

Aus der  
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. P. Falkai

**Einfluss genetischer Variationen RNA-bindender Proteine auf die Alzheimer  
Demenz und relevante kognitive Endophänotypen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Barbara Plagg

aus  
Brixen

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dan Rujescu

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Christof Haffner  
                            Priv. Doz. Dr. Sven Lammich

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. biol. hum. Annette Hartmann

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2016

*Lia, Waldtraud und Jörg gewidmet*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
2.1 Definition der Alzheimer Demenz .....	3
2.2 Historische Aspekte der Alzheimer Demenz .....	3
2.3 Epidemiologie .....	7
2.4 Klassifikation demenzieller Erkrankungen.....	8
2.4.1 Primäre und sekundäre Demenzen .....	8
2.4.2 Kortikale, subkortikale und frontale Demenzen.....	10
2.5 Histologische Einteilung primär degenerativer Demenzen .....	11
2.6 Demenz bei Morbus Alzheimer .....	12
2.6.1 Diagnosekriterien .....	13
2.6.2 Verlauf .....	17
2.6.3 Risikofaktoren.....	18
2.6.4 Pathologie der Alzheimer Demenz.....	19
2.6.4.1 Hypothesen.....	20
2.6.4.2 Makroskopische Veränderungen.....	20
2.6.4.3 Neurofibrillen.....	21
2.6.4.4 Amyloide Plaques.....	23
2.6.4.5 Synapsenverlust.....	27
2.6.4.6 Neuronenverlust.....	28
2.6.4.7 Immunologische Faktoren der Alzheimer Demenz .....	30
2.6.4.8 Oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion.....	31
2.6.4.9 Vaskuläre Komponenten der Alzheimer Demenz.....	33
2.7 Genetik der Alzheimer Demenz.....	34
2.7.1 Familiäre Form der Alzheimer Demenz.....	35
2.7.1.1 Präsenilin-1 und Präsenilin-2.....	35
2.7.1.2 Amyloid Precursor Protein.....	37
2.7.2 Sporadische Form der Alzheimer Demenz.....	39
2.7.2.1 Aktuelle Suszeptibilitätsgene.....	39
2.8 RNA-bindende Proteine.....	42
2.9 Spleißen.....	44
2.9.1 Spleißosom.....	46
2.9.2 Exonerkennung.....	47
2.10 HnRNPs.....	48
2.10.1 Struktur und Einteilung der hnRNPs.....	49
2.10.2 RNA-Bindungsdomänen.....	51

2.10.3 Shuttling.....	52
2.10.4 HNRNPA2B1.....	52
2.10.5 HNRNPH3.....	55
2.10.6 PCBP2.....	55
2.11 ELAVL4.....	56
<b>3 Fragestellung.....</b>	<b>60</b>
<b>4 Material und Methoden.....</b>	<b>62</b>
4.1 Studienmodalitäten.....	62
4.2 Vorbedingungen.....	62
4.2.1 Alzheimer Patienten.....	63
4.2.2 Kontrollprobanden.....	64
4.3 Neuropsychologische Untersuchung.....	64
4.3.1 Mini Mental State Examination.....	65
4.3.2 CERAD.....	66
4.4 Laborverfahren.....	69
4.4.1 Gewinnung des Genmaterials.....	69
4.4.1.1 DNA-Extraktion.....	69
4.4.1.2 Bestimmung und Einstellung der DNA-Konzentration.....	70
4.4.2 Genotypisierung.....	71
4.4.2.1 Bestimmung der APOE Epsilon Allele.....	72
4.4.2.2 SNP Auswahl und Assay Design.....	72
4.4.2.3 Das iPLEX-Verfahren.....	74
4.4.2.4 Initiale PCR.....	75
4.4.2.5 Dephosphorylierung.....	77
4.4.2.6 iPLEX-Primerextensionsreaktion.....	79
4.4.2.7 Entsalzung der Reaktionsprodukte.....	81
4.4.2.8 Messung im MALDI-TOF.....	82
4.4.2.9 Qualitätskontrolle der Genotypisierung.....	83
4.5 Statistische Methoden.....	84
<b>5 Ergebnisse.....</b>	<b>86</b>
5.1 Gesamtstichprobenanalyse.....	86
5.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	89
5.3 Genotypverteilung.....	92
5.4 Einzel-SNP-Analyse im Hinblick auf eine Assoziation mit der Alzheimer Demenz.....	95
5.4.1 Allel- und Genotypverteilung in der Gruppe der Alzheimerpatienten.....	95

5.4.2 Allel- und Genotypverteilung in der EOAD- und LOAD-Gruppe.....	98
5.5 Assoziation der Polymorphismen mit Subtests der CERAD und dem MMSE.....	102
5.5.1 MMSE.....	103
5.5.2 Boston Naming Test (CERAD).....	104
5.5.3 Wortliste Gedächtnis (CERAD).....	107
5.5.4 Wortliste abrufen (CERAD).....	109
5.5.5 Wortliste erkennen (CERAD).....	111
5.6 Haplotypanalyse.....	113
5.6.1 Haplotypverteilungsanalyse auf eine Assoziation mit der Alzheimer Demenz.....	114
5.6.2 Assoziation der Haplotypverteilung mit Subtests der CERAD und dem MMSE.....	117
5.6.2.1 HNRNPA2B1.....	117
5.6.2.2 ELAVL4.....	118
5.6.2.3 PCBP2.....	119
<b>6 Diskussion</b> .....	120
6.1 HNRNPA2B1.....	120
6.2 HNRNPH3.....	124
6.3 PCBP2.....	125
6.4 ELAVL4.....	128
6.5. Inhaltliche Interpretation der Ergebnisse.....	130
6.6 Diskussion der Methoden.....	132
6.6.1 Diagnoseverfahren und Einschlusskriterien.....	132
6.6.2 Ethnische Abstammung.....	133
6.6.3 Studiendesign.....	134
6.7 Ausblick.....	136
<b>7 Abkürzungsverzeichnis</b> .....	138
<b>8 Literaturverzeichnis</b> .....	141
<b>9 Danksagung</b> .....	172

## 1 Zusammenfassung

Die Alzheimer Demenz (AD) ist eine degenerative zerebrale Erkrankung, die klinisch durch den gravierenden Verlust vielfältiger kognitiver Fähigkeiten gekennzeichnet ist. Ein geringer Prozentsatz (<5%) der familiären AD kann auf monogenetisch bedingte Mutationen, die autosomal-dominant vererbt werden, zurückgeführt werden. Für den überwiegenden Teil der sporadisch auftretenden AD ist die multifaktorielle Ätiopathogenese weitgehend unbekannt, wobei eine genetische Vulnerabilität als risikomodulierender Faktor den Ausbruch der Erkrankung begünstigt. Bislang wurden einzelne chromosomal Loci mit moderaten Beiträgen zur phänotypischen Ausprägung der Erkrankung identifiziert.

RNA-bindende Proteine (RBPs) verantworten die korrekte RNA-Prozessierung und gewährleisten damit eine funktional richtig verlaufende Genexpression. Mutationen in RBPs führen zu einer Reihe von schwerwiegenden, vorwiegend neurologischen Erkrankungen. Mit zunehmenden Verständnis von Funktion und Struktur der RBPs verdichten sich die Hinweise auf eine Beteiligung an der AD-Ausprägung: einzelne RBPs konnten ursächlich mit neurodegenerativen Erkrankungen bzw. der frontotemporalen Lobärdegeneration in Verbindung gebracht werden.

In der vorliegenden Fall-Kontroll-Assoziationsstudie wurde der Zusammenhang zwischen 19 Polymorphismen von vier Genen, die für RNA-bindende Proteine codieren (HNRNPA2B1, HNRNPH3, PCBP2 und ELAVL4) und der AD an 323 AD-Patienten und 677 gesunden Kontrollprobanden untersucht. Die Diagnose einer AD erfolgte nach den NINCDS-ADRDA Kriterien. Eine Unterteilung der Patienten in EOAD (Early-Onset Alzheimer's Disease) bzw. LOAD (Late-Onset Alzheimer's Disease) erfolgte im Sinne einer homogeneren Subgruppierung und sollte eine aussagekräftigere Assoziation der genetischen Vulnerabilitätsmarker ermöglichen. In die Kontrollgruppe wurden ausschließlich gesunde Probanden ohne dementielle Erkrankungen in der Familie eingeschlossen. Neben einer grundsätzlichen Assoziation mit AD wurde weiterhin der Zusammenhang zwischen den 19 Polymorphismen und der individuellen Gedächtnisleistung als intermediärer Phänotyp untersucht. Die Gedächtnisleistung wurde mittels standardisierter Tests erhoben.

Die 19 SNPs (rs4412638, rs12024093, rs12043872, rs3009113, rs913858, rs12113404, rs12672536, rs4722589, rs10998072, rs10998076, rs1162757, rs16925347, rs1162756, rs1683152, rs784566, rs11170562, rs784563, rs2249381, rs1716966) wurden mittels iPLEX-Verfahren genotypisiert und die massenspezifischen Produkte im MALDI-TOF Massenspektrometer ausgewertet.

Signifikante Assoziationen konnten dabei insbesondere zwischen den drei Genen HNRNPA2B1, PCBP2, ELAVL4 und der Alzheimer Demenz, sowie der Gedächtnisleistung festgestellt werden. Auf diesen drei Genen zeigten sich fünf Marker mit dem Phänotyp AD bzw. insbesondere mit der EOAD assoziierbar: Auf ELAVL4 ließen sich rs3009113 und rs12024093 in der Patienten-Gesamtgruppe, sowie im EOAD-Kollektiv mit AD assoziieren; auf PCBP2 waren rs784563 und rs2249381 in der Gesamtgruppe der Patienten auffällig; auf HNRNPA2B1 ließ sich rs4722589 mit EOAD assoziieren.

Diese und weitere Polymorphismen der angeführten drei Gene konnten sowohl in der EOAD- als auch in der LOAD-Gruppe mit Gedächtnisleistungen assoziiert werden. In der Haplotypanalyse ließen sich diese Befunde grundsätzlich bestätigen.

Zusammenfassend lassen die Resultate der vorliegenden Untersuchung einen Zusammenhang zwischen drei der untersuchten RBPs (HNRNPA2B1, PCBP2 und ELAVL4) und dem Phänotyp Alzheimer Demenz, sowie dem intermediären Phänotyp Gedächtnisleistung vermuten. Da über Funktion und Struktur der RBPs gegenwärtig noch relativ wenig bekannt ist und bislang keine vergleichbaren Referenzstudien bezüglich Alzheimer vorhanden sind, ist weiterführende Forschungsarbeit zur abschließenden Interpretation der Ergebnisse notwendig. Aufgrund der bis dato vorliegenden Ergebnisse stellen RNA-bindende Proteine insgesamt einen interessanten Kandidaten für die Alzheimerforschung dar.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Definition der Alzheimer Demenz**

Die Alzheimer Demenz (AD) ist eine primär degenerative, zerebrale Erkrankung, die klinisch durch den gravierenden Verlust vielfältiger kognitiver Fähigkeiten gekennzeichnet ist. Bei bislang unbekannter Ätiologie zeichnet sich die AD durch charakteristische neuropathologische und neurochemische Merkmale aus. Als Folge der chronisch progredienten Neurodegeneration des Gehirns, geht mit dem Fortschreiten der AD eine massive Störung höherer kortikaler Funktionen einher. Diese inkludiert insbesondere Gedächtnisleistungen, Orientierung, Denk- und Urteilsvermögen, Lernfähigkeit und Sprache. Die kognitiven Einschränkungen verursachen eine signifikante Beeinträchtigung und treten nicht als Teil einer qualitativen Bewusstseinsstörung auf.

Eine Differenzierung der AD kann aufgrund ihres Beginns in eine frühe (<65 Jahre, EOAD = *early-onset Alzheimer's Disease*) und späte (>65 Jahre, LOAD = *late-onset Alzheimer's Disease*) Form erfolgen.

### **2.2 Historische Aspekte der Alzheimer Demenz**

Obwohl die Alzheimer Demenz auf eine verhältnismäßig junge Geschichte in der Medizin zurückblicken kann, lässt sich das medizinische Konzept der Demenz bereits in den überlieferten Schriften der Antike finden. Im 1. Jhd. v. Chr stellte der römische Philosoph Lukretius in seinem Werk *De rerum natura* fest, dass die Seele in einem Wechselspiel mit dem Körper steht und das Alter eine geistige Schwäche mit sich bringen kann. Der von ihm verwendete Begriff „Dementia“ beschreibt ganz allgemein einen Zustand geistiger Verwirrung und Torheit (*de mens*: ohne Verstand), allerdings noch völlig ohne Bezug auf die später danach benannten Erkrankungen (Berrios, 1987). Etwa zwei Jahrhunderte nach Lukretius näherte sich der griechische Mediziner Galen den Gedächtnisstörungen im Alter aus naturwissenschaftlicher Sicht an und fasste sie unter dem Begriff „Morosis“ zusammen. Nach der in der Antike geltenden Humoralpathologie erklärte Galen den Verlust kognitiver Fähigkeiten mit dem Ungleichgewicht der Körpersäfte. Galen selbst, dessen Werk bis durch das

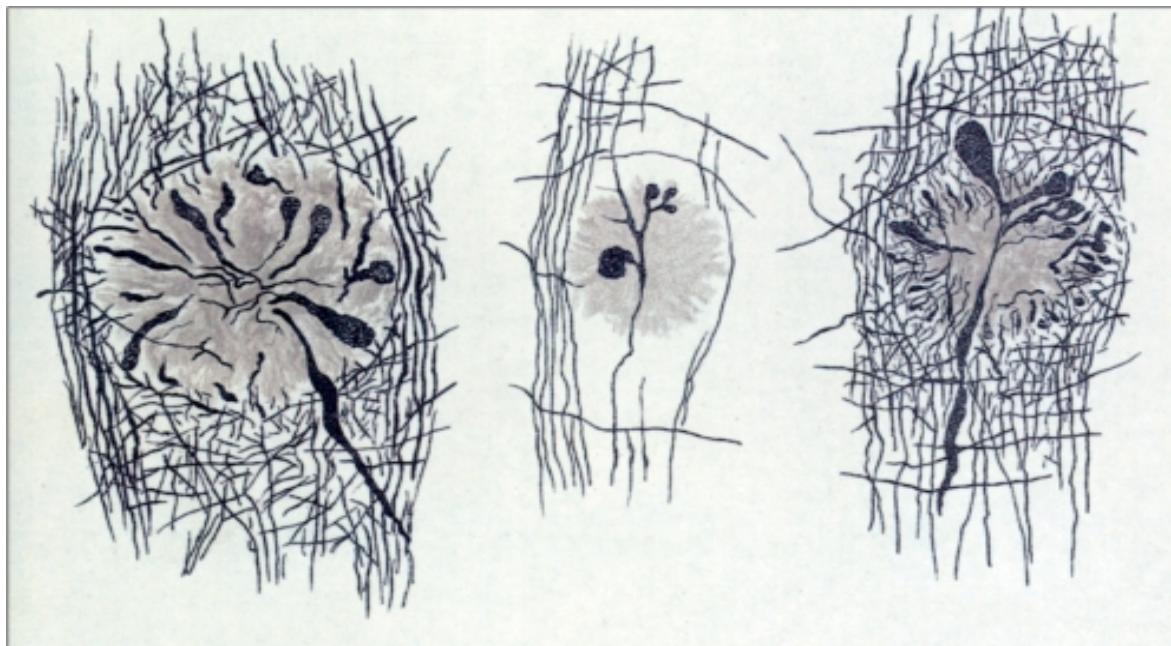
Mittelalter hindurch unangefochten blieb, beschrieb zwar die Kernsymptome der Demenz, verstand diese aber tendenziell als Bestandteil des natürlichen Altersprozesses (Berrios, 1987). Noch um 1600 führten Mediziner wie Aurelio Anselmo Demenzerkrankungen im Alter auf einen pathologischen Zustand von Kälte zurück, der u.a. durch kalte Nahrungsmittel oder kalte Umgebung bedingt war (Anselmo, 1606).

Grundsätzlich finden sich in der vorindustriellen geriatrischen Literatur gegensätzliche Strömungen: einerseits wurden demenzielle Symptome als natürliche Alterserscheinung begriffen, andererseits als autarkes Krankheitsbild - zumal es offensichtlich nicht jeden betraf.

