Delgado-Rodriguez M, Pena N, Fernandez-Viadero C, Perez-Lopez JL, Setien S, Carvajal A (1999): Polymorphisms in the presenilin 1 and presenilin 2 genes and risk for sporadic Alzheimer's Disease. *J Neurol Sci* 171, 88-91.
- 38) Combarros O, Alvarez-Arcaya A, Sanchez-Guerra M, Infante J, Berciano J (2002): Candidate gene association studies in sporadic Alzheimer's disease. *Dement.Geriatr.Cogn Disord.* 14, 41-54.
- 39) Conner GE, Blobel G, Erickson AH (1987): Biogenesis of lysosomal proteinases: polypeptide chain. In: Glaumann H, Ballard FJ (Eds.): *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown*, S. 151-161, London: Academic Press.
- 40) Crawford FC, Freeman MJ, Schinka J, Abdullah LI, Richards D, Sevush S, Duara R, Mullan MJ (2000): The genetic association between Cathepsin D and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 289, 61-5.
- 41) Crawford FC, Freeman MJ, Schinka JA, Abdullah LI, Gold M, Hartman R, Krivian K, Morris MD, Richards D, Duara R, Anand R, Mullan MJ (2000): A polymorphism in the cystatin C gene is a novel risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 55, 763-8.
- 42) Cummings JL, Vinters HV, Cole GM, Khachaturian ZS (1998): Alzheimer's disease: Etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurology* 51, S2-S17
- 43) 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. *Ann Neurol.* 46, 664-7.
- 44) Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, Smith DW, Graham S, O'Dowd G, Bowery BJ, Boyce S, Trumbauer ME, Chen HY, van der Ploeg LH, Sirinathsinghji DJ (1999): Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* 90, 1-13.
- 45) De Strooper B (2003): Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38, 9-12.
- 46) Dickson, DW (1997): The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 321-339.
- 47) Dodel RC, Du Y, Bales KR, Gao F, Eastwood B, Glazier B, Zimmer R, Cordell B, Hake A, Evans R, Gallagher-Thompson D, Thompson LW, Tinklenberg JR, Pfefferbaum A, Sullivan EV, Yesavage J, Alstiel L, Gasser T, Farlow MR, Murphy GM Jr, Paul SM (2000): Alpha2 macroglobulin and the risk of Alzheimer's disease. *Neurology* 54, 438-42.
- 48) Du Y, Dodel RC, Eastwood BJ, Bales KR, Gao F, Lohmuller F, Muller U, Kurz A, Zimmer R, Evans RM, Hake A, Gasser T, Oertel WH, Griffin WS, Paul SM, Farlow MR (2000): Association of an interleukin 1 alpha polymorphism with Alzheimer's disease. *Neurology* 55, 480-3.

- 49) Editorial (1999): Freely associating. *Nature Genetics* 22, 1-2.
- 50) Egensperger R, Kosel S, von Eitzen U, Graeber MB (1998): Microglial activation in Alzheimer disease: Association with APOE-Genotype. *Brain Pathol.* 8, 439-47.
- 51) Emahazion T, Feuk L, Jobs M, Sawyer SL, Fredman D, St Clair D, Prince JA, Brookes AJ (2001): SNP association studies in Alzheimer's disease highlight problems for complex disease analysis. *Trends Genet.* 17, 407-13.
- 52) Esler WP, Wolfe MS (2001): A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces. *Science* 293, 1449-54.
- 53) Evans DA, Beckett LA, Field TS, Feng L, Albert MS, Bennett DA, Tycko B, Mayeux R (1997): Apolipoprotein E epsilon 4 and incidence of Alzheimer's Disease in a community population of older persons. *JAMA* 277, 822-824.
- 54) Evin G, Cappai R, Li QX, Culvenor JG, Small DH, Beyreuther K, Masters CL (1995): Candidate gamma-secretases in the generation of the carboxyl terminus of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid: possible involvement of cathepsin D. *Biochemistry.* 34, 14185-92.
- 55) Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM (1997): Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 278, 1349-56.
- 56) Faust PL, Kornfeld S, Chirgwin JM (1985): Cloning and sequence analysis of cDNA for human Cathepsin D. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 82, 4910-4.
- 57) Feuk L, Prince JA, Breen G, Emahazion T, Carothers A, St Clair D, Brookes AJ (2000): apolipoprotein-E dependent role for the FAS receptor in early onset Alzheimer's disease: finding of a positive association for a polymorphism in the TNFRSF6 gene. *Hum Genet.* 107, 391-6.
- 58) Gearing M, Mirra SS, Hedreen JC, Sumi SM, Hansen LA, Heyman A (1995): The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). 10. Neuropathology confirmation of the clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology* 45, 461-466.
- 59) George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, Myers RH, Feldman RG, Pollen D, Drachman D (1987): The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 235, 885-90.
- 60) 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* 394, 704-6.
- 61) Golde TE, Estus S, Younkin LH, Selkoe DJ, Younkin SG (1992): Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* 255, 728-730.
- 62) Grimaldi LM, Casadei VM, Ferri C, Veglia F, Licastro F, Annoni G, Biunno I, De Bellis G, Sorbi S, Mariani C, Canal N, Griffin WS, Franceschi M (2000): Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism. *Ann Neurol.* 47, 361-5.
- 63) Gruninger-Leitch F, Schlatter D, Kung E, Nelbock P, Dobeli H (2002): Substrate and inhibitor profile of BACE (beta-secretase) and comparison with other mammalian aspartic proteases. *J Biol Chem.* 277, 4687-93.
- 64) Hardy J, Selkoe DJ (2002): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-6.