Der französische Arzt Philippe Pinel führte mit seinem *Traité médico-philosophique* schließlich den bis dahin sporadisch für jede Form von geistiger Abnormität verwendeten Begriff *démance* in die damals junge Psychiatrietradition ein. Pinel verstand die *démance* als Abolition des Denkvermögens (Pinel, 1801); sein Schüler Jean-Étienne Esquirol unterteilte diese weiter in chronische, akute und senile Demenz und leistete damit Pionierarbeit in der Klassifizierung der Demenzerkrankungen (Esquirol, 1838). Esquirol definierte die senile Demenz erstmals als erworbene, zerebrale Erkrankung.

Um die Jahrhundertwende ermöglichten und erleichterten neue histologische Verfahren den bis dato schwer zu erbringenden Nachweis neuropathologischer Grundlagen psychiatrischer Erkrankungen. Kraepelin und Alzheimer - wenngleich nicht die einzigen - schafften so mit ihrer Arbeit schließlich die Grundlagen der heutigen Demenzforschung: Kraepelin klassifizierte die Demenzerkrankungen systematisch und nannte die präsenil auftretende Form des „Altersblödsinns“ nach seinem Schüler Alois Alzheimer die *Alzheimersche* Erkrankung (Kraepelin, 1910). Alzheimer, tätig am Münchner Klinikum, war 1906 durch eine *post mortem* Obduktion im Gehirn seiner bekannten Patientin Auguste Deter nicht nur auf eine Atrophie der Hirnrinde, sondern auch auf fibrilläre Ablagerungen gestoßen. Alzheimer war überzeugt, ein neues und von der senilen Demenz distinktes Krankheitsbild entdeckt zu haben, da Auguste Deter erst 56 Jahre war. Neben Alzheimer waren etwa zeitgleich und sogar noch früher durchaus auch andere Forscher auf die von Alzheimer beschriebenen Ablagerungen gestoßen: rund 20 Jahre vor Alzheimer stießen Gheorghe Marinescu und Paul Oscar Blocq auf senile Plaques im Cortex und beschrieben diese in ihrem *Atlas der pathologischen Histologie des Nervensystems*

(Blocq et al., 1892); Emil Redlich nannte diese Ablagerungen bei seniler Demenz etwa sechs Jahre später „*miliare Sklerose*“ und hielt diese Veränderungen für eigenartig gewucherte Gliazellen (Redlich, 1898). Fischer fand dieselben „Herdchen“ in 12 von 16 Patienten mit seniler Demenz, hielt diese allerdings nicht für Gliazellen und nannte sie in Anlehnung an die histologisch ähnlich aussehende Aktinomykose anfangs „drusige Nekrosen“ (Fischer, 1907; Abbildung 2.1). In weiterer Forschungsarbeit beschrieb Fischer neben den Plaques auch die Neurofibrillen und identifizierte acht verschiedene morphologische Stadien der Plaques (Fischer, 1910).



**Abbildung 2.1:** Fischers Skizzen zu den neuritischen Plaques, die er *post mortem* vorwiegend im frontalen und temporalen Bereich der grauen Substanz, in geringem Maße auch im Thalamus, Striatum und Cerebellum seiner Patienten mit seniler Demenz gefunden hatte (Fischer, 1907).

Bielschowski veröffentlichte 1911 seine histopathologischen Studien zur Alzheimer Demenz (Bielschowsky, 1911) und die Italiener Bonfiglio (Bonfiglio, 1908), Perusini (Perusini, 1909) und Sarteschi (Sarteschi, 1909) trugen mit ihren Patientenbeschreibungen weiterhin wesentliche Informationen über die Klinik und Anatomie der Erkrankung zusammen. Neben den europäischen Wissenschaftlern ist der Amerikaner Solomon Carter Fuller zu nennen, der eine frühe Studie über die Plaques verfasste (Fuller, 1911). Das beginnende 20. Jahrhundert schaffte mit einer Reihe ambitionierter Wissenschaftler die Grundlage für die heutige Demenzforschung.

1911 war sich Alzheimer durch die Befunde seiner Kollegen nicht mehr sicher, inwiefern die präsenile Form der Demenz histopathologisch von der senilen Form zu unterscheiden war (Alzheimer, 1911). Tatsächlich blieb die Unterscheidung zwischen präseniler und seniler Demenz lange Zeit Gegenstand von Kontroversen. Aufgrund mangelnder symptomatischer und neurobiologischer Unterschiede zwischen den beiden Formen bezeichnet der Begriff „Alzheimer Demenz“ seit Ende der siebziger Jahre die Gesamtgruppe der degenerativen Demenzen mit den um die Jahrhundertwende beschriebenen charakteristischen Plaques und Neurofibrillen. Dennoch kann auch gegenwärtig im Sinne einer Klassifikation die Einteilung der Patienten mit einer Demenz im Prä- bzw. Senium Sinn machen, wobei diese Unterscheidung keinerlei Bezug auf die neuropathologischen Grundlagen der Erkrankung nimmt, sondern sich allein auf das Alter der Patienten bezieht. Die Begriffe präsenil und senil sind den Bezeichnungen „mit frühem/späten Beginn“ gewichen, wobei unter „mit frühem Beginn“ Patienten unter 65 Jahren verstanden werden.

Durch die technischen Errungenschaften in den vergangenen Jahrzehnten sind den Wissenschaftlern immer wieder neue Erkenntnisse im Bereich der demenziellen Erkrankungen gelungen: in den 60er Jahren konnten die Grundstrukturen der Plaques sowie der Neurofibrillen nachgewiesen werden (u.a. Kidd, Terry, Wisniewski, Shelanski, Ghetti, Iqbal, Dickson etc.), in den 70ern untersuchten Drachman und Leavitt, ebenso wie ihre Kollegen Davies und Maloney, die Rolle des cholinergen System bei Gedächtnisprozessen und formulierte im Zuge dessen die ersten Neurotransmitter-basierten Therapieansätze bei Gedächtnisstörungen (Drachman und Leavitt, 1974; Davies und Maloney, 1976).

1984 wurden die ersten NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke; Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) Kriterien formuliert, um die psychiatrische Befunderhebung bei demenziellen Erkrankungen zu erleichtern und zu standardisieren (McKhann et al., 1984). Dieses Klassifikationssystem ist gemeinsam mit der *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* (ICD-10) und dem *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-IV) inzwischen um bildgebende Kriterien und die Diagnose LKS bzw. MCI (leichte kognitive Störung bzw. *mild cognitive impairment*) erweitert worden und bildet gegenwärtig üblicherweise den methodischen Standard der diagnostischen Grundlage in der klinischen Praxis.

Nach wie vor konnte trotz intensiver Bemühungen die der Alzheimer Demenz zugrunde liegende Pathogenese nicht erschöpfend geklärt werden und ist Gegenstand aktueller Forschung. Im Zentrum der gängigen Hypothesen stehen u.a. die amyloiden bzw. taufibrillären Ablagerungen, sowie Neurotransmitterdefizite, zellimmunologische Faktoren und oxidativer Stress.

Insgesamt konnte die Demenzforschung in den letzten Jahrzehnten immer wieder kleinere Erfolge verzeichnen und erfährt weiter – insbesondere durch das Ausbleiben eines therapeutischen Durchbruchs – durch das wachsende volkswirtschaftliche Interesse große wissenschaftliche Aufmerksamkeit.

## **2.3 Epidemiologie**

Eine im Januar 2013 veröffentlichte Studie basierend u.a. auf den Daten der WHO schätzte die Prävalenzrate der Demenzkranken im Jahre 2010 weltweit auf 36,5 Millionen und errechnete einen Stand von 65,7 Mio. bis 2030 (Prince et al., 2013).

Die deutsche Alzheimer Gesellschaft geht derzeit von rund 1,4 Mio. Demenzkranken in der Bundesrepublik aus, die Zahl der Ersterkrankten wird auf 300.000 pro Jahr geschätzt. Dies ergibt einen Krankenzuwachs von 40.000 Patienten pro Jahr (Deutsche Alzheimergesellschaft, 2012); aufgrund der demographischen Entwicklung ist die Sterberate unter den bereits betroffenen Personen geringer als die jährliche Inzidenzrate.

Die WHO schätzte die weltweiten, durch Demenz verursachten Kosten 2010 auf 604 Billionen US Dollar (Special Committee on Aging United State Senate, 2011), damit ist die Demenz zu einer der teuersten Erkrankungen im modernen Zeitalter geworden.

Bei rund zwei Dritteln der Betroffenen lautet die Diagnose in westlichen Ländern Alzheimer Demenz, wobei es sich in vielen Fällen tatsächlich wohl um eine Mischform mit alzheimertypischen sowie vaskulären Veränderungen handelt.

Betrachtet man die deutschen Zahlen, fällt der augenscheinliche Zusammenhang zwischen Alter und Prävalenzraten auf: die Krankenzahl verdoppelt sich im Abstand von ungefähr fünf Jahren, wobei rund zwei Drittel der Erkrankten das 80. Lebensjahr überschritten haben, 70% dieses Patientenkollektivs sind weiblich. Relativ selten betrifft die Demenz hingegen die Unter-65-Jährigen: etwas weniger als 2% der

Erkrankten sind im mittleren Lebensalter, für Deutschland ergibt dies an die 20.000 Patienten (Deutsche Alzheimergesellschaft, 2012).

Die imponierende Zahl der Neuerkrankten bzw. die steigende Prävalenzrate der letzten Jahrzehnte ist insbesondere durch die erhöhte Lebenserwartung im 21. Jahrhundert zu erklären.

## **2.4 Klassifikation demenzieller Erkrankungen**

Demenztypische Veränderungen mit der im Mittelpunkt stehenden Abnahme geistiger Fähigkeiten liegen diversen Krankheitsbildern zugrunde. Tatsächlich umfasst das Hyperonym „Demenz“ eine ganze Reihe von Erkrankungen, die vorwiegend durch intellektuelle, zusätzlich auch durch motorische Defizite charakterisiert sein können, nicht jedoch einer gemeinsamen neuropathologischen Grundlage entsprechen. In der gängigen Literatur findet man an die 70 verschiedenen Erkrankungen, deren Symptomspektrum den Demenzen zugeordnet werden kann. Pragmatisch sinnvoll ist es zwischen primären und sekundären Demenzen (Tabelle 2.1) zu unterscheiden (Lautenschläger und Förstl, 2003), während im Versuch einer psychopathologischen Grobeinteilung traditionell die drei Subtypen der kortikalen, subkortikalen und frontalen Demenz unterschieden werden (Lauter, 1988). Durch die bemerkenswerten Fortschritte im histologischen Verständnis der degenerativen Demenzerkrankungen, ist in den letzten Jahren eine spezifischere nosologische Einteilung der Demenzformen gelungen (u.a. Neumann et al., 2008).

### **2.4.1 Primäre und sekundäre Demenzen**

Während ca. 10 Prozent der Demenzerkrankungen potenziell reversibel und somit behandelbar sind, ist der Großteil der unter dem Überbegriff Demenz zusammengefassten Erkrankungen irreversibel und progredient. Im Sinne eines Klassifikationsversuches kann daher von primär degenerativen Demenzen sowie von sekundären Demenzen ausgegangen werden (Lautenschläger und Förstl, 2003): während erstere die große Gruppe der primär hirnorganisch bedingten Demenzen beschreibt, umfasst der zweite Begriff zahlreiche psychische, internistische und

spezifisch neurologische Erkrankungen, die in der Klinik mit demenzähnlichen Symptomen imponieren.

Ursachen für solche potenziell reversible Demenzen können unter anderem metabolische Erkrankungen, Traumata, Toxine, Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Pharmaka, psychiatrische Erkrankungen, Mangelernährung und andere Erkrankungen wie beispielsweise Normaldruck-Hydrocephalus sein (DEGAM Leitlinien Nr.12, Demenz, 2008). Diese reversiblen Störungen sind mehrheitlich zeitlich begrenzt und im Gegensatz zu den primär degenerativen Demenzen bleiben die kognitiven Defizite nach ursächlicher Behandlung nicht bestehen.

Zu der großen und heterogenen Gruppe der primär hirnorganisch bedingten Demenzen zählen eine Reihe schwerwiegender Erkrankungen, unter anderem Demenzformen mit neurodegenerativen und vaskulären Veränderungen. Die Alzheimer Demenz wird als häufigste Demenzform diagnostiziert, während tatsächlich eine gemischte Form aus vaskulären und neurodegenerativen Hirnveränderungen häufiger als die reine Alzheimer Demenz auftritt (Förstl, 2012). Zu den selteneren primär degenerativ und progradienten Erkrankungen aus dem Demenzspektrum zählen beispielsweise subkortikale Demenzen wie Basalganglienerkrankungen, Prionenerkrankungen wie die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung oder frontotemporale Lobärdegenerationen (FTLD).

**Tab. 2.1.: Primäre Demenzen und sekundäre Demenzen**

<b>Primäre Demenzen</b>
<b>Alzheimer Demenz mit spätem Beginn (LOAD)</b> <b>Alzheimer Demenz mit frühem Beginn (EOAD)</b>
<b>Vaskuläre Demenzen</b> u.a. Multiple kortikale Infarkte, strategische Einzelinfarktdemenz, Grenzonenischämien, multiple lakunäre Infarkte, Morbus Binswanger (SAE), CADASIL, Amyloidangiopathie, zerebrale Vaskulitiden, gemischte Demenz ( <i>mixed dementia</i> )
<b>Hyperkinetische Bewegungsstörungen mit Demenz</b> u.a. Chorea Huntington, Choroakanthozytose, Morbus Wilson, Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn (NBIA), Thalamusdegenerationen
<b>Hypokinetische Bewegungsstörungen mit Demenz</b> u.a. Morbus Parkinson, „Parkinson-Plus-Syndrome“, Demenz mit Lewy-Körperchen, Multisystematrophie (MSA), Multisystem-hereditäre Tauopathien (MHT), Kortikobasale Degeneration (CBD), Idiopathische Kalzifikation der Basalganglien (ICBG)
<b>Frontotemporale Lobärdegenerationen (FTLD)</b> frontotemporale Demenz, progradierte unflüssige Aphasie, semantische Demenz

<b>Prionerkrankungen</b> u.a. Creutzfeldt-Jakob-Demenz, Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom, tödliche familiäre Insomnie
<b>Alkoholassoziierte Demenzen</b> chronisches Korsakow-Syndrom
<b>Sekundäre Demenzen</b>
<b>Transitorische Amnesien</b> u.a. posttraumatische Amnesien, transitorische globale Amnesien, transitorische epileptische Amnesien
<b>Verwirrtheitszustände (Delir)</b> u.a. durch Substanzintoxikation, Substanzentzug, operative Eingriffe, somatische Grunderkrankungen (z.B.: Meningitis, Enzephalitis, raumfordernde Prozesse, Infektionen und Verletzungen des ZNS, Hämatome, Meningoome, Lues, HIV, Störungen des Glukose-Elektrolythaushalts, Infektionen, Herzinsuffizienz, Schilddrüsen- und Nebennierendysfunktionen, Hyper-/Hypothermie), Mangelernährung, Umgebungswechsel
<b>Dissoziation</b> histrionisch bedingte kognitive Defizite (hysterische Pseudodemenz), simulierte kognitive Störung, Ganser-Syndrom

(LOAD = *late-onset Alzheimer's Disease*; EOAD = *early-onset Alzheimer's Disease*); SAE = subkortikale arteriosklerotische Enzephalopathie, CADASIL = *Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*)

## 2.4.2 Kortikale, subkortikale und frontale Demenzen

Traditionell können nach auftretender Psychopathologie drei Subtypen der Demenz unterschieden werden: die kortikale, die subkortikale und die frontale Demenz (Lauter, 1988).

Tatsächlich kann das klinische Erscheinungsbild zwar einen richtungsweisenden Rückschluss auf die zugrunde liegende Ätiologie zulassen, ist allerdings zur differentialdiagnostischen Einordnung der Krankheit nicht ausreichend.

Die kortikale Demenz ist vorwiegend durch höhere kognitive Funktionsdefizite ausgezeichnet. In diesem Sinne zeigt der betroffene Patient Störungen im Bereich Gedächtnis, Sprache, räumliche Orientierung und Abstraktion (Jahn, 2010).

Die subkortikale Demenz hingegen imponiert mit einer generellen psychomotorischen Verlangsamung, und beeinträchtigten Fundamentalfunktionen wie Vigilanz, Stimmung, Motivation und Aufmerksamkeit. Der Begriff „subkortikal“ ist insofern irreführend, als dass die diesem Syndrom zugeordnete Patienten keine Läsionen im subkortikalen Bereich aufweisen müssen (Jahn, 2010).

Bei der frontalen Demenz steht klassischerweise die Veränderung der Persönlichkeit, ebenso wie Störungen im organisierendem Denken und Planen im Vordergrund,

während Gedächtnis, Orientierung und räumliches Denken zumeist weniger beeinträchtigt scheinen (Hampel et al., 2007).

Die nosologische Einteilung in sub-/ kortikale und frontale Demenz ist zwar klinisch hilfreich, allerdings insofern verwirrend, als dass sich die psychopathologischen Symptome teilweise überlappen und keinen gesicherten Rückschluss auf die zugrunde liegende Ätiologie zulassen.

## 2.5 Histologische Einteilung primär degenerativer Demenzen

Die spezifische Einteilung der primären Demenzen aufgrund ihrer Proteinablagerungen empfiehlt sich, da die individuellen Ablagerungen eine histologisch präzise Signatur des jeweiligen Krankheitsprozesses darstellen und der Phänotyp eines Demenzsyndroms insgesamt nur bedingt auf die zugrundeliegende Demenz-Krankheit schließen lässt.

Die u.a. von Alzheimer vor rund 110 Jahren beschriebenen Ablagerungen im Neocortex sind inzwischen als amyloidogene und taufibrilläre Ablagerungen identifiziert worden. Beiderlei Ablagerungen sind bei der frühen, sowie bei der späten Form der Erkrankung vorzufinden. In geringerem Maße sind solche Ablagerungen auch im Rahmen des natürlichen Altersprozesses in gesunden Gehirnen vorzufinden (Wisniewski und Terry, 1973). Die Prionerkrankungen sind hingegen durch Ablagerungen von extrazellulärem *Prion Protein Scrapie* ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) gekennzeichnet, wenngleich auch hier Amyloide gefunden werden können (Prusiner, 2001), während zu den  $\alpha$ -Synukleinopathien Parkinson und Demenzen mit Lewy-Körperchen gezählt werden (Neumann und Kretzschmar, 2008). Relativ neu im Gegensatz zu den Tauo- und  $\alpha$ -Synukleinopathien ist die Entdeckung des TDP-43 Proteins (*transactive response DNA binding protein 43*), welches sich v.a. bei der frontotemporalen Lobärdegeneration (FTLD) finden lässt (Neumann et al., 2006).

Tatsächlich sind in den letzten Jahren eine Reihe von histologisch charakteristischen Mustern für diverse Krankheitstypen entdeckt worden (Tabelle 2.2). Das Verständnis für die neurobiologischen Korrelate der neurodegenerativen Erkrankungen ist für die Entwicklung kausaler Therapiestrategien besonders wichtig, wenngleich nicht unumstritten ist, ob die Ablagerungen das eigentliche Agens sind.

**Tab.2.2:** Histologische Einteilung ausgewählter degenerativer Demenzen

Einschlüsse	Erkrankung
Extrazelluläre Proteinablagerungen	AD ( $\beta$ -Amyloid) Prionerkrankungen ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ )
Intrazelluläre Proteinablagerungen (Tauopathien)	AD (frühe und späte Form mit Einschluss von <i>neurofibrillary tangles (NFT)</i> ) Morbus Pick Progressive supranukleäre Blickparese Kortikobasale Degeneration Erkrankung mit argyophilen Körnchen FTLD-17
$\alpha$ -Synukleinopathien	Morbus Parkinson Demenz mit Lewy Körperchen Multiple Systematrophien
Ubiquitin Einschlüsse	Amyotrophe Lateralsklerose Frontalhirndegeneration mit Motoneuronerkrankung
TDP-43 ( <i>transactive response DNA binding protein</i> )	Frontotemporale Lobärdegeneration mit Einschlüssen von TAR-DNA-bindendem Protein 43 (FTLD-TDP)
FUSopathien	Frontotemporale Lobärdegeneration mit Einschlüssen des Proteins <i>fused in sarcoma</i> (FTLD-FUS) <i>Neuronal intermediate filament inclusion disease (NIFID)</i> <i>Basophilic inclusion body disease (BIBD)</i>
Prionerkrankungen	Creutzfeld-Jakob-Erkrankung

NFT= *neurofibrillary tangles*

## 2.6 Demenz bei Morbus Alzheimer

Die Alzheimer Demenz zählt zu den hirnorganisch bedingten primären Demenzen und zeichnet sich histopathologisch u.a. durch  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen, Neurofibrillen und inflammatorische Marker wie aktivierte Mikroglia und Astrozyten aus (Walsh und Selkoe, 2007; Mao und Reddy, 2011; Feng und Wang, 2012).

Im klinischen Bild sind schleichend beginnende und progrediente neuropsychologische Defizite mit im Mittelpunkt stehenden Gedächtnisstörungen bezeichnend für eine AD. Klinik und Neuropathologie sind sowohl für die frühe, als auch für die späte Form der AD weitgehend identisch, bei grundsätzlich rascherer Progredienz der frühen Form. Die beiden Formen lassen sich jedoch z.T. genetisch voneinander abgrenzen.

### **2.6.1 Diagnosekriterien**

Die Diagnose einer Demenz erfolgt in der klinischen Praxis standardmäßig nach operationalisierten Diagnosekriterien. Die diagnostischen Items berücksichtigen neben den bekannten Kernsymptomen (Amnesie) weitere kognitive Beeinträchtigungen, sowie Störungen im Erleben und Verhalten. Aktuell gelten entsprechend der gängigen Diagnostikmanuale ICD-10, DSM-IV und NINCDS-ADRDA größtenteils übereinstimmende Kernkriterien für eine Demenzdiagnose (Tabelle 2.3): sowohl die ICD-10, als auch das DSM-IV verlangen eine objektivierbare und sekundär verschlechterte Abnahme der Gedächtnisfunktionen bei einer vorher größeren Leistungsfähigkeit. Neben dem Gedächtnis muss mindestens eine weitere höhere kortikale Funktion beeinträchtigt sein (Planen, Urteilsvermögen, Denkvermögen, Ideenfluss) und die kognitive Leistungsfähigkeit des Patienten beeinträchtigen (IDC-10 und DSM-IV).

Die ICD-10 setzt in ihrem Zeitkriterium eine Mindestdauer von 6 Monate vor Diagnosestellung fest, um das Demenzsyndrom von temporär auftretenden Beeinträchtigungen klinisch ähnlicher Natur zu unterscheiden, während das DSM-IV kein obligates Zeitkriterium, aber eine signifikante Beeinträchtigung der alltäglichen sozialen und beruflichen Leistungen (*activities of daily living*) als Diagnosekriterium vorschlägt.

Sowohl ICD-10 als auch DSM-IV verlangen für die Diagnose der AD den Ausschluss anderer somatischer sowie psychischer Erkrankungen, insbesondere vaskulärer Ursachen, die eine Demenz verursachen können. Die ICD-10 führt die gemischte oder atypische Form der AD als eigene Erkrankung unter den „Demenzen bei Alzheimer Krankheit“ an.

**Tab.2.3:** Diagnosekriterien einer AD nach ICD-10-R und DSM-IV und NINCDS-ADRDA

Merkmal	ICD-10-R	DSM-IV	NINCDS-ADRDA
<b>Psycho-pathologisches Profil</b>	Objektivierbare Abnahme des Neu-/Gedächtnisses, sowie anderer kognitiver Fähigkeiten wie Urteilsfähigkeit und Denkvermögen; Aphasie, Apraxie und Agnosie stützen die Diagnose	Objektivierbarer Nachweis einer Gedächtnisstörung, mit gleichzeitigem Auftreten mind. einer anderen kognitiven Störung wie Aphasie, Apraxie, Agnosie, Störungen der Exekutivfunktionen	Objektivierbare progrediente Gedächtnisstörung mit oder ohne einhergehenden anderen kognitiven Störungen
<b>Verlauf</b>	Schleichender Beginn mit langsamer Progredienz	Schleichender Beginn mit progredientem kognitiven Abbau	Schleichender Beginn, zunehmende Verschlechterung der Gedächtnisfunktionen und kognitiver Leistungen
<b>Einteilung/Codierung</b>	Demenz bei Alzheimer-Krankheit mit frühem Beginn (F00.0) Demenz bei Alzheimer-Krankheit mit spätem Beginn (F00.1) Demenz bei Alzheimer-Krankheit, atypische oder gemischte Form (F00.2) n.n.b. Demenz bei Alzheimer-Krankheit (F00.9)	Demenz bei Alzheimer Krankheit (290.xx) Demenz bei Alzheimer Krankheit EO/LO (290.10/290.0)/ mit Delir (290.11/290.3)/ Wahnvorstellungen (290.12/290.10)/ Depression (290.13/290.21)	Wahrscheinliche AD Mögliche AD Gesicherte AD
<b>Alltags-beeinträchtigung</b>	Einteilung in Schweregrade; bei mittelgradiger Demenz erste Beeinträchtigungen im unabhängigem Leben	Signifikante Beeinträchtigung der sozialen und beruflichen Leistungen ( <i>activities of daily living ADL</i> )	Eingeschränkte Alltagskompetenz
<b>Dauer</b>	Mindestens 6 Monate	-	Mindestens 6 Monate
<b>Ausschluss</b>	Hinweis auf eine andere vorliegende Demenz oder Systemerkrankung	Hinweis auf ZNS-, systemische, psychiatrische und substanzinduzierte Erkrankungen	Hinweis auf andere Demenzerkrankungen, zerebrovaskuläre Schäden, Depressionen, fokalneurologische und extrapyramidal Symptome, metabolische Erkrankungen

n.n.b. = nicht näher bezeichnet, EO = *early-onset*, LO = *late-onset*

Eine gute diagnostische Sensitivität und eine mäßige Spezifität (96% Sensitivität, 61% Spezifität in Jobst et al., 1998) wird den NINCDS-ADRDA Kriterien zugesprochen, 2007 verbessert und um Biomarker erweitert (Dubois et al., 2007).

Diese, in der wissenschaftlichen Praxis vielverwendeten Kriterien, unterscheiden zwischen „wahrscheinlicher“, „möglicher“ und „gesicherter“ AD (McKhann et al., 1984; Tabelle 2.4).

Die Diagnose „wahrscheinliche“ AD beruft sich bei Ausschluss anderer Erkrankungen auf objektivierbare und progrediente Störungen des Gedächtnisses mit schlechendem Beginn, sowie auf nachweisbare mediotemporale Lobäratrophie im MRT, tempoparietal reduzierten Glukosemetabolismus (PET), erhöhte 181-Phosphobzw. Gesamt-Tau-, sowie erniedrigte  $\beta$ -Amyloid(1-42) Konzentration im Liquor (Dubois et al., 2007).

Eine nachgewiesene genetische Mutation der drei Gene Präsenilin-1 (PSEN1), -2 (PSEN2) und APP führt in seltenen Fällen ebenso zur Diagnosestellung einer wahrscheinlichen AD. Eine „mögliche“ AD-Diagnose wird hingegen bei atypischem Verlauf und bei Vorliegen einer anderen, für die Demenzsymptome hinreichende aber nicht als ursächlich verstandene Krankheit, gestellt. Als „gesichert“ gilt die AD-Diagnose dann, wenn die Kriterien der „wahrscheinlichen“ erfüllt sind und die für die AD typischen histopathologischen Befunde vorliegen (McKhann et al., 1984).

**Tab.2.4:** Diagnosekriterien „mögliche“ und „wahrscheinliche“ AD (nach NINCDS-ADRDA, 2006)

<b>I. WAHRSCHEINLICHE AD</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Nachweis einer Demenz in einer klinischen Untersuchung (Objektivierung der Defizite unter Einbeziehung neuropsychologischer Testverfahren)</li> <li>○ Defizite in mindestens zwei kognitiven Bereichen</li> <li>○ Progrediente Störung des Gedächtnisses und anderer kognitiver Funktionen</li> <li>○ Keine qualitative Bewusstseinsstörung</li> <li>○ AAO zwischen 40.-90. Lebensjahr</li> <li>○ Kein Hinweis auf andere ursächliche Hirn- oder Systemerkrankungen</li> </ul>
<b>II. Unterstützende Befunde für die Diagnose einer WAHRSCHEINLICHEN AD</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Zunehmende Verschlechterung spezifischer kognitiver Funktionen (z.B. Aphasie, Apraxie, Agnosie)</li> <li>○ Beeinträchtigte Alltagsaktivitäten und Verhaltensveränderungen</li> <li>○ Positive Familienanamnese</li> <li>○ Hinweise auf eine zerebrale Atrophie in bildgebenden Verfahren</li> <li>○ Normalbefund im EEG</li> </ul>
<b>III. Klinische Befunde, die mit einer WAHRSCHEINLICHEN AD vereinbar sind</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Vorübergehender Stillstand der Erkrankung</li> <li>○ Depression, Schlaflosigkeit, Inkontinenz, Illusionen, Halluzinationen</li> <li>○ Wahnvorstellungen, aggressive Ausbrüche, sexuelle Dysfunktionen, Gewichtsverlust</li> <li>○ Neurologische Auffälligkeiten (z.B. erhöhter Muskeltonus, Myoklonien, Gangstörungen)</li> <li>○ Altersentsprechendes CT</li> </ul>
<b>IV. Ausschlusskriterien</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Plötzlicher, apoplektischer Beginn</li> <li>○ Fokalneurologische Zeichen</li> <li>○ Epileptische Anfälle oder Gangstörungen in frühen Stadien</li> </ul>
<b>V. MÖGLICHE AD</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Mögliche Diagnose bei Vorhandensein eines demenziellen Syndroms mit untypischer Symptomatik hinsichtlich Beginn, Verlauf und Defizitprofil in Abwesenheit anderer ursächlicher Erkrankungen</li> <li>○ Mögliche Diagnose bei Vorhandensein einer zweiten System- oder Hirnerkrankung, die nicht als ursächlich betrachtet wird, die Demenz aber verursachen könnte</li> </ul>

Klinisches Bild und Familien-/Anamnese stellen also einen ersten richtungsweisenden Befund, zur ätiologischen Einordnung einer AD bedarf es, wie angeführt, weiterer Diagnostik.

Maßgeblich für die Diagnose einer AD ist der Liquorbefund, sowie die Visualisierung alzheimertypischer Veränderungen mit deren charakteristischen Verteilungsmuster mittels Bildgebung.

## 2.6.2 Verlauf

Bereits Jahre vor der augenscheinlichen Entwicklung einer Alzheimer-Symptomatik zeigen die Patienten subtile kognitive Defizite, die in neuropsychologischen Testverfahren zwar meist latent auffallen, sich im Alltag allerdings üblicherweise nicht bemerkbar machen. In diesem Prodromalstadium ist es z.Z. noch nicht möglich eine präsymptomatische AD festzustellen, wenngleich der Beachtung dieses Vorstadiums immer mehr wissenschaftliche Aufmerksamkeit gewidmet wird. Rund 12 % der in den 90er Jahren entstandene Diagnosegruppe „leichte kognitive Beeinträchtigung“ entwickeln innerhalb eines Jahres eine AD (Zaudig, 2005; Gauthier et al., 2006; Peterson et al., 2009; Tondelli et al., 2014).

Im *leichtem* Demenzstadium ist der Patient häufig noch in der Lage, allein zurecht zu kommen. Seine Defizite liegen v.a. in der Bildung neuer Gedächtnisinhalte, im planvollen Handeln und in der Wortfindung. Die Patienten klagen vor allem über verlegte Gegenstände, vergessene Termine und beeinträchtigte räumliche Orientierung. Viele Alzheimerpatienten tendieren zur Bagatellisierung ihrer Defizite und schaffen es über einen begrenzten Zeitraum hinweg sehr gut, ihre Defizite im Alltag zu kaschieren. Häufig begleiten depressive Symptome das leichte und mittelschwere Demenzstadium.

Im *mittelschweren* Demenzstadium sind die Patienten auf umfassende Betreuung angewiesen. Neben den inzwischen ausgeprägten Beeinträchtigungen im Neugedächtnis, nehmen tiefgreifende Defizite im logischen Denken, Handeln, Planen und in der räumlichen Orientierung zu. Die Fähigkeiten, sich alleine anzuziehen oder zu essen gehen verloren, die Patienten können aggressiv und emotional unkontrolliert werden, ruhelos umherwandern und an Inkontinenz leiden. Im fortgeschrittenen mittelschweren Demenzstadium ist eine häusliche Betreuung durch die Familie meist nicht mehr möglich.