- 65) Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA (2003): Alzheimer Disease in the U.S. population: Prevalence estimates using the 2000 Census. *Arch Neurol* 60, 1119-1122.
- 66) Helbecque N, Berr C, Cotel D, Fromentin-David I, Sazdovitch V, Ricolfi F, Ducimetiere P, Di Menza C, Amouyel P (2001): VLDL receptor polymorphism, cognitive impairment, and dementia. *Neurology* 56, 1183-8.
- 67) Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretzschmar H, Sisodia S, Muller U (2004): Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J.* 23, 4106-4115.
- 68) Heston LL, Orr HT, Rich SS, White JA (1991): Linkage of an Alzheimer disease susceptibility locus to markers on human chromosome 21. *Am J Med Genet.* 40, 449-53.
- 69) Hoffman KB, Bi X, Pham JT, Lynch G (1998): Beta-amyloid increases Cathepsin D levels in hippocampus. *Neurosci Lett* 250, 75-8.
- 70) Horvath S, Laird NM (1998): A discordant-sibship test for disequilibrium and linkage: no need for parental data. *Am.J Hum.Genet.* 63,1886-97.
- 71) Hu Q, Kukull WA, Bressler SL, Gray MD, Cam JA, Larson EB, Martin GM, Deeb SS (1998): The human FE65 gene: genomic structure and an intronic biallelic polymorphism associated with sporadic dementia of the Alzheimer type. *Hum Genet.* 103, 295-303.
- 72) Hyman BT, Trojanowski JQ (1997): Editorial on consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute working group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 56, 1095-1097
- 73) Ingegneri T, Nocentini G, Mariani E, Spazzafumo L, Polidori MC, Cherubini A, Catani M, Cadini D, Senin U, Mecocci P (2003): Cathepsin D-Polymorphism in Italian elderly subjects with sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 16, 151-5.
- 74) Jhoo JH, Park WY, Kim KW, Lee KH, Lee DY, Youn JC, Choo IH, Seo JS, Woo JI (2005): Lack of association of Cathepsin D-Genetic polymorphism with Alzheimer's disease in Koreans. *Arch Gerontol Geriatr.* 41, 121-7.
- 75) Ji Y, Urakami K, Wada-Isoe K, Adachi Y, Nakashima K (2000): Estrogen receptor gene polymorphisms in patients with Alzheimer's disease, vascular dementia and alcohol-associated dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 11, 119-22.
- 76) Jorm AF, Jolley D (1998): The incidence of dementia. *Neurology* 51, 728-33.
- 77) Kamal A, Stokin GB, Yang Z, Xia CH, Goldstein LS (2000): Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* 28, 449-459.
- 78) Kamboh MI, Sanghera DK, Ferrell RE, DeKosky ST (1995): APOE\*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by alpha 1-antichymotrypsin polymorphism. *Nat Genet* 10, 486-8. Erratum in: *Nat Genet.* 11, 104.
- 79) 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.
- 80) Kang DE, Pietrzik CU, Baum L, Chevallier N, Merriam DE, Kounnas MZ, Wagner SL, Troncoso JC, Kawas CH, Katzman R, Koo EH (2000): Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J Clin Invest* 106, 1159-66.