Durchschnittlich 6 Jahre nach Diagnosestellung hat der AD-Patient schwerwiegende Defizite in allen kognitiven Bereichen und braucht intensive Unterstützung bei allen Handlungen. In diesem *schweren* Demenzstadium kann der Patient selbst weit

zurückliegende Erinnerungen nicht mehr abrufen und kommuniziert mit reduzierten und einfachen Wörtern. Der zirkadiane Rhythmus ist gestört, der Patient wirkt v.a. in den Abendstunden unruhig und aufgewühlt („*sundowning*“). Im fortgeschrittenen Stadium wird der Patient bettlägerig und entwickelt dadurch ein erhöhtes Embolie- und Thrombose-Risiko. Als häufigste Todesursachen lässt sich bei AD Patienten Pneumonie, Myokardinfarkt und Sepsis finden (Magaki et al., 2014).

Insgesamt lässt sich der individuelle Verlauf der Erkrankung nicht vorhersagen und kann von Patient zu Patient letztlich variieren. Psychopathologische Störungen wie visuelle und akustische Wahrnehmungsstörungen, Enthemmung, affektive und psychomotorische Störungen sowie tiefgreifende Persönlichkeitsveränderungen können je nach individueller Ausprägung der AD zusätzlich zu den kognitiven Symptomen auftreten (Förstl, 2009).

### **2.6.3 Risikofaktoren**

Die zahlreichen Risikofaktoren, die den Ausbruch einer AD begünstigen, können grundsätzlich in genetische und umweltbedingte Faktoren eingeteilt werden. Der wichtigste nicht-genetische Risikofaktor für eine Alzheimer Demenz ist das Alter, die jährliche Neuerkranktenrate steigt exponentiell mit zunehmendem Alter und erreicht ihre Spitze bei der Altersgruppe der 80jährigen (Weyerer et al., 2006).

Als weitere Risikofaktoren, die unabhängig vom Erbgut zur Entwicklung einer AD beitragen, werden u.a. Vorschädigungen des ZNS (z.B. Schädel-Hirn-Traumata) sowie eine Reihe somatischer (z.B. Hypercholesterinämie, Hypothyreose, arterielle Hypertonie, Diabetes etc.) und psychiatrischer (z.B. Depression) Erkrankungen, aber auch sozialer Status, Bildung, Ernährungsverhalten oder Vitamin B12-Mangel diskutiert. Die Studienlage dazu ist mannigfaltig und insgesamt von geringer Kohärenz. 2002 konnte beispielsweise in einer breitangelegten Studie mit 6434 Probanden einzig ein Zusammenhang zwischen Bildungsniveau, Alter, Apolipoprotein E ε4 und AD festgestellt werden (Lindsay et al., 2002). Kein Zusammenhang konnte u.a. zwischen Depression, Schädel-Hirn-Trauma, Rauchen, Hypertonie, kardiovaskulären Erkrankungen und AD gefunden werden, während körperlicher Ertüchtigung, sowie Kaffee- und Weinkonsum sogar ein protektiver Faktor zugeschrieben werden konnte (Lindsay et al., 2002). Höherem prämorbidem Bildungsniveau kann insofern ein protektiver Effekt zugeschrieben werden, als dass

Individuen mit ausgeprägtem IQ bei neuralen Ausfällen Studien zufolge auf bessere *Copingstrategien* zurückgreifen können und somit in der Lage sind, den Ausbruch der klinischen Symptomatik zeitlich nach hinten zu verschieben (Stern, 2006). Frauen sind grundsätzlich häufiger von Demenzerkrankungen betroffen. Neben einem vermuteten Zusammenhang zwischen dem sinkenden Östrogenspiegel in der Postmenopause und AD (Tang et al., 1996), ist dies auch auf die höhere Lebenserwartung der Frauen zurückzuführen.

Eine zentrale Rolle in der Entwicklung einer AD haben genetische Faktoren inne. Bislang konnten für die familiär auftretende Form der EOAD autosomal-dominante Mutationen mit hoher Penetranz auf Chromosom 21 (Goate et al., 1991), Chromosom 14 (Schellenberg et al., 1992; Sherrington et al., 1995) und Chromosom 1 (Levy-Lahad et al., 1995) lokalisiert werden. Für die LOAD wurde auf Chromsom 19 das Apolipoprotein-E4-Gen (Corder et al., 1993) ausfindig gemacht, das bei homozygoten Trägern zu einem stark erhöhten Risiko an AD zu erkranken, führt. Bei gehäuft auftretenden neurodegenerativen Erkrankungen in der Familie, ist das Risiko an einer AD zu erkranken insgesamt erhöht.

#### **2.6.4 Pathologie der Alzheimer Demenz**

Im Zentrum der Alzheimer'schen Pathologie stehen die bekannten taufibrillären und amyloiden Ablagerungen, molekulare Entzündungsindikatoren, sowie eine makroskopisch sichtbare Abnahme des Gehirnvolumens. Während des Altersprozesses kommt es auch im gesunden Normalkollektiv zu neuroanatomischen Veränderungen des Gehirns, die mit einer individuellen Volumenverminderung in bestimmten Bereichen (vorwiegend hippocampal, entorhinal, cerebellär) und moderaten Plaqueablagerungen einhergehen kann (Raz et al., 2005; Morrison und Hof, 1997).

Die hirnpathologischen Veränderungen der AD sind im Vergleich jedoch ausgeprägter und von einer wesentlich rascheren Progredienz, sowie durch tiefgreifende kognitive Veränderungen im klinischen Bild gekennzeichnet.

#### **2.6.4.1 Hypothesen**

Trotz intensiver Forschung ist der Pathomechanismus der AD bislang nicht einhellig identifiziert worden. Zweifelsohne scheinen multiple heterogene Faktoren in der Entstehung der AD zusammenzuspielen und den Zelluntergang zu begünstigen. Die zentralen Hypothesen der Alzheimerforschung sind dabei nach wie vor die cholinerge Hypothese (Drachman und Leavitt, 1974; Bartus et al., 1982; Whitehouse et al., 1981), die glutamaterge Hypothese (Maragos et al., 1987), die Amyloid-Hypothese (Hardy und Allsop, 1991), die Tau-Hypothese (Goedert, 1993) und die neuroinflammatorische/immunologische Hypothese (Rogers et al., 1988). Weitere Hypothesen verstehen beispielsweise die mitochondriale Beteiligung und den oxidativen Stress als maßgebliche Faktoren in der AD-Entstehung.

Tatsächlich konnte letztendlich keine dieser Hypothesen die Frage nach Grund und Ursache der AD alleinig erschöpfend beantworten. Weder die gängige Amyloid-Hypothese, noch die Verfechter der taubedingten Pathogenese boten ausreichend zufriedenstellende Ergebnisse, die die klinische Ausprägung der Alzheimer Demenz ursächlich erklären könnte. Das Ausbleiben eines therapeutischen Durchbruchs basierend auf den bisherigen Erkenntnissen führte in den letzten Jahren zu einer Reihe von neuen Ansätzen. Erwähnenswert ist dabei u.a. der zunehmende Fokus auf die mitochondriale Beteiligung und den oxidativen Stress als maßgebliche Faktoren in der AD-Entstehung, ebenso wie die Diskussion über toxische oder infektiöse Einflüsse auf den AD-Phänotyp. Insgesamt unterstreichen die Befunde die Komplexität und Heterogenität der AD und deuten darauf hin, dass erst das Zusammenspiel unterschiedlicher multipler Faktoren zur Ausprägung der AD führt.

#### **2.6.4.2 Makroskopische Veränderungen**

Atrophische Veränderungen bei der AD sind das Resultat eines progradienten und irreversiblen Neuronenverlustes und betreffen graue wie weiße Substanz. Die Ausprägung der Atrophie hängt dabei von Schwere und Progredienz der Erkrankung ab, ist bei der AD aber zumeist besonders im Bereich des medialen Temporallappens, des Parietallappens, des entorhinalen Cortex und des Hippokampus gut erkennbar (Tabelle 2.5). Weitere Abnahmen der Neuronendichte wurden u.a. im Bereich des posterioren zingulären Cortex beschrieben, während

im Gegenzug die sensomotorischen Areale, sowie die vorderen zingulären Bereiche in der Norm vorwiegend ausgespart bleiben (Brun und Englund, 1981). Die Patienten zeigen nach Schwere und Lokalisation der Atrophie entsprechende klinische Symptome. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass AD-Patienten mit (vergleichsweise selten auftretenden) visuellen Halluzinationen atrophische Veränderungen im Bereich des Okzipitallappens aufweisen (Holroyd et al., 2000; Berthier et al., 1991).

**Tab.2.5:** AD in der Bildgebung

Bildgebung	Hirnveränderungen
MRT	Mediotemporal betonte Atrophie mit vergrößerten Liquorräumen; Aufweitung der Sulci (frontal, temporal); Verkleinerung des Nucleus basalis (Meynert)
PET	Parietal, temporal und auch frontal verminderter Glukosestoffwechsel

#### 2.6.4.3 Neurofibrillen

Bei den alzheimertypischen neurofibrillären Bündeln (*neurofibrillary tangles*, NFT) handelt es sich im Wesentlichen um Ablagerungen des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau (Grundke-Iqbal et al., 1986; Wood et al., 1986). Weitere Komponenten kommen in vergleichbar geringerem Maße vor, und können grob in fünf Gruppen eingeteilt werden (Yen et al., 1995): Strukturproteine, Kinasen, Amyloid, Enzyme des Zytosols und Stress-assoziierte Moleküle.

Tau gehört zu den Typ-II-Mikrotubuli-assoziierten-Proteinen (MAP) und spielt eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des neuronalen Zytoskeletts, indem es an Mikrotubuli bindet und deren Aufbau und Quervernetzung ermöglicht. Diese Bindung wird vom Tau-Protein durch den Phosphorylierungsgrad reguliert. Das Tau-Protein ist somit ein wichtiger Bestandteil des hochgradig vernetzten Zellskeletts, und nimmt in abnorm phosphorylierter Form in den unter Tauopathien zusammengefassten Erkrankungen einen pathologischen Zustand an. Tatsächlich sind die Tau-Fibrillen zwar für eine AD charakteristisch, wenngleich nicht spezifisch: NFT kommen als Ablagerungen auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen vor (z.B. bei der

frontotemporalen Lobärdegeneration, kortikobasalen Degeneration) und können in selteneren Fällen bei einer AD sogar fehlen (Terry et al., 1987).

Im Verlauf der AD kommt es zu einer pathologischen Wechselwirkung zwischen Tau und Mikrotubuli: durch Hyperphosphorylierung aggregieren die Tau-Proteine und lagern sich üblicherweise in spiralförmiger (*paired helical filaments* PHF) und gerader (*straight filaments*) Struktur im Perikaryon und in den Dendriten ab (Terry et al., 1987; Kidd, 1963). Diese abgelagerten Fibrillen sind durchschnittlich von 10-15 nm großen Durchmesser. Verglichen mit dem normalen Tau, weist das in den PHF vorkommende Tau u.a. um 35% erniedrigtes Lysin und 100% erhöhtes Glycin auf (Liu et al., 1991).

Nach Absterben des betroffenen Neurons sind die helikalen Ablagerungen extrazellulär (*ghost tangles*) vorzufinden (Bondareff et al., 1989) und scheinen in ihrer Verbreitung einem typischen Muster (Stadien I und II → transentorhinale Regio, Stadien III und IV → limbisches System, Stadien V und VI → Assoziationsareale) zu folgen (Braak und Braak, 1991). Anzahl und Zunahme der NFT korrelieren grundsätzlich mit einer Zunahme der klinisch beobachtbaren Defizite des Patienten (Braak und Braak, 1991; Goedert, 1993).

Die hyperphosphorylierten Ablagerungen im Zellinneren führen zur Destabilisierung der Mikrotubuli und somit in der Folge zur Unterbrechung der axonalen Reizweiterleitung.

Unklar ist bislang, wieso es zur Hyperphosphorylierung und zur erhöhten Aggregationsbereitschaft des Tau-Proteins kommt. Vermutet wird eine veränderte Phosphatase- und Kinaseaktivität der geschädigten Neuronen (Goedert, 1993; Wang et al., 1995; Iqbal et al., 2009).

Die Rolle des Tau-Proteins bei der Entstehung der AD ist bislang noch nicht hinreichend geklärt. Während im klassischen Verständnis die Tau-Fibrillen neben anderen Faktoren ursächlich für die AD-Pathologie galten, wird in neueren Studien die kausale Verbindung zwischen NFT und Neurodegeneration immer wieder angezweifelt: zum einen können NFT auch in gesunden älteren Gehirnen vorkommen, zum anderen wurde nachgewiesen, dass bei einem AD-Nervenzellverlust von 60% im Schnitt nur 8,1% von den NFT ausgemacht wird (Kril et al., 2002).

Zwar wird in den meisten Fällen ein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der NFT und dem Schweregrad der AD festgestellt, dennoch ist unklar, ob die

Akkumulation der Ablagerungen tatsächlich für den Neuronenverlust verantwortlich ist, oder es sich hierbei vielmehr um ein Epiphänomen der Degeneration handelt. Teilweise wird die Bildung von NFT sogar als protektive Maßnahme der Zelle gegen den oxidativen Stress, ausgelöst durch die amyloiden Veränderungen, verstanden (Lee et al., 2005).

#### 2.6.4.4 Amyloide Plaques

Neben den Tau-Fibrillen lassen sich bei AD-Patienten als zweite charakteristische Ablagerung Amyloid-Plaques finden. Während in der klassischen Demenzforschung extrazellulär abgelagerte Plaques für die toxischen Effekte bei der AD verantwortlich gemacht wurden, häuften sich in den letzten Jahren die Hinweise darauf, dass Amyloid auch intrazellulär abgelagert wird (Casas et al., 2004; LaFerla et al., 2007). Die amyloiden Ablagerungen lassen sich nach ihrem komplexen Aufbau grundsätzlich in diffuse und neuritische Plaques einteilen: in den für die AD spezifischen *neuritischen* Plaques finden sich veränderte dystrophe Neuriten, aktivierte Mikroglia und reaktive Astrozyten (Braak et al., 1996; Wisniewski et al., 1985), während *diffuse* Plaques weder Neuriten noch aktivierte Gliazellen aufweisen und als Vorläufer der neuritischen Plaques beschrieben werden (Giaccone et al., 1989). Bereits Alzheimers Mitarbeiter beschrieben das Auftreten nichtneuritischer und seltener auch von neuritischen Plaques in den Gehirnen gesunder älterer Patienten (Von Braunmühl und Weber, 1936). Die amorphen und nicht-fibrillären diffusen Plaques sind nicht ausschließlich bei AD Patienten zu finden und können bereits Jahrzehnte vor dem Ausbruch der Erkrankung im Neocortex nachgewiesen werden. Das Volumen und die Dichte der im Laufe des degenerativen Krankheitsprozesses vermehrt vorkommenden neuritischen Plaques korreliert dabei mit dem Schweregrad der Demenz und der Ausprägung der kognitiven Defizite (Näslund et al., 2000). Durch welche Faktoren diffuse Plaques in neuritische Plaques umgewandelt werden, konnte bislang noch nicht hinreichend geklärt.

Die alzheimertypischen 8-10 nm großen neuritischen Plaques bestehen zu 90% aus einem aggregiertem Peptid, dem Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) (Glenner und Wong, 1984, Masters et al., 1985). Seit 1987 ist bekannt, dass dieses A $\beta$  aus der proteolytischen Spaltung des *Amyloid  $\beta$  Precursor Protein* (APP) hervorgeht (Kang et al., 1987). Die eigentliche Funktion von APP ist nach wie vor nicht hinreichend bekannt. Es wird

angenommen, dass dieses Membranprotein eine Rolle bei der Bildung von Zellkontakte spielt (Foßgreen, 1998; Priller et al., 2006). Durch alternatives Spleißen der APP-mRNA entstehen APP-Isoformen von unterschiedlicher Länge (die verschiedenen Varianten umfassen 365 – 770 Aminosäuren), die in neuralen sowie in nicht-neuralen Zellen vorkommen (Kang et al., 1987; Tanzi, 1988; Tanaka et al., 1988). APP wird von drei Proteasen, der  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Sekretase, geschnitten. Die Prozessierung des Proteins durch die  $\beta$ -Sekretase führt zur Bildung des A $\beta$ -Peptids (Abbildung 2.3).

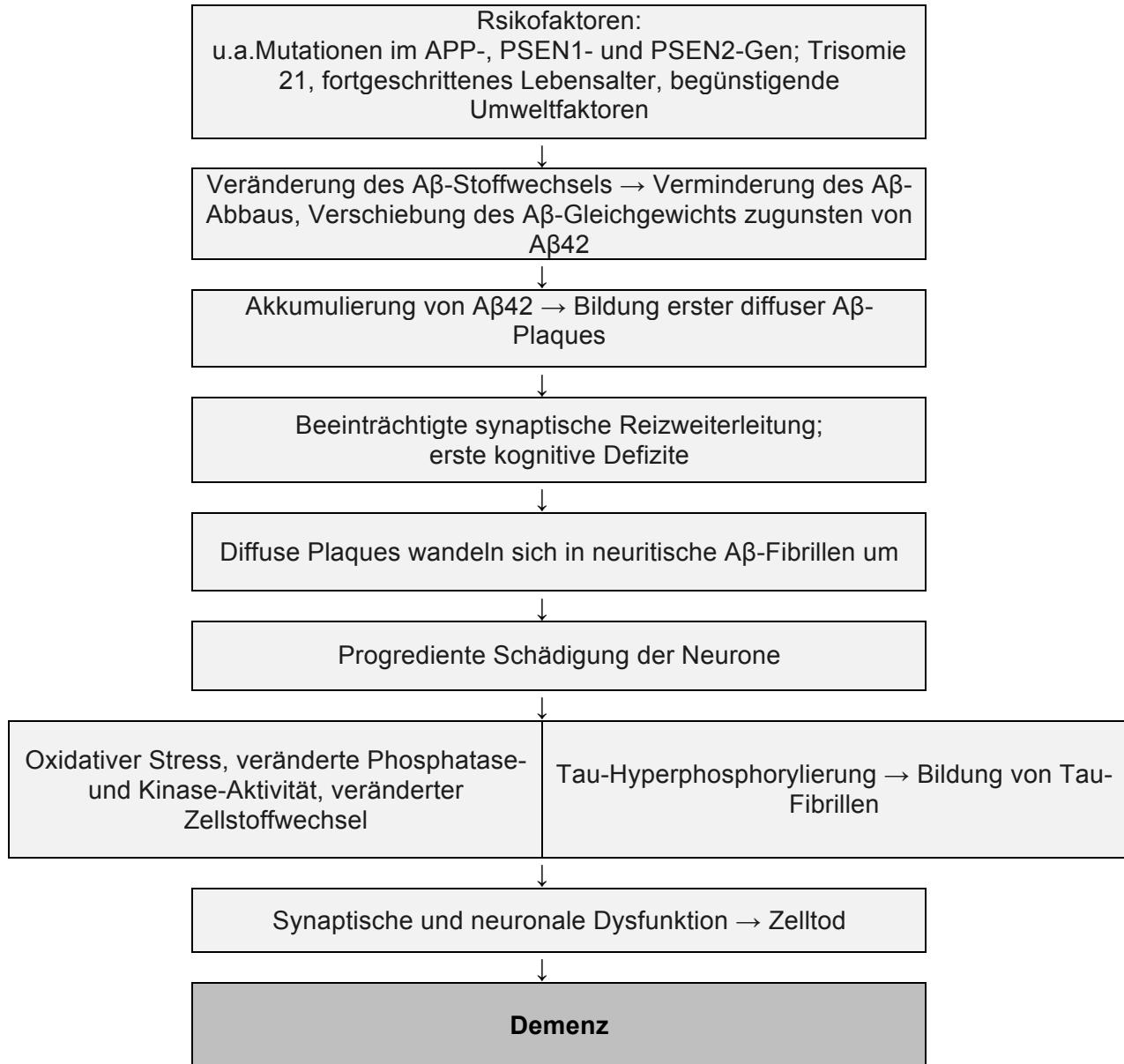
Neben A $\beta$  bestehen die Plaques aus weiteren Proteinkomplexen: immunhistochemisch identifiziert wurden u.a. inzwischen die Apolipoproteine A, E und J (Clusterin), Präsenilin, Ubiquitin, sowie  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin, Proteoglykane und Vitronectin (Perry et al., 1987; Wisniewski et al., 1993; Rozemuller et al., 1991; Selkoe et al., 1998; Snow et al., 1994; zur Übersicht: Ghiso und Blas, 2002). Der hydrophobe Hauptbestandteil A $\beta$  kommt in den neuritischen Plaques in verschiedenen Längen vor (Masters et al., 1985; Glenner und Wong, 1984), wobei 40-43 Aminosäuren lange Peptidketten (A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, A $\beta$ 43) überwiegen (Harigaya et al., 1995). A $\beta$ 42 und A $\beta$ 43 sind dabei hydrophober und aggregationsbereiter als A $\beta$ 40. Die Neurotoxizität dieser Peptide hängt offensichtlich von ihrer Aggregationsbereitschaft ab (Pike et al., 1991, Busciglio et al., 1992).

In den letzten Jahren ist mehr und mehr deutlich geworden, dass die bekannten Amyloidfibrillen ein inaktives Repitorium der eigentlich synaptotoxischen Spezies, nämlich der *löslichen* A $\beta$ -Oligomere sind (Haass und Selkoe, 2007). Dass diese löslichen Oligomere, die vor allem in der Form von Dimeren auftreten das eigentliche toxische Agens sind, stößt aktuell auf großes Forschungsinteresse und konnte in zahlreichen Studien wiederholt bestätigt werden (u.a. Lesné, 2006; Shankar et al., 2008). Es wurde u.a. gezeigt dass diese Oligomere die für das Gedächtnis fundamentale Funktion der LTP (*long term potentiation*) hemmen, die LTD (*long term depression*) fördern und die dendritische Vernetzung herabmindern (Shankar et al., 2008). Injiziert in Ratten konnten die Dimere bereits erlerntes Verhalten zerstören, während A $\beta$ -Plaques keine vergleichbare toxische Wirkung aufwiesen (Shankar et al., 2008).

Tatsächlich ist die eigentlich toxische A $\beta$ -Spezies noch nicht übereinstimmend identifiziert worden: neben den bekannten A $\beta$ (1-40) und A $\beta$ (1-42) wurden inzwischen auch A $\beta$ (1-8), A $\beta$ (9-16) und A $\beta$ (16) als mögliche Kandidaten diskutiert (zur Übersicht:

Pimplikar, 2009). Ebenso führte das Injizieren von zuvor aus Tg2576-Mäusen isoliertem A $\beta$ \*56 (extrazelluläres, lösliches A $\beta$  (56 kDa)) bei gesunden Ratten zu Gedächtnisstörungen (Lesné et al., 2006).

Diese löslichen Oligomere stehen am Beginn der sogenannten Amyloid-Kaskade (Abbildung 2.2), einer aktuell weitgehend akzeptierten Hypothese, die die Entstehung und Wirkung der Plaques als zentrales Ereignis für die Neurodegeneration bei AD versteht (Hardy und Selkoe, 2002; Haass und Selkoe, 2007): A $\beta$ 42 lagert sich aufgrund von einer Veränderung im A $\beta$ -Stoffwechsel in lösliche, diffuse Oligomere zusammen. Diese ersten diffusen Plaques stören bereits als Dimere die synaptische Reizweiterleitung der Neuronen (Kamenetz, 2003) und lagern sich im weiteren Prozess zu fibrillären und unlöslichen Depots zusammen. Mikroglia und Astrozyten werden durch die neuritischen Plaques aktiviert und führen durch die lokale Entzündungsreaktion in der Folge zur irreversiblen Schädigung der umliegenden Neurone. Im Zuge dieser Schädigung kommt es zur Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins und schlussendlich zum progredientem Nervenzelluntergang.



**Abbildung 2.2:** Die Amyloidkaskade (schematische Darstellung) nach Haass und Selkoe (2007)

Das Prinzip der Amyloidkaskade mit der Ablagerung von A<sub>β</sub> als zentralpathologischem Ereignis ist nicht umstritten. Während die für die familiäre EOAD ursächlich identifizierten Mutationen im Amyloid-Precursor-Protein (APP), sowie der Nachweis der amyloiden Toxizität eine solche Hypothese unterstützen, bleibt weiterhin fraglich weshalb diffuse Plaques auch bei gesunden Ältern gefunden werden oder auch warum A<sub>β</sub>-fokussierte Therapieansätze bislang von keinem durchschlagendem Erfolg gekrönt waren. Es ist weiterhin noch nicht bekannt, durch welche Faktoren diffuse Plaques zu neuritischen Fibrillen werden bzw. was zur falschen Prozessierung des APP durch die β-Sekretase führt.

Studien stellen die zentrale Rolle des Amyloids in Alzheimer-Gehirnen immer wieder in Frage: eine erst vor kurzem veröffentlichte Studie postuliert beispielsweise eine Überbewertung der Amyloid-Hypothese und rückt den cannabinoiden Rezeptor CB1 ins Zentrum ihrer Alzheimerforschung (Stumm et al., 2013).

Aufgrund des momentanen Forschungsstandes lässt sich abschließend bemerken, dass das A $\beta$ -Ungleichgewicht und die damit verbundene Aggregation von Monomeren über Oligomeren bis hin zu Fibrillen eine zentrale Rolle in der Entstehung der AD innehaben. Obwohl die Amyloidkaskade somit eine der bislang besterforschten Erklärungen zur Pathogenese der AD beisteuert, kann sie in der komplexen und multifaktoriellen Krankheitsentstehung nicht als alleinige pathophysiologische Ursache gewertet werden.

#### **2.6.4.5 Synapsenverlust**

Der Verlust von neuronalen Verbindungen steht am Ende einer langen Reihe pathologischer Ereignisse. Der Untergang der synaptisch verschalteten Neuronen bildet dabei die Klimax des neurodegenerativen Schädigungsprozesses und führt zu irreversiblen Ausfällen in der Reizweiterleitung.

Der Verlust von Synapsen ist dem Untergang von Neuronen teilweise zeitlich vorgelagert bzw. der Untergang von Neuronen bedeutet notwendigerweise auch immer Verlust von Synapsen. Dass der synaptische Degenerationsprozess bereits vor dem Neuronenverlust einsetzt, erklärt vermutlich die subtilen kognitiven Einbußen die Jahre vor dem Ausbruch der AD bereits im Patientenkollektiv mit LKS beobachtet werden können (Scheff et al., 2006). In diesem frühen Stadium der Erkrankung ist vor allem der Hippokampus vom synaptischen Verlust betroffen, aus diesem Grund manifestiert sich die Erkrankung zuerst in den meisten Fällen mit reinen Gedächtnisschwierigkeiten, bevor weitere kognitive Defizite hinzukommen (Selkoe, 2002). Das Gehirn verfügt auch noch im Alter über eine marginale plastische Kompetenz, um Störungen in der Reizweiterleitung zu kompensieren. In Hirngewebsproben von AD-Patienten wurden vermehrt Neuropili gefunden, die vermutlich den Verlust der Synapsen mit erhöhtem Kontakt auszugleichen versuchen (DeKosky und Scheff, 1990). Die Fähigkeit der Zelle, den Verlust von Synapsen durch vermehrte dendritische Sprossung auszugleichen, wird mit dem Fortschreiten der AD allerdings erschöpft und es kommt zum endgültigen Verlust der neuralen

Konnektivität (DeKosky und Scheff, 1990). Lösliche A $\beta$ -Oligomere werden als schädliches Agens hinter der synaptischen Degeneration vermutet: in den letzten Jahren wurde festgestellt, dass sowohl die LTP sowie die dendritische Vernetzung von diesen Oligomeren gehemmt, und die LTD gefördert wird. Neben dem Hippokampus verlieren im weiteren Verlauf der AD v.a. der frontale und temporale Bereich ihre Synapsen.

Die Abnahme von Synapsen kann mittels Antikörpern von Synaptophysin und Synapsin I ermittelt werden (Masliah et al., 1989; Hamos et al., 1989) und korreliert dabei am besten mit der Zunahme der kognitiven Defizite (Terry et al., 1991; DeKosky und Scheff, 1990). Die vom Patienten erreichten Punkte beim MMSE (*Mini Mental State Examination*) nehmen im Verhältnis zum steigendem Verlust der Synapsen ab (Scheff et al., 2006).

#### **2.6.4.6 Neuronenverlust**

Nach älteren Befunden sind besonders acetylcholinerge Neuronen bei der AD von progredienter Degeneration betroffen (Davies und Maloney, 1976; Whitehouse et al., 1981); ein signifikanter Rückgang der Neurone von bis zu 80% findet im Nukleus basalis Meynert (NB) statt, dem wichtigsten Areal für die cholinerge Produktion (Whitehouse et al., 1981; 1982; Vogels et al., 1990). Der Nucleus basalis versorgt mit seinen Efferenzen den Cortex sowie das limbische System, und sorgt somit als wichtiger Teil des ARAS (aufsteigendes retikuläres aktivierendes System) für die fundamentale hippocampo-neokortikale Kopplung. Acetylcholin hat damit eine Schlüsselrolle in der Bildung und im Abruf von Gedächtnisinhalten (Drachman und Leavitt, 1974). Aus diesen Zusammenhängen, nämlich dass es einerseits zum Verlust cholinriger Neuronen bei AD kommt, und diese andererseits eine maßgebliche Rolle bei den mnestischen Funktionen spielen, wurde die cholinerge Hypothese formuliert. Infolgedessen kam es zur Zulassung von Acetylcholinesterasehemmern wie Rivastigmin und Donepezil, die nach wie vor zur symptomatischen Behandlung leichter bis mittelschwerer AD eingesetzt werden.

Neben dem acetylcholinergen sind im Rahmen einer AD weitere Neurotransmittersysteme vom Rückgang betroffen: glutamaterge, noradrenegre und serotonerge Neurone degenerieren sukzessive (Maragos et al., 1987; Raskind et al., 1984; Cross et al., 1984) und werden neben kognitiven Einbußen insbesondere für

Störungen von Antrieb und Affekt verantwortlich gemacht. Der Neuronenverlust ist besonders in den jeweiligen transmitter-produzierenden Kernen ersichtlich. Im Vergleich zur Substantia nigra (Dopamin) zeigen AD Patienten einen vierfach erhöhten Nervenzellverlust im Nucleus basalis (Acetylcholin) und im Locus coeruleus (Noradrenalin), sowie einen dreifach erhöhten Verlust in den dorsalen Raphe-Kernen (Serotonin) (Lyness et al., 2003). Besonders betroffen vom Nervenzellverlust ist bei der AD der für die Gedächtniskonsolidierung zuständige Hippokampus (Hyman et al., 1984; West et al., 1994; Fox et al., 1996).

Besondere Aufmerksamkeit wurde neben Acetylcholin dem glutamatergen System geschenkt: Glutamat wirkt als erregender Neurotransmitter im ZNS auf ionotrope und metabotrope Rezeptoren, wobei besonders die ionotropen NMDA- und AMPA-Rezeptoren eine Schlüsselrolle in der langandauernden Verstärkung der synaptischen Übertragung (LTP) innehaben (Lynch und Baudry, 1989; Collingridge und Bliss, 1987; Tocco et al., 1992). Während bei moderater Aktivierung Glutamat die synaptische Übertragung stärken kann, wirkt es in hohen Mengen exzitotoxisch. Durch *postmortem* Analysen wurde festgestellt, dass AD Patienten eine geringere Glutamatrezeptorendichte im Vergleich zum Normalkollektiv aufweisen (Sasaki et al., 1986; Lowe et al., 1989). Diese Befunde führten zur glutamatergen Hypothese (Maragos et al., 1987) bzw. zum therapeutischen Einsatz des NMDA-Antagonisten Memantin bei fortgeschrittener AD.

Von früher und tiefgreifender Neurodegeneration ist der entorhinale Cortex als Verbindungsstück zwischen Hippokampus und Neocortex betroffen: bereits im Anfangsstadium leichter AD ist ein Neuronensterben von insgesamt 32% und bei fortgeschrittener AD ein schichtenspezifischer Verlust von 70 % (*layer I/IV*) bis hin zu dramatischen 90% (*layer II*) ersichtlich (Gómez-Isla et al., 1996).

In der Zusammenschau der hirnanatomischen Befunde lässt sich im Rahmen einer AD ein regionenspezifischer Nervenzelluntergang in katastrophalem Ausmaß feststellen. Die Degeneration der Neuronen ist im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf mit bloßem Auge als Atrophie gut erkennbar. Das im Schwinden begriffene Gehirn eines AD Patienten zeigt tiefe und breite *Sulci*, die *Gyri* wirken verflacht und schmäler, insbesondere im mediotemporalen und parietalen Bereich. Die Betonung der kortikalen Atrophie kann allerdings individuell ausgeprägt sein, mit beispielsweise eher untypischen okzipitalen Gewebsschwund. Obwohl v.a. der Neocortex und die tieferliegenden Kerne von atrophischen Prozessen betroffen sind, gilt es

festzuhalten, dass auch die weiße Substanz degeneriert. Durch MRT Aufnahmen konnte beispielsweise eine Degeneration der weißen Substanz des Corpus Callosum (CC), dem Verbindungsstück zwischen der linken und rechten Hemisphäre, festgestellt werden (Di Paola et al., 2010).