- 81) Kehoe PG, Russ C, McIlory S, Williams H, Holmans P, Holmes C, Liolitsa D, Vahidassr D, Powell J, McGleenon B, Liddell M, Plomin R, Dynan K, Williams N, Neal J, Cairns NJ, Wilcock G, Passmore P, Lovestone S, Williams J, Owen MJ (1999): Variation in DCP1, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease. *Nat Genet.* 21, 71-2.
- 82) Khachaturian ZS (1985): Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch.Neurol* 42, 1097-1105
- 83) Kohnken RE, Lador US, Wang GT, Holzman TF, Miller BE, Krafft GA (1995): Cathepsin D from Alzheimer's-diseased and normal brains. *Exp Neurol.* 133, 105-12.
- 84) Kojro E, Fahrenholz F (2005): The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Subcell. Biochem.* 38, 105-127.
- 85) Kolsch H, Ptok U, Majores M, Schmitz S, Rao ML, Maier W, Heun R (2004): Putative association of polymorphism in the mannose 6-phosphate receptor gene with major depression and Alzheimer's disease. *Psychiatr Genet.* 14, 97-100.
- 86) Koster MN, Dermaut B, Cruts M, Houwing-Duistermaat JJ, Roks G, Tol J, Ott A, Hofman A, Munteanu G, Breteler MMB, van Duijn CM, Van Broeckhoven C (2000): The  $\alpha$ 2-macroglobuline gene in AD, A population-based study and meta-analysis. *Neurology* 55, 678-84.
- 87) Lador US, Snyder SW, Wang GT, Holzman TF, Krafft GA (1994): Cleavage at the amino and carboxyl termini of Alzheimer's amyloid-beta by cathepsin D. *J Biol Chem.* 269, 18422-8.
- 88) Lambert JC, Mann D, Goumidi L, Harris J, Pasquier F, Frigard B, Cottel D, Lendon C, Iwatsubo T, Amouyel P, Chartier-Harlin MC (2000): A FE65 polymorphism associated with risk of developing sporadic late-onset Alzheimer's disease but not with Abeta loading in brains. *Neurosci Lett.* 293, 29-32.
- 89) 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. *Hum Mol Genet.* 6, 1933-6.
- 90) 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* 269, 973-7.
- 91) Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E (2001): Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science.* 293, 1487-91.
- 92) Li XQ, Chen D, Zhang ZX, Qu QM, Zhang JW (2004): Association between Cathepsin D-Polymorphism and Alzheimer's disease in a Chinese Han population. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 18, 115-9.
- 93) Lilius L, Froelich Fabre S, Basun H, Forsell C, Axelman K, Mattila K, Andreadis A, Viitanen M, Winblad B, Fratiglioni L, Lannfelt L (1999): Tau gene polymorphisms and apolipoprotein E epsilon4 may interact to increase risk for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 277, 29-32.
- 94) Majores M, Kolsch H, Bagli M, Papassotiropoulos A, Lohmann PL, Schmitz S, Rao ML, Maier W, Heun R (2002): Cathepsin D: screening for new polymorphisms using single-strand conformation polymorphism analysis. *Int.J Mol.Med* 9, 185-7.
- 95) Marlow L, Cain M, Pappolla MA, Sambamurti K (2003): Beta-secretase processing of the Alzheimer's amyloid protein precursor (APP). *J. Mol. Neurosci.* 20, 233-239.
- 96) Mateo I, Sanchez-Guerra M, Combarros O, Llorca J, Infante J, Gonzalez-Garcia J, del Molino JP, Berciano J (2002): Lack of association between Cathepsin D-Genetic polymorphism and Alzheimer disease in a Spanish sample. *Am.J Med Genet.* 114, 31-3.