#### **2.6.4.7 Immunologische Faktoren der Alzheimer Demenz**

Durch den mikroskopischen Nachweis von molekularen Entzündungsindikatoren (u.a. Zytokine, C-reaktives Protein), sowie Astrozyten und Mikroglia in amyloidogenen Ablagerungen kam die Vermutung auf, dass immunologische und gliale Prozesse eine maßgebliche Rolle in der AD Pathologie spielen (Ishii und Haga, 1976). Dabei wurde zunehmend der Verdacht formuliert, dass die inflammatorischen Prozesse keine reine Begleiterscheinung der Neurodegeneration sind, sondern dass diese vielmehr selbst mit zum Untergang der Neurone beitragen: beschädigte Neurone, Neuriten, sowie A $\beta$  lösen eine entzündliche Reaktion aus und aktivieren inflammatorische Mediatoren, die überexprimiert und im chronischen Verlauf zur Nekrose führen (Akiyama et al., 2000; Eikelenboom und Stam, 1982; Eikelenboom et al., 1988; McGeer et al., 1989). Durch fibrillöse Plaqueentstehung werden Komplementfaktoren aktiviert, die ihrerseits Mikroglia aktivieren, die wiederum zu einer erhöhten Komplementproduktion (v.a. C1q, C2 und C3) führen (Ishii et al., 1988; Haga et al., 1993). Diese Komplementfaktoren ordnen sich um die A $\beta$ -Plaques an und unterstützen diffuse Plaques offensichtlich in ihrer Umwandlung zu neuritischen Plaques. Allerdings kommt es nicht nur durch Mikroglia, sondern auch durch Astrozyten und den Neuronen selbst zur Produktion und Ausschüttung von Zytokinen, die im Verlauf autotoxisch wirken (McGeer et al., 1995). Exprimiert werden dabei die Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6), der Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), sowie  $\alpha$ 2-Makroglobulin (Griffin et al., 1989; Bauer et al., 1991; Licastro er al., 2000; Tarkowski et al., 1999). Neben den Zytokinen und Komplementfaktoren kommen des Weiteren Akute-Phase-Proteine (z.B. C-reaktives Protein) und Proteasen vor (Rogers et al., 1992; Kitaguchi et al., 1988) – insgesamt wird ein heterogenes und breitgefächertes Spektrum immunologischer Proteine aktiviert, die im Regelfall protektive Eigenschaften, falsch oder unreguliert allerdings zellzerstörerische Wirkung haben. Die Degeneration von NB und Locus coeruleus könnte bei der chronischen Entzündungsreaktion unterstützend wirken, da dem dort

produzierten Norepinephrin und Acetylcholin eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben wird (Heneka und O'Banion, 2007).

Gliale Aktivierung spielt eine große Rolle bei neuroimmunologischen Prozessen und steht offenbar in kausaler Verbindung zum  $\beta$ -Amyloid: A $\beta$  aktiviert gliale Zellen, die ihrerseits wiederum durch die Aktivierung diverser Zytokine (z.B. IL-1 und bFGF) die Synthese von APP und weiteren plaquebildenden Komponenten fördern (Araujo und Cotman, 1992; Griffin et al., 1998; Apelt und Schliebs, 2001). Der durch gliale Aktivierung ausgelöste Zytokin-Teufelskreis scheint wesentliche Beiträge zur Degeneration der umliegenden Neurone beizusteuern.

Im Plasma sowie im Cerebrospinalfluid sind viele solcher immunologischen Komponenten (beispielsweise  $\alpha$ 1-Antitrypsin (AAT), IL-6, oxidiertes *low-density* Lipoprotein (oxLDL)) nachweisbar und werden als mögliche unterstützende Marker für eine AD diskutiert (Sun et al., 2003).

Die Entzündungshypothese der AD fand in den Medien zwischenzeitlich ein breites Echo, u.a. weil die Prävalenz Demenzkranker unter Rheumatikern auffallend niedrig erschien. Nichtsteroidalen Antirheumatika, die bei rheumatischen Erkrankungen angewendet werden, wurde ein positiv protektiver Effekt zugeschrieben (Stewart et al., 1997; McGeer et al., 1996; Kang und Grodstein, 2003). In anderen Studien konnte diese Befundlage nicht repliziert werden (Fourrier et al., 1996; Prince et al., 1998), wenngleich in einigen kognitiven Teilaufgaben ein moderater positiver Trend auffiel. Dass neuroimmunologische Faktoren mehr als eine Begleiterscheinung im zellschädigenden Prozess sind, ist in Anbetracht der Befundlage eine durchaus plausible Annahme.

#### **2.6.4.8 Oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion**

Beim oxidativen Stress handelt es sich um ein zelluläres Ungleichgewicht zwischen oxidativen und reduktiven Prozessen zugunsten der oxidativen Reaktionen. Durch sauerstoffabhängige Redoxreaktionen werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet, die in der Folge als freie Radikale ihre Elektronenlücke aufzufüllen versuchen, und dabei Zellmembran, Proteine, Enzyme und die DNA verändern. Während in der gesunden Zelle ein effizientes System von Antioxidantien diese Veränderungen reguliert, ist unter pathologischen Konditionen die Ausbalancierung der oxidativen Reaktionen nicht immer möglich. ROS werden von Immunzellen, aber

auch als Nebenprodukt der Zellatmung in den Mitochondrien gebildet. Bereits in den 90er Jahren verdichteten sich die Hinweise darauf, dass oxidativer Stress nicht nur im Rahmen des normalen Altersprozesses auftritt, sondern auch eine neuronenschädigende Rolle im Pathomechanismus der AD einnimmt (Mecocci et al., 1994; Good et al., 1996; Markesberry et al., 1997; Markesberry, 1999; Nunomura et al., 1999; Christen, 2000).

Für die oxidative-Stress-Hypothese sprechen mehrere Befunde: zum einen wurde in *postmortem* Analysen von Alzheimer-Gehirnen eine erhöhte oxidative Schädigung von Proteinen, Lipiden, DNA, nDNA und mtDNA festgestellt, zum anderen fand sich verminderte enzymatische Antioxidant-Aktivität unterschiedlicher Oxidoreduktasen (Markesberry, 1997; Parker et al., 1990).

Weitere Befunde zeigen einen kausale Verbindung zwischen Amyloid-Beta (1-42), ApoE und oxidativen Stress auf: A $\beta$  (1-42) scheint in die Generierung von den schädlichen freien Radikalen involviert, wohingegen den ApoE-Proteinen antioxidantische Kapazität nachgewiesen wurde, die allelabhängig unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Varadarajan et al., 2000; Butterfield et al., 2001; Butterfield, 2002). Passenderweise konnte die  $\epsilon$ 4-Isoform mit der geringsten antioxidierenden Aktivität assoziiert werden (Antioxidante Kapazität:  $\epsilon$ 2> $\epsilon$ 3> $\epsilon$ 4) (Lauderback et al., 2002).

Mecocci et al. stellte eine im Vergleich zu gesunden Gleichaltrigen dreifach erhöhte Menge an 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin (OH8dG) in der mtDNA im parietalen Cortex von AD-Patienten fest (Mecocci et al., 1997). Veränderungen der mitochondrialen DNA bzw. in Mitochondrien-assoziierten-Enzymen werde als Hauptursache für die Generierung von freien Radikalen in der AD diskutiert (Smith et al., 2000; Mancuso et al., 2008; Gerschütz et al., 2013).

Tatsächlich sprechen einige Befunde für eine mitochondriale Fehlfunktion im alzheimer'schen Phänotyp: veränderte mitochondriale Strukturen, ebenso wie veränderte enzymatische Aktivität von mitochondrialen Enzymen (beispielsweise Cytochrom-c-Oxidase (COX),  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex (OGDC) und Pyruvatdehydrogenase-Komplex) konnten in AD-Patienten nachgewiesen werden (Oreland und Gottfries, 1986; Hirai et al., 2001). Diese enzymatische und mitochondriale Fehlregulierung, die in der Folge zu schwerwiegenden zellulären Schäden durch oxidativen Stress führt, scheint u.a. durch erhöhte A $\beta$ -Produktion

begünstigt zu werden (Manczak et al., 2011; Calkins und Reddy, 2011; Reddy, 2009; Wang et al., 2009).

#### **2.6.4.9 Vaskuläre Komponenten der Alzheimer Demenz**

Eine Vielzahl von Untersuchungen lassen einen Zusammenhang zwischen vaskulären Veränderungen und der AD vermuten. Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass vaskuläre Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie eine Rolle in der Pathogenese der AD einnehmen und eine schnellere Krankheitsprogression bei AD-Patienten bedingen (Helzner et al., 2009; Kume et al., 2011). Desgleichen konnte in diversen Studien gezeigt werden, dass AD überzufällig häufig in Koinzidenz mit kardiovaskulären Erkrankungen auftritt (Breteler et al., 2000; Aguero-Torres et al., 2006). Weiterhin zeigte sich in histopathologischen Untersuchungen eine signifikant höhere Anzahl an vaskulären Läsionen in Gehirnen von AD-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollgehirnen, während sich jedoch keine Korrelation zwischen der Schwere der AD (Braak-Stadien) und den zerebrovaskulären Veränderungen feststellen ließ (Jellinger und Attems, 2006).

Trotz mannigfaltiger Studienlage ist die Beteiligung der vaskulären Komponenten in der Pathogenese der AD bislang nicht hinreichend geklärt. So konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie beispielsweise keine signifikante Assoziation zwischen der AD und zerebrovaskulärer Dysfunktion festgestellt werden (Spies et al., 2014).

Der aktuelle Forschungsstand lässt vermuten, dass eine „reine“ AD ohne vaskuläre Beteiligung weniger häufig auftritt als bisher angenommen. Es ist gegenwärtig nicht abschließend geklärt, welche Rolle vaskuläre Dysfunktionen in Ausbruch und Progression der Erkrankung innehaben.

## 2.7 Genetik der Alzheimer Demenz

Da Alzheimer häufig bei Patienten mit belasteter Familienanamnese zu beobachten ist, wurde bereits Anfang des letzten Jahrhunderts ein Zusammenhang zwischen genetischer Prädisposition und AD vermutet. Technologische Fortschritte erlaubten sukzessive einen verbesserten Zugang zur Erbinformation. Inzwischen ist die Identifizierung autosomal-dominanter Erbgänge gelungen, die zur selteneren *familiären* Form der AD (FAD) führen. Im Gegenzug dazu stehen eine Reihe weiterer genetischer Variationen, die zur verbreiteteren *sporadischen* Form der AD führen. Die familiäre Form imponiert mit einem frühen Erkrankungsbeginn (<65 Jahre) und einer raschen Progredienz. Die FAD wird häufig durch Einzelgenmutationen bedingt und ist mehrheitlich vollständig penetrant.

Der sporadischen Form der AD liegt hingegen kein monogener Defekt zugrunde. Die phänotypische Krankheitsmanifestation kann erstmals in unbelasteten Familien auftreten und bricht üblicherweise bei Über-65-Jährigen aus (*late-onset Alzheimer's Disease*, LOAD). In weniger häufigen Fällen manifestiert sich die sporadische Form bereits im Präsium, tritt im Gegensatz zur FAD jedoch ohne autosomal-dominant vererbte Mutationen auf (*sporadic early-onset Alzheimer's Disease*, EOAD) (Bagyinszky et al., 2014). Zweifelsohne spielt die genetische Prädisposition auch im Patientenkollektiv der sporadischen Form eine wichtige Rolle: wenngleich es bei der sporadischen Form der AD häufig keine augenscheinlich belastete Familienanamnese gibt, konnten verschiedene genetische Loci ausfindig gemacht werden, die die Suszeptibilität für AD erhöhen. Träger einer bestimmten Isoform eines Risikogens haben somit im Vergleich zum Normalkollektiv ein erhöhtes Risiko, an der sporadischen Form der AD zu erkranken. Zu diesen bisher identifizierten Loci gehören neben dem bekannterem Apolipoprotein-E4 (ApoE4) auch das PICALM-Gen (*phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein*) und das ApolipoproteinJ (ApoJ oder Clusterin (CLU)) (Harold et al., 2009; Sanan et al., 1994).

Insgesamt ist die AD genetisch heterogen, verschiedene Mutationen und genetische Variationen können einem unterschiedlichen alzheimer'schen Phänotyp zugrunde liegen (Tabelle 2.6 und 2.7). Eine präsymptomatische Diagnose der FAD, sowie die ApoE-Genotypisierung für die LOAD wären möglich, sind allerdings – nicht zuletzt wegen mangelnder therapeutischer Maßnahmen – umstritten. Eine APOE-Genotypisierung zur AD-Diagnostik wird momentan nicht empfohlen, während eine

humangenetische Beratung bei den Angehörigen eines FAD-Falles sicherlich von Nutzen für die weitere Lebensplanung sein kann (Förstl, 2009). Unabhängig vom fragwürdigen diagnostischen Nutzen ist die Gendiagnostik gerade für das Verständnis der Erkrankung und der Entwicklung therapeutischer Interventionen unerlässlich.

**Tab. 2.6:** Bekannte genetische Variationen der FAD

Phänotyp	Gen	Protein	Chromosomale Lokalisation	Risikofaktor
FAD, Down-Syndrom	APP	APP	21q21	Überzählige Kopie, <i>Missense-Mutationen</i>
FAD	PSEN1	PS1	14q24.3	<i>Missense-Mutationen</i>
FAD	PSEN2	PS2	1q31-a42	<i>Missense-Mutationen</i>

## 2.7.1 Familiäre Form der Alzheimer Demenz

Die autosomal-dominante Form der AD tritt in der Regel vergleichsweise früh (*age at onset* <60 Jahren) auf, und ist auf ein kleineres Patientenkollektiv von rund 1%-5% beschränkt (Rogaeva, 2002). Drei verantwortliche Gene sind durch Kopplungsanalysen identifiziert worden. Es handelt sich dabei um Präsenilin-1, Präsenilin-2 und das Amyloid-*Precursor-Protein*.

### 2.7.1.1 Präsenilin-1 und Präsenilin-2

Die genetischen Mutationen der Transmembranproteine Präsenilin-1 und Präsenilin-2 wurden Anfang bzw. Mitte der 90er Jahre identifiziert und mit der AD in kausale Verbindung gebracht (Mullan et al., 1992; Schellenberg et al., 1992; Sherrington et al., 1995; Levy-Lahad et al., 1995).

Präsenilin-1 (PSEN1) konnte auf dem q-Arm des Chromosoms 14 (14q24.3) lokalisiert werden (Levy-Lahad et al., 1995; Cruts et al., 1996). Präsenilin-2 (PSEN2) wurde kurze Zeit später auf den q-Arm des 1. Chromosoms (1q31-q42) gefunden (Levy-Lahad et al., 1995; Cruts et al., 1996).

197 Mutationen im PSEN1 wurden inzwischen bei Patienten mit EOAD identifiziert (Molgen, Stand November 2014; Cruts et al., 2012); diese Mutationen verantworten den überwiegenden Teil der seltenen familiären AD und werden mit einem

besonders frühen Krankheitsbeginn zwischen 32 und 56 Jahren (Durchschnittsalter bei Krankheitsausbruch liegt bei etwa 46 Jahren) assoziiert. Bei der seltenen L235P Mutation (Austausch von Leucin durch Prolin bei Position 235) kommt es zu einem besonders frühen Erkrankungsbeginn mit rund 32 Jahren.

In den meisten Fällen handelt es sich bei den Mutationen im PSEN1-Gen um *Missense*-Mutationen, d.h. durch den punktuellen Austausch einer einzelnen Nukleinbase wird für eine andere Aminosäure (AS) codiert. Die bislang erforschten Mutationen scheinen alle vollständig penetrant zu sein, d.h. bei Trägern solcher Mutationen kommt es in jedem Fall zur Ausprägung des zugehörigen Phänotyps. Rund 6 Jahre nach ihrem Ausbruch führt die durch Mutationen im PSEN1 ausgelöste AD zum Tod. PSEN1-Mutationen zeichnen sich klinisch demnach neben einem dramatisch frühen Krankheitsbeginn auch durch eine rasche Progredienz aus.