- 97) Matsubara M, Yamagata H, Kamino K, Nomura T, Kohara K, Kondo I, Miki T (2001): Genetic association between Alzheimer disease and the alpha-synuclein gene. *Dement Geriatr Cogn Disord* 12, 106-9.
- 98) Matsui T, Morikawa Y, Tojo M, Okamura N, Maruyama M, Hirai H, Chiba H, Matsushita S, Higuchi S, Arai H, Sasaki H (2001): Cathepsin D-Polymorphism not associated with Alzheimer's disease in Japanese. *Ann Neurol* 49, 544-5.
- 99) Mattila KM, Axelman K, Rinne JO, Blomberg M, Lehtimäki T, Laippala P, Roytta M, Viitanen M, Wahlund L, Winblad B, Lannfelt L (2000a): Interaction between estrogen receptor 1 and the epsilon4 allele of apolipoprotein E increases the risk of familial Alzheimer's disease in women. *Neurosci Lett* 282, 45-8.
- 100) Mattila KM, Rinne JO, Roytta M, Laippala P, Pietilä T, Kalimo H, Koivula T, Frey H, Lehtimäki T (2000b): Dipeptidyl carboxypeptidase 1 (DCP1) and butyrylcholinesterase (BCHE) gene interactions with the apolipoprotein E epsilon4 allele as risk factors in Alzheimer's disease and in Parkinson's disease with coexisting Alzheimer pathology. *J Med Genet* 37, 766-70.
- 101) McCusker SM, Curran MD, Dynan KB, McCullagh CD, Urquhart DD, Middleton D, Patterson CC, McIlroy SP, Passmore AP (2001): Association between polymorphism in regulatory region of gene encoding tumour necrosis factor alpha and risk of Alzheimer's disease and vascular dementia: a case-control study. *Lancet* 357, 436-9.
- 102) McIlroy SP, Vahidassr MD, Savage DA, Patterson CC, Lawson JT, Passmore AP (1999a): Risk of Alzheimer's disease is associated with a very low-density lipoprotein receptor genotype in Northern Ireland. *Am J Med Genet* 88, 140-4.
- 103) McIlroy SP, Dynan KB, McGleenon BM, Lawson JT, Passmore AP (1999b): Cathepsin D-Gene exon 2 polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 273, 140-1.
- 104) 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, 939-44.
- 105) Mehta PD, Pirttilä T, Mehta SP, Sersen EA, Aisen PS, Wisniewski HM (2000): Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 57, 100-5.
- 106) Menzer G, Müller-Thomsen T, Meins W, Alberici A, Binetti G, Hock C, Nitsch RM, Stoppe G, Reiss J, Finckh U (2001): Non-replication of association between Cathepsin D-Genotype and late onset Alzheimer disease. *Am. J Med Genet* 105, 179-82.
- 107) 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, 321-2.
- 108) Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G, Berg L (1991): The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41, 479-86.
- 109) Montoya SE, Aston CE, DeKosky ST, Kamboh MI, Lazo JS, Ferrell RE (1998): Bleomycin hydrolase is associated with risk of sporadic Alzheimer's disease. *Nat Genet* 17, 211-2. Erratum in: *Nat Genet* 18, 404.
- 110) Mortimer JA, van Duijn CM, Chandra V, Fratiglioni L, Graves AB, Rocca WA (1991): Head trauma as a risk factor for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURO-DERM Risk factors research group. *Int J Epidemiol* 20, S28-35.
- 111) Müller U, Kins S (2002): APP on the move. *Trends Mol. Med.* 8, 152-155.