Bei PSEN2 wurden bislang 20 Mutationen identifiziert (Molgen, Stand November 2014; Cruts et al., 2012). PSEN2 wurde aufgrund seiner Homologie zu PSEN1 auf Chromosom 1 lokalisiert und mit der AD in kausale Verbindung gebracht (Rogaev et al., 1995; Levy-Lahad, 1995). Bei den bislang identifizierten Mutationen im PSEN2-Gen handelt es sich wiederum vorwiegend um *Missense*-Mutationen. So wird bei der bekannten, in der wolgadeutschen Population gefundenen *Missense*-Mutation „N141I“, beispielsweise die AS Asparagin durch die AS Isoleucin bei Position 141 ersetzt (Levy-Lahad, 1995). Die verschiedenen Mutationen werden mit unterschiedlichen klinischen Phänotypen assoziiert, wobei diese für die AD atypisch erscheinen können. Bei einigen Mutationen überwiegen tiefgreifende Verhaltensdefizite, bei anderen überwiegen die kognitiven Einbußen (z.B. Piscopo et al., 2008). Insgesamt gehen Mutationen im PSEN2 mit einem Krankheitsbeginn zwischen 40-75 Jahren einher und scheinen nicht vollständig penetrant zu sein (Sleegers et al., 2004; Campion et al., 1999): zwei Träger der „wolgadeutschen“ Mutation entwickelten auch mit über 80 Jahren keine Krankheitssymptome (Raux et al., 2005; Jayadev et al., 2010). Die mittlere Krankheitsdauer liegt bei 7,6 Jahren. Verglichen mit den PSEN1-Mutationen handelt es sich bei den mit PSEN2 assoziierten Krankheitsbildern um eine milder Form der AD.

Präsenilin zählen zu den Transmembranproteinen, die ubiquitär im Organismus exprimiert und alternativ gespleißt werden, aber vorwiegend im endoplasmatischen Reticulum und im Golgi-Apparat der Nervenzellen vorkommen. Zusammen mit weiteren Proteinen (Nicatrin, Präsenilin-Enhancer-2 (PEN-2) und Anterior Pharynx-

defective 1 (APH-1)) bilden sie den Gamma-Sekretase-Komplex (Kopan und Goate, 2002). Weitere physiologische Funktionen sind noch relativ unklar. Die  $\gamma$ -Sekretase spielt gemeinsam mit der  $\beta$ -Sekretase eine tragende Rolle bei der A $\beta$ -Prozessierung: indem sie aus dem APP die kleineren, neurotoxischen Bruchstücke schneiden, generieren sie die für die AD typischen A $\beta$ -Plaques. Die  $\gamma$ -Sekretase führt dabei den letzten entscheidenden Schnitt aus, indem sie innerhalb der Transmembrandomäne aus dem von der  $\beta$ -Sekretase generierten Bruchstück das kleine 39-42 AS lange A $\beta$  schneidet. Dies lässt darauf schließen, dass Präsenilin eine maßgebliche Rolle in der Regulierung der  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität und somit in der AD-Pathologie innehat. Neben der Bildung des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes spielen die Präseniline auch eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und sind an der Spaltung von Notch beteiligt (Chen und Schubert, 2002). Insgesamt ist die vollständige Funktion der Präseniline noch nicht erschöpfend geklärt.

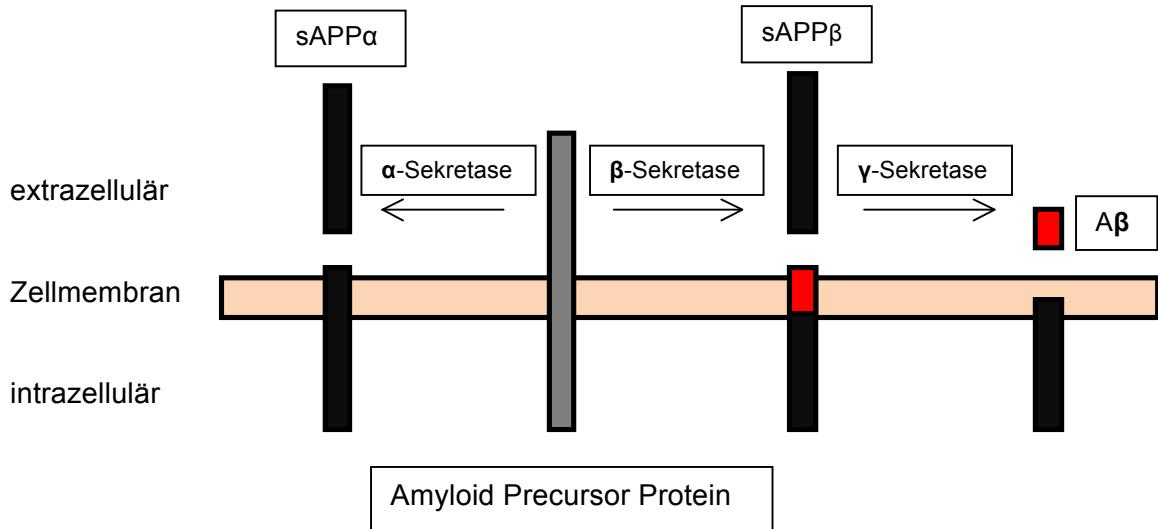
Zusammenfassend lässt sich demnach feststellen, dass Präsenilin in engen kausalem Zusammenhang mit der hochregulierten Freisetzung von A $\beta$  steht. Sowohl Präsenilin-1, als auch Präsenilin-2 erhöhen die Prozessierung von neurotoxischen A $\beta$ -Plaques und unterstützen somit die Hypothese der amyloidogenen Pathogenese.

### **2.7.1.2. Amyloid Precursor Protein**

Als erstes Gen ursächlich für die EOAD wurde 1991 das APP-Gen lokalisiert (Goate et al., 1991). Das APP-Gen liegt auf Chromosom 21 (21q21.3), besteht aus 19 Exons und nimmt dabei einen Bereich von 400 Kilobasen ein (Lamb et al., 1993).

Durch alternatives mRNA-Spleißen und posttranskriptionale Modifikationen werden unterschiedliche APP-Isoformen von verschiedener Aminosäurenlänge hergestellt. Neben den ubiquitär vorkommenden 770 und 751 AS-langen Isoformen, kommt in Neuronen v.a. eine 695 AS-lange Spleißvariante (APP695) vor (Tanaka et al., 1988). Das APP besitzt sowohl einen großen, N-terminalen extrazellulären, sowie einen kleineren, C-terminalen intrazellulären Anteil. Es wird durch verschiedene Enzyme prozessiert und in kleinere Peptide geschnitten. Durch die drei Sekretasen ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase) durchläuft das APP eine mehrfache proteolytische Spaltung. Aus trans- und extrazellulären Bereichen des APPs wird das A $\beta$  geschnitten (Kang et al., 1987; Selkoe et al., 1988), wobei nur bei der Prozessierung durch die  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Sekretase (nicht aber durch die  $\alpha$ -Sekretase) das neurotoxische A $\beta$  freigesetzt wird (Abbildung

2.3). Die nicht-toxisch wirkenden Fragmente, die aus dieser Prozessierung hervorgehen, werden als sekretorisches APP $\alpha$  (sAPP $\alpha$ ), respektive als sekretorisches APP $\beta$  (sAPP $\beta$ ) bezeichnet.



**Abbildung 2.3:** Die Prozessierung von APP

34 Mutationen im APP-Gen, die den alzheimer'schen Phänotyp bedingen, konnten bislang identifiziert werden (Molgen, Stand November 2014; Cruts et al., 2012). Bei den betroffenen Personen bricht die AD im Mittel mit 50,7 Jahren aus (Molgen, Stand November 2014; Cruts et al., 2012).

Durch *Missense*-Mutationen innerhalb des A $\beta$  oder in unmittelbarer Nähe der Sekretase-Schnittstellen kommt es zu einer verstärkten Spaltung an der betroffenen Stelle (Citron et al., 1992) und infolgedessen zur vermehrten bzw. veränderten Prozessierung des Vorläuferproteins: dies führt zu einem deutlichen Anstieg von A $\beta$  (Scheuner et al., 1996; Mullan et al., 1992; Nilsberth et al., 2001; Haass et al., 1995; Johnston et al., 1994; Citron et al., 1994; Suzuki et al., 1994). Bei den bislang identifizierten APP-Mutationen handelt es sich häufig um Punktmutationen. Die häufigste Mutation (V717I), tauscht die AS Valin mit der AS Isoleucin bei Position 717 aus.

Bei der Chromosomenabbereration Trisomie 21 liegt das APP-Gen in dreifacher Ausführung vor. Die erhöhte Gendosis führt bei den Betroffenen bereits in jungen Jahren zu einer erhöhten Plaqueproduktion und alzheimerähnlichen Symptomen (Holland und Oliver, 1995; Hirabayashi et al., 1979).

Abschließend lässt sich feststellen, dass ebenso wie beim Präsenilin, Mutationen im APP-Gen zu einer vermehrten Generierung des neurotoxischen A $\beta$  führen, und so eine amyloidogene Pathogenese der AD unterstützen.

## 2.7.2 Sporadische Form der AD

Die Mehrzahl der von AD betroffenen Personen leidet an der sporadischen Form der AD. Im Gegenzug zur familiären folgt diese keinem monogenetischen Erbgang, sondern wird auf genetischer Ebene vermutlich von einer Vielzahl an Suszeptibilitätsgenen begünstigt (Tabelle 2.7). Diese genetischen Loci steigern bei homo- beziehungsweise heterozygoten Trägern das relative Erkrankungsrisiko und sind durch genomweite Assoziationsstudien (GWA) lokalisiert worden. Im Vergleich zur familiären Form tritt die sporadische AD später auf.

### 2.7.2.1 Aktuelle Suszeptibilitätsgene

Das APOE-Gen findet sich auf Chromosom 19 (19q13.2) und liegt in mindestens drei Allel-Varianten vor ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ ). Die drei Allel-Formen codieren für drei verschiedene Protein-Isoformen (E2, E3, E4), die sich in jeweils einer AS unterscheiden. Die unterschiedlichen Varianten setzen ihre Träger einem ungleich erhöhtem bzw. einem erniedrigtem Erkrankungsrisiko aus: Hetero- bzw. Homozygotie erhöht bei den jeweiligen Trägern das relative Erkrankungsrisiko um 20% - 90% (Corder et al., 1993; Saunders et al., 1993; Strittmatter et al., 1993). Der  $\epsilon 2$ -Variante wird hingegen ein protektiver Effekt zugeschrieben, da Träger dieses Genotyps mit einem geringeren Erkrankungsrisiko assoziiert wurden (Corder et al., 1994), während das E3-Allel insgesamt in homozygoter Ausführung am häufigsten in der gesunden Bevölkerung vorkommt.

ApoE wird vorwiegend von Astrozyten synthetisiert und spielt eine maßgebliche Rolle bei neuronalen Reparatur- und Regenerationsprozessen, wobei die verschiedenen Isoformen unterschiedlich agieren: ApoE4 weist *in vitro* eine defizitäre Entwicklung im Vergleich zu ApoE3 auf (Holtzman et al., 1995). Darüber hinaus korreliert eine erhöhte ApoE4-Gendosis mit vermehrten Amyloidablagerungen (Schmechel et al., 1993). ApoE4 bindet außerdem an das Protein Tau und könnte somit in kausalem Zusammenhang mit der neurofibrilliären Bildung stehen (Strittmatter et al., 1994).

Wenngleich das homo- bzw. heterozygote Vorliegen des  $\epsilon 4$ -Allels das relative Erkrankungsrisiko erhöht, kann es weder als eine hinreichende, noch notwendige Bedingung der AD verstanden werden: nicht alle AD-Patienten sind ApoE4-Träger bzw. nicht alle ApoE4-Träger entwickeln den AD-Phänotyp (Kounnas et al., 1995; Rebeck et al., 1994). Verglichen mit dem geläufigerem  $\epsilon 3$ - Allel setzt das  $\epsilon 4$ - Allel seine heterozygoten Träger einem dreifach erhöhtem, seine homozygoten Träger einem bis aufs zwölffach erhöhte Erkrankungsrisiko aus (Ashford, 2004).

In den letzten Jahren wurden durch genomweite Assoziationsstudien (GWA) weitere Kandidatengene lokalisiert. Mit der LOAD assoziierte SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) wurden in diversen Genen gefunden, wobei nicht jeder Befund repliziert werden konnte. Unter den interessantesten potenziellen Risikogenen findet sich neben BIN1 (*bridging integrator 1*) (Seshadri et al., 2010; Hu et al., 2011), CR1 (*complement receptor 1*) (Lambert et al., 2009) und SORL1 (*sorilin-related receptor L (DLR class) A repeats-containing*) (Rogaeva et al., 2007) auch CLU (Harold et al., 2009; Lambert et al., 2009) und PICALM (Harold et al., 2009). Die Proteine dieser Gene sind vielfältig tätig, u.a. in der Immun- und Entzündungsreaktion (Clusterin, CR1), im Lipidstoffwechsel (Clusterin) und in der Regulierung von APP (SORL1). Tatsächlich überschneidet sich der Wirkungsbereich einiger Proteine mit den bislang bekannten Pathomechanismen der AD, so führt eine vermindernde Expression von SORL1 beispielsweise zu einer verstärkten A $\beta$ -Ablagerung in Mäusen (Andersen et al., 2005). Grundsätzlich bedarf es weiterer Studien, um den pathogenen Effekt auf den alzheimer'schen Phänotyp dieser Gene zu verstehen.

**Tab.2.7:** Aktuelle Suszeptibilitätsgene der sporadischen AD (Alzgene, 1996; Stand November 2014)

Gen	Protein	Möglicher Patho-/Mechanismus	Lokalisierung (Mutation/SNP)
<b>ABCA7</b>	<i>ATP-Binding Cassette, Sub-Family A, Member 7</i>	Cholesterinstoffwechsel, Immunsystem, APP-Prozessierung	Intron rs3764650
<b>APOE</b>	<i>Apolipoprotein E</i>	Cholesterin- und Lipidstoffwechsel, A $\beta$ -Aggregation, entzündliche Prozesse	Exon rs7412 rs429358
<b>ATXN1</b>	<i>Ataxin 1</i>	Amyloid $\beta$ pathway	Intron rs179944
<b>BIN1</b>	<i>Bridging integrator 1</i>	Amyloid $\beta$ pathway	Upstream rs744373 rs12989701
<b>CD33</b>	<i>Cluster of differentiation 33</i>	Amyloid $\beta$ pathway; Immunsystem	Upstream rs3865444
<b>CD2AP</b>	<i>CD2-Associated Protein</i>	Synaptische Dysfunktion, Aktin, Zytoskelett	Intron rs9349407
<b>CLU</b>	<i>Clusterin (Apolipoprotein J)</i>	Anti-apoptotisches Signal, Schutz vor oxidativem Stress, Aggregation und entzündlichen Prozessen → Überexpression in AD als neuroprotektive Antwort auf neuronale Schäden	Intron rs1136000
<b>CR1</b>	<i>Complement component (3b/4b) receptor 1</i>	Immunsystem, Amyloid $\beta$ pathway	Intron rs6656401
<b>EPHA1</b>	<i>Ephrin Type-A Receptor 1</i>	Immunsystem	Upstream rs11767557
<b>MS4A4E, MS4A6A</b>	<i>Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A</i>	Immunsystem	Downstream UTR 3' prime rs670139 rs610932
<b>PICALM</b>	<i>Phosphatidylinositol binding clathrin assembly molecule</i>	Fehlregulierung der Clathrin-abhängigen Endozytose → Fehlregulation von APP → Amyloidbildung; A $\beta$ -Transport und Abbau	Upstream rs3851179
<b>SORL1</b>	<i>Sortilin-Related receptor L (DLR class) A repeats containing</i>	Verminderte APOE-Rezeptor Expression → Fehlregulierung von APP	> 40 SNPs

UTR = untranslatierter Bereich

## 2.8 RNA-bindende Proteine

Das Funktionieren einer Zelle hängt von der korrekten Expression protein-kodierender und nicht-kodierender RNAs ab. Die richtige Prozessierung der RNA ist maßgeblich für eine funktional korrekt verlaufende Genexpression. In der Zelle tritt die RNA typischerweise als Ribonukleoproteinkomplex auf, bestehend aus einer oder mehreren RNAs und einer multiplen Anzahl an RNA-bindenden Proteinen. RNA-bindende Proteine (RBP), wie *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNP) oder auch *embryonic lethal abnormal vision-like* Proteine (ELAVL), übernehmen dabei nicht nur wichtige Aufgaben wie Transport und Lokalisierung der RNA, sondern sind insbesondere bei der posttranskriptionalen Prozessierung von großer Bedeutung: RBPs regulieren und kontrollieren u.a. Spleißvorgänge, die Polyadenylierung, die mRNA-Stabilisierung und den Translationsvorgang. In der Zelle muss das Zusammenspiel einer großen Vielfalt an RNAs und RBPs korrekt dirigiert werden. Mutationen, die auch nur einen dieser RNP-Komponenten betreffen, können zu fehlerhaften Verhalten des gesamten Komplexes führen (Lukong et al., 2008).