- 112) Nakamura Y, Takeda M, Suzuki H, Hattori H, Tada K, Hariguchi S, Hashimoto S, Nishimura T (1991): Abnormal distribution of Cathepsins in the brain of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 130, 195-8.
- 113) Nakano K, Ohta S, Nishimaki K, Miki T, Matuda S (1997): Alzheimer's disease and DLST genotype. *Lancet* 350, 1367-8.
- 114) Namekata K, Imagawa M, Terashi A, Ohta S, Oyama F, Ihara Y (1997): Association of transferrin C2 allele with late-onset Alzheimer's disease. *Hum Genet.* 101, 126-9.
- 115) Nicoll JA, Mrak RE, Graham DI, Stewart J, Wilcock G, MacGowan S, Esiri MM, Murray LS, Dewar D, Love S, Moss T, Griffin WS (2000): Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*47, 365-8.
- 116) Nixon RA, Mathews PM, Cataldo AM (2001): The neuronal endosomal-lysosomal system in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 3, 97-107.
- 117) Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM (2003): Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 24, 1063-70.
- 118) Okuizumi K, Onodera O, Namba Y, Ikeda K, Yamamoto T, Seki K, Ueki A, Nanko S, Tanaka H, Takahashi H, Oyanagi K, Mizusawa H, Kanazawa I, Tsuji S (1995): Genetic association of the very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene with sporadic Alzheimer's disease. *Nat Genet* 11, 207-9.
- 119) Ott A, van Rossum CT, van Harskamp F, van de Mheen H, Hofman A, Breteler MM (1999): Education and the incidence of dementia in a large population-based study: The Rotterdam Study. *Neurology.* 52, 663-66.
- 120) Ott BR (2002): Medical treatment of Alzheimer's disease: past, present, and future. *Med Health R.I.* 85, 210-2.
- 121) Panegyres PK, Mamotte CD, Vasikaran SD, Wilton S, Fabian V, Kakulas BA (1999): Butyrylcholinesterase K variant and Alzheimer's disease. *J Neurol.* 246, 369-70.
- 122) Papassotiropoulos A, Bagli M, Feder O, Jessen F, Maier W, Rao ML, Ludwig M, Schwab SG, Heun R (1999): Genetic polymorphism of Cathepsin D is strongly associated with the risk for developing sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 262, 171-4.
- 123) Papassotiropoulos A, Bagli M, Kurz A, Kornhuber J, Forstl H, Maier W, Pauls J, Lautenschlager N, Heun R (2000a): A genetic variation of cathepsin D is a major risk factor for Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 47, 399-403.
- 124) Papassotiropoulos A, Bagli M, Becker K, Jessen F, Maier W, Rao ML, Ludwig M, Heun R (2000b): No association between an intronic biallelic polymorphism of the FE65 gene and Alzheimer's disease. *Int J Mol Med.* 6, 587-9.
- 125) Papassotiropoulos A, Lewis HD, Bagli M, Jessen F, Ptok U, Schulte A, Shearman MS, Heun R (2002): Cerebrospinal fluid levels of beta-amyloid(42) in patients with Alzheimer's disease are related to the exon 2 polymorphism of the Cathepsin D-Gene. *Neuroreport* 13, 1291-4.
- 126) Payami H, Schellenberg GD, Zareparsis S, Kaye J, Sexton GJ, Head MA, Matsuyama SS, Jarvik LF, Miller B, McManus DQ, Bird TD, Katzman R, Heston L, Norman D, Small GW (1997): Evidence for association of HLA-A2 allele with onset age of Alzheimer's disease. *Neurology* 49, 512-8.
- 127) Prince JA, Feuk L, Sawyer SL, Gottfries J, Ricksten A, Nagga K, Bogdanovic N, Blennow K, Brookes AJ (2001): Lack of replication of association findings in complex disease: an analysis of 15 polymorphisms in prior candidate genes for sporadic Alzheimer's disease. *Eur J Hum Genet.* 9, 437-44.

- 128) Redecker B, Heckendorf B, Grosch HW, Mersmann G, Hasilik A (1991): Molecular organization of the human Cathepsin D-Gene. *DNA and Cell Biology* 10, 423-31.
- 129) Reid WA, Valler MJ, Kay J (1986): Immunolocalization of Cathepsin D in normal and neoplastic human tissues. *J Clin Pathol.* 39, 1323-30.
- 130) Richard F, Fromentin-David I, Ricolfi F, Ducimetiere P, Di Menza C, Amouyel P, Helbecque N (2001): The angiotensin I converting enzyme gene as a susceptibility factor for dementia. *Neurology* 56, 1593-5.
- 131) Rocca WA, Hofman A, Brayne C, Breteler MM, Clarke M, Copeland JR, Dartigues JF, Engedal K, Hagnell O, Heeren TJ (1991): Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM- Prevalence Research Group. *Ann Neurol* 30, 381-90.
- 132) Roses AD (1995): Apolipoprotein E genotyping in the differential diagnosis, not prediction, of Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 38, 6-14.
- 133) Roses, AD (1997): Genetic testing for Alzheimer Disease. Practical and ethical Issues. *Arch Neurol* 54, 1226-1229.
- 134) Roses, AD (1998): Genetic associations. *Lancet.* 351, 9106-916.
- 135) Sampietro M, Caputo L, Casatta A, Meregalli M, Pellagatti A, Tagliabue J, Annoni G, Vergani C (2001): The hemochromatosis gene affects the age of onset of sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22, 563-8.
- 136) Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ. (1993): Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1467-72.
- 137) Selkoe DJ (2001): Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J Alzheimer Dis* 3, 75-80.
- 138) 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* 375, 754-60.
- 139) Spielman RS, Ewens WJ (1998): A sibship test for linkage in the presence of association: the sib transmission/disequilibrium test. *Am.J Hum.Genet.* 62, 450-8.
- 140) Stewart R (2000): Risk factors for dementia. *Alzheimer's Dis Int Fact Sheet.* 9, 1-2.
- 141) Styczynska M, Religa D, Pfeffer A, Luczywek E, Wasiaak B, Styczynski G, Peplonska B, Gabryelewicz T, Golebiowski M, Kobrys M, Barcikowska M (2003): Simultaneous analysis of five genetic risk factors in Polish patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 344, 99-102.
- 142) Suzuki K, Terry RD (1967): Fine structural localization of acid phosphatase in senile plaques in Alzheimer's presenile dementia. *Acta Neuropathol (Berl).* 8, 276-84.
- 143) Tanzi RE (1999): A genetic dichotomy model for the inheritance of Alzheimer's disease and common age-related disorders. *J Clin Invest* 104, 1175-9.
- 144) Terwilliger JD, Goring HH (2000): Gene mapping in the 20th and 21st centuries: statistical methods, data analysis, and experimental design. *Hum Biol.* 72, 63-132.
- 145) The NCBI handbook [Internet] (2002). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Genes and Disease. Online-Publikation: <http://ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>

- 146) Touitou I, Capony F, Brouillet JP, Rochefort H (1994): Missense polymorphism (C/T224) in the human Cathepsin D pro-fragment determined by polymerase chain reaction--single strand conformational polymorphism analysis and possible consequences in cancer cells. *Eur J Cancer* 30A, 390-4.
- 147) Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC (2003): Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol.* 70, 1-32.
- 148) Uryu K, Laurer H, McIntosh T, Pratico D, Martinez D, Leight S, Lee VM, Trojanowski JQ (2002): Repetitive mild brain trauma accelerates Abeta deposition lipid peroxidation, and cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci*, 22, 446-54.
- 149) von Koch CS, Zheng H, Chen H, Trumbauer M, Thinakaran G, van der Ploeg LH, Price DL, Sisodia SS (1997): Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol. Aging* 18, 661-669.
- 150) Whitaker JN, Terry LC, Whetsell WO, Jr (1981): Immunocytochemical localization of Cathepsin D in rat neural tissue. *Brain Research* 216, 109-24.
- 151) Wiebusch H, Poirier J, Sevigny P, Schappert K (1999): Further evidence for a synergistic association between APOE epsilon4 and BCHE-K in confirmed Alzheimer's disease. *Hum Genet.* 104, 158-63.
- 152) Wragg M; Hutton M, Talbot C (1996): The Alzheimer's Disease Collaborative Group. Genetic Association between intronic polymorphism in preseniline-1 gene and late-onset Alzheimer's Disease. *Lancet* 347, 509-12.
- 153) Xia Y, Rohan de Silva HA, Rosi BL, Yamaoka LH, Rimmler JB, Pericak-Vance MA, Roses AD, Chen X, Masliah E, DeTeresa 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. *Ann Neurol.* 40, 207-15.
- 154) Yasuda M, Hirono N, Maeda K, Imamura T, Mori E, Tanaka C (1999): Case-control study of preseniline 1 intronic polymorphism in sporadic early and late onset Alzheimer's Disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66, 722-6



## 7 ANHANG

### 7.1 Abkürzungen

A2M	Alpha-2-Macroglobulin
ACh	Acetylcholin
AChE-I	Acetylcholinesterase-Inhibitor
APOE	Apolipoprotein E
APOE4	Apolipoprotein E $\epsilon$ 4-Allel
APP	Amyloid Precursor Protein
$\beta$ A4	$\beta$ -Amyloid-Protein
$\beta$ A40	$\beta$ -Amyloid-Protein mit 40 Aminosäuren
$\beta$ A42	$\beta$ -Amyloid-Protein mit 42 Aminosäuren
CatD	Cathepsin D
cDNS	complementary Desoxyribonucleinsäure
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DP	diffuse Plaques
EOAD	Early Onset Alzheimer's Disease
LOAD	Late Onset Alzheimer's Disease
mRNS	Messenger Ribonucleinsäure
NFT	neurofibrilläre Tangles
NMDA	N-methyl-D-aspartat Rezeptor
NP	neuritische Plaques
OR	Odds Ratio
P	statistischer Signifikanzwert
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PHF	Paired helical filaments
proCatD	proCathepsin D
PSEN1	Präsenilin 1
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
SDT	Sibship Disequilibrium Test
SP	senile Plaques
s-TDT	Sib Transmission Disequilibrium Test

## 7.2 Danksagung

Bei allen, die zum Gelingen und Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich herzlich bedanken. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Rupert Egensperger, der mich vorbildlich unterstützt hat, und von dem ich sehr viel Wertvolles über wissenschaftliches Arbeiten gelernt habe.

Großen Dank möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Markus Neuhäuser und Herrn Dipl.-Psych. Michael Specka für die statistische Beratung aussprechen.

Desweiteren möchte ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. med. Markus Jüptner für seine Unterstützung danken.

Für die mentale Unterstützung und für die großartige Hilfe bei der technischen Ausführung beim Schreiben möchte ich meiner Frau Ute Aufmkolk und meiner Tochter Mine ganz herzlich danken.

Bei Frau Annette Fischer bedanke ich mich für Korrekturarbeiten.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern, meiner Schwester Özlem, und Lui dafür danken, dass sie immer für mich da sind.

Diese Arbeit widme ich meiner Großmutter Ayse Anneanne.

### 7.3 Lebenslauf

Name: Özgür Albayrak, wohnhaft in Essen  
Geburtsdatum: 30.08.1974  
Geburtsort: Springe

#### SCHULE

1981-1987: Grundschule und Orientierungsstufe in Springe  
1987-1994: Otto-Hahn-Gymnasium Springe, Allgemeine Hochschulreife  
  
1994-1995: Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz in Springe

#### HOCHSCHULE

1995-2002: Studium der Humanmedizin an der  
Medizinischen Hochschule Hannover

#### PRAKTISCHES JAHR

Innere Medizin, Nephrologisches Zentrum, Hann.-Münden  
Unfallchirurgie, Hopital Européen Georges Pompidou, Paris  
Abdominalchirurgie, Hopital EGP, Paris  
Kinderherzchirurgie, Hopital Necker-Enfants Malades, Paris  
Kinderheilkunde, Kinderkrankenhaus auf der Bult, Hannover

#### BERUFLICHE TÄTIGKEIT

2002-2003: Kinderchirurgie, Ruhr-Universität Bochum,  
Marienhospital Herne  
2003-2005: Allgemeine Chirurgie, St. Josefs Hospital, Bochum-Linden  
2005-2007: Psychiatrie und Psychotherapie, Universität Duisburg-Essen,  
Rheinische Kliniken Essen  
Seit April 2007: Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendal-  
ters, Universität Duisburg-Essen, Rheinische Kliniken Essen

## EIGENE PUBLIKATION

Albayrak Ö, Krug S, Scherbaum N (2007): Sex-specific aspects of addiction [Article in German]. MMW Fortschr Med 14, 29-32.

Albayrak O, Friedel S, Hinney A, Schimmelmann BG, Hebebrand J (2008): Genetic aspects in attention deficit/ hyperactivity disorder. J Neural Transm 115 (2), 305-315.

## POSTERPRÄSENTATION

Jahreskongress der „American Association of Geriatric Psychiatry“, 01. – 04. März 2007, New Orleans, USA.

Postertitel: “The cathepsin D (224C→T) polymorphism confers an increased risk to develop Alzheimer`s disease in men”.