50% der bekannten Mutationen in RBPs führen zu schwerwiegenden Erkrankungen (Cooper et al., 2009; Licatalosi und Darnell, 2010). Klinisch handelt es sich dabei neben anderen Krankheitsbildern insbesondere um neurodegenerative Erkrankungen, da RBPs v.a. im Gehirn exprimiert werden und dort u.a. den alternativen Spleißprozess koordinieren. Spleißprozesse müssen gleichzeitig schnell und präzise ablaufen. Die Fehlerquellen sind mannigfaltig: Defekte sowohl in der RNA als auch in den RBPs, oder in den Faktoren, die für die Interaktion zwischen den beiden zuständig sind, können schwerwiegende Folgen nach sich ziehen. So können mutierte RBPs beispielsweise ihre eigentliche Funktion nicht mehr ausüben (*loss-of-function*) oder aber die RNAs entwickeln zusätzliche Eigenschaften (*gain-of-function*; wenn beispielsweise Mikrosatelliten in mRNA übersetzt werden) die zu einer fehlerhaften Verarbeitung durch die RNPs führen (Lukong et al., 2008).

Eine vergleichsweise kleine Auswahl bekannter Erkrankungen, die durch Beteiligung von RNA-verarbeitenden Elementen hervorgerufen werden, ist in Tabelle 2.8 aufgelistet.

**Tab.2.8:** RNA/RBP-assoziierte Erkrankungen (modifiziert nach Cooper et al., 2009; Licatalosi und Darnell, 2010)

Phänotyp	Mutiertes Gen	Funktion
Dyskeratosis congenita (autosomal-dominant oder X-linked)	TERC und TERT (autosomal-dominant) DKC1 (X-linked)	Telomerase-Aktivität Translation
Prader Willi Syndrom	SNORD116	Biogenese Ribosomen
Fragile X Syndrom	FMR1	Translation/mRNA Lokalisation
Spinale Muskelatrophie	SMN2	Spleißen
Muskeldystrophie Typ 1	DMPK ( <i>RNA gain of function</i> )	Proteinkinase
Muskeldystrophie Typ 2	ZNF9 ( <i>RNA gain of function</i> )	RNA-Bindung
Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)	TARDBP	Spleißen, Transkription
Huntington disease-like 2 (HDL2)	JPH3 ( <i>RNA gain of function</i> )	Ionenkanäle
Retinitis pigmentosa (RP)	PRPF31, PRPF8, HPRP3, PAP1	Spleißen
Spinozerebelläre Ataxie 8 (SCA8)	ATXN8/ATXN8OS ( <i>RNA gain of function</i> )	Translation/mRNA Lokalisation
Leukoencephalopathie	DARS2	Translation (Mitochondrien)
Okulopharyngeale Muskeldystrophie	PABPN1	3' Ende-Formation
Autismus	7q22-q33	Nicht-kodierende RNA
Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS)	H19	Nicht-kodierende RNA
Charcot-Marie-Tooth Disease (CMT)	GRS / YRS	Translation
MELAS-Syndrom	MTRNR1	Ribosomale Biogenese (Mitochondrien)
Frontotemporale Lobärdegeneration mit Parkinsonismus (FTDP-17)	MAPT	Spleißen
Neurofibromatose Typ 1 (NF1)	NF1	Spleißen

Die Verarbeitung der RNA ist ein kritisches Moment in der zellulären Maschinerie; RBPs sind in praktisch jedem Schritt der RNA-Verarbeitung involviert und koordinieren das komplizierte Zusammenspiel von RNA-Protein- und Protein-Protein-Interaktionen (Keene, 2007; Glisovic et al., 2008).

Dass alternatives Spleißen auch in Erkrankungen aus dem demenziellen Formenkreis eine Rolle spielt, ist insbesondere durch das MAPT-Gen offensichtlich: Mutationen in diesem Gen führen zu veränderten Spleißbedingungen und in der Folge zu FTLD (Coppola et al., 2012).

Ein einziges betroffenes RNA-bindendes Protein kann viele alternativ gespleißte Transkripte betreffen und in der Folge zu schwerwiegenden, phänotypisch erkennbaren Defiziten führen.

Insgesamt lässt sich die große Anzahl von RNA-bindenden Proteinen für eine breite Auswahl an Erkrankungen verantwortlich machen, die von Krebserkrankungen bis hin zum demenziellen Phänotypen reicht.

## 2.9 Spleißen

In der eukaryotischen Zelle entsteht bei der Genexpression als erstes Produkt des Transkriptionsprozesses die prä-mRNA bzw. die hnRNA (*heterogeneous nuclear ribonucleic acid*). Im Gegensatz zur prokaryotischen Zelle sind diese Primärtranskripte noch keine reifen mRNAs und müssen verschiedene prozessierende Ereignisse durchlaufen, bevor die reife RNA ihre Funktion ausüben kann. Die ungespleißte prä-mRNA ist das 1:1 Transkriptom der DNA und besteht aus Introns und Exons. Die nicht-codierenden Introns werden vor der Translation entfernt, damit funktionelle Proteine synthetisiert werden können.

Bei vermuteten 20.000 - 25.000 menschlichen Genen (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004; Lander et al., 2001) und etwa 100.000 verschiedenen menschlichen Proteinen, muss es Mechanismen geben, die die Proteinvielfalt gewährleisten. Durch alternatives Spleißen kann ein einziges Transkript alternativen Spleißwegen folgen und zu unterschiedlichen mRNAs prozessiert werden (Matlin et al., 2005; Smith und Valcárcel, 2000). Die unterschiedlichen mRNAs führen zur Synthese verschiedener Proteine und gewährleisten somit eine Proteomvielfalt, die die Anzahl der menschlichen Gene übertrifft. Inzwischen kann davon ausgegangen

werden, dass rund 95% der Gene alternativ gespleißt werden, mehr als bisher angenommen (Pan et al., 2008).

Durch die RNA-Polymerase II wird die DNA-Sequenzvorlage transkribiert. Die synthetisierten RNAs erhalten eine Cap-Struktur, d.h. am 5' Ende wird ein 7-Methylguanosin-Triphosphat angehängt. Diese Reaktion erhöht die Stabilität der RNA, verhindert deren Abbau, ermöglicht den Transport durch die Kernpore und unterstützt das Anheften an die Ribosomen. Neben dem *capping* kommt es am 3' Ende der RNA durch das Anhängen von Adenylresten zur sog. Polyadenylierung. Die genaue Funktion der Polyadenylierung ist noch nicht geklärt, vermutlich trägt sie zum Schutz vor Abbau durch Enzyme bei.

Nach oder bereits während des Transkriptionsvorganges und unabhängig von den anderen Prozessierungsschritten kommt es an der RNA zu Spleißvorgängen: Introns werden entfernt und angrenzende, sowie alternativ ausgewählte Exons, zusammengefügt. In chemischer Hinsicht handelt es sich beim Spleißen um eine doppelte Umesterung (Guthrie und Patterson, 1988), die an sich für die Zelle keine aufwändige Arbeit darstellt. Aufwändig und von großer Energieleistung gestaltet sich der Spleißvorgang allerdings aufgrund der beträchtlichen Entfernung von häufig bis zu mehreren Kilobasen zwischen den Exons, sowie der korrekten Erkennung der Spleißstelle. Kryptische Spleißstellen müssen vom Spleißapparat überlesen werden, Exons dürfen hingegen nicht ausgelassen werden.

Beim Spleißvorgang handelt es sich um eine zweischrittige Prozessierung: diese beginnt mit der Spaltung an der 5'-Intron-Exon-Spleißstelle und resultiert aus dem nukleophilen Angriff der 2'-Hydroxylgruppe des hoch konservierten Adenosinnukleotids auf die Phosphodiesterbindung der 5'-Spleißstelle. Durch den Angriff der Hydroxylgruppe kommt es zur Spaltung der Phosphodiesterbindung. Dies führt zur Bildung einer neuen 2'-5'-Phosphodiesterbindung, wodurch das erste Nukleotid des Introns mit dem Adenosin verknüpft wird. Durch diese Abspaltung bildet sich eine rückwärtsgerichtete Schleife, die sogenannte Lassostruktur (Lariat).

Ist dieser Schritt abgeschlossen, kommt es durch eine zweite Umesterung zur Abspaltung der 3'-Spleißstelle und zur Verknüpfung der beiden Exons. Die 3'-OH-Gruppe greift die Phosphodiesterbindung an der 3'-Spleißstelle an, spaltet diese ab und setzt damit das in Lassostruktur vorliegende Intron frei. Parallel dazu kommt es zur Zusammenführung vom 3'-Ende des im ersten Schritt abgespaltenen Exons mit

dem neuen 5'-Ende des zweiten Exons. Mit der Verknüpfung der beiden isolierten Exons ist der Spleißvorgang abgeschlossen.

### 2.9.1 Spleißosom

Die wichtigsten Komponenten des eukaryotischen Spleißapparates sind die snRNAs (U1, U2, U4, U5, U6), die gemeinsam mit Proteinen kleine, nukleäre Ribonukleoproteine (snRNPs) bilden (Will und Lührmann, 2001; Abbildung 2.4). snRNPs und weitere Proteine heften sich für das Entfernen eines Introns an das Transkript und setzen durch eine Reihe von energieaufwändigen Mechanismen den Spleißosom-Komplex zusammen. Bislang konnte die Spleißreaktion nicht vollständig verstanden werden, klar scheint jedoch, dass das Gefüge der snRNPs die beiden Spleißstellen und die Verzweigungsstelle des Introns in unmittelbare Nähe zueinander bringt: um die Spleißaktivität zu initiieren, bindet der *Commitment*-Komplex, bestehend aus U1-snRNP, an die 5'-Spleißstelle. Diese Bindung erleichtert einerseits dem Proteinfaktor U2 snRNP *auxiliary factor* (U2AF) die Erkennung der Polypyrimidinsequenz und der 3'-Spleißstelle, andererseits führt die Interaktion von U2AF und SF1 (Spleißfaktor 1) zur Erkennung des Verzweigungspunktes (*branch site*). Im Anschluss daran, bindet U2-snRNP an die 5'-Spleißstelle und bringt die 5'-Spleißstelle nah an die *branch site*. Aus diesem Präspleißosomkomplex (*commitment*-Komplex und U2-snRNP) bildet sich durch Anbindung des U4/U6-snRNP und des U5-snRNP der vollständige Spleißosom-Komplex. Durch weitere Wechselwirkungen wird die 3'-Schnittstelle zur 5'-Spleißstelle und der Verzweigungsstelle gebracht. Nun befinden sich die Spleißstellen, sowie die Verzweigungsstelle in unmittelbarer Nähe und die Umesterung, katalysiert durch U6-snRNP, kann beginnen.

Das Spleißosom wird auf dem zu prozessierendem Intron bei jedem Spleißvorgang aufs Neue gebildet (Reed und Palandjian, 1997).

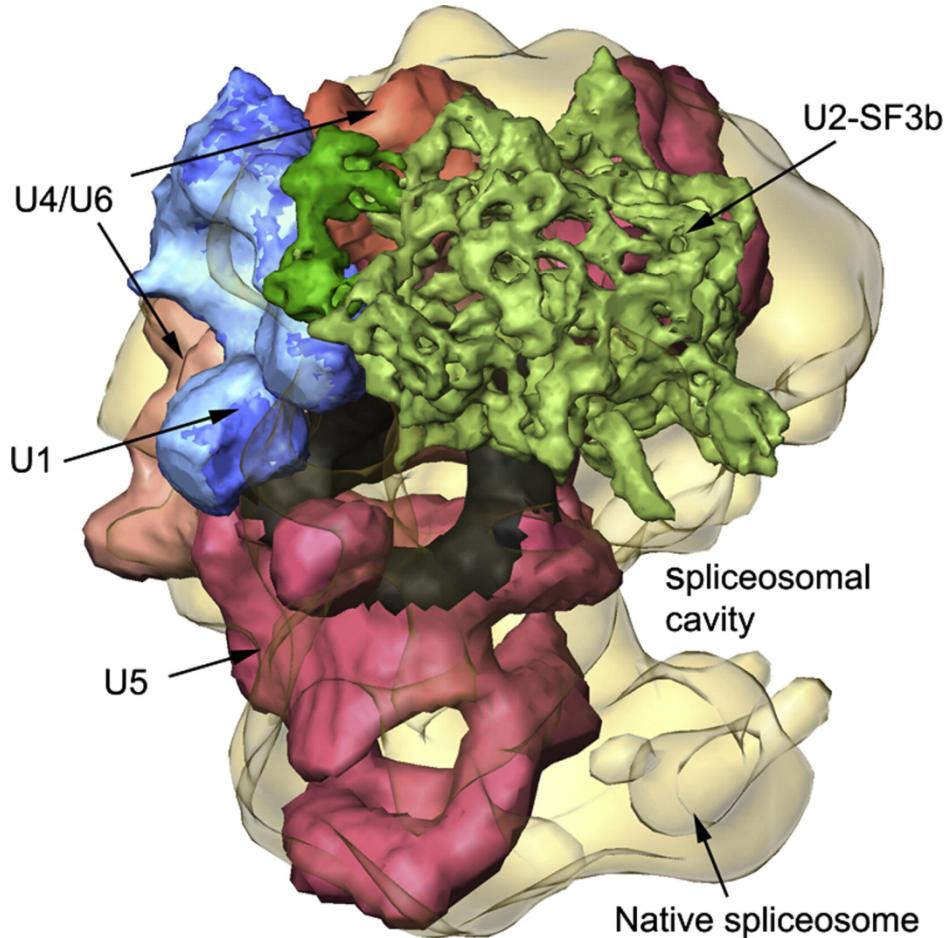


Abbildung 2.4: Der Spleißosom-Komplex (aus Frankenstein et al., 2012)

### 2.9.2 Exonerkennung

Die zuverlässige Erkennung der richtigen Spleißstellen, sodass beim Spleißen keine Exons verloren gehen oder umgekehrt keine kryptischen Spleißstellen verwendet werden, ist von fundamentaler Bedeutung für die Proteinsynthese und erfordert äußerste Präzision. Die Konsensussequenzen sind wenig konserviert und machen eine Erkennung der Exons aufgrund der DNA-Sequenzvorlage alleine unmöglich. Eine Reihe von Spleißfaktoren scheint für die Auswahl der korrekten Spleißstellen von größter Bedeutung zu sein: *cis-acting-elements*, *trans-acting-elements*, SR- und SR-ähnliche Proteine sowie hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*). SR-Proteine stellen als Teil des Spleißosoms im *commitment*-Komplex eine Verbindung zwischen dem U1-snRNP und den U2AF-Proteinen her; in dieser Phase des Spleißvorganges wird entschieden, welche Stellen verknüpft werden. SR-Proteine zeichnen sich durch einen sehr hohen Gehalt an repetitiven Serin-Arginin-

Dipeptide (SR-Motiv) im C-terminalen Ende, sowie durch eine oder mehrere RRMs (RNA-Erkennungsmotive) am N-terminalen Ende aus (Birney et al., 1993).

Serin-Arginin-Motivredundanz kommt nicht nur bei SR-Proteinen, sondern auch bei hnRNPs, snRNPs und weiteren, in den Spleißprozess involvierten Proteinen vor.

SR-Proteine interagieren mit purinreichen ESE (Exon-Spleiß-*Enhancern*), sowie mit ESS (Exon-Spleiß-*Silencern*). ESEs sind kurze Motivsequenzen von 5-8bp, die das Spleißen anregen bzw. im Falle von ESSs den Spleißvorgang unterbinden können.

## 2.10 HnRNPs

Das von der Polymerase II produzierte Transkript durchläuft eine Reihe von Prozessierungsschritten bevor es zur reifen mRNA wird. Jene Vorläufer-RNA wird unter dem Terminus hnRNA (*heterogeneous nuclear ribonucleic acids*) zusammengefasst, oft synonym mit prä-mRNA betitelt, wobei allerdings nicht alle hnRNAs tatsächlich als Vorläufer-mRNAs dienen (Dreyfuss et al., 1993). Nach der Synthesierung der hnRNA durch die Polymerase II und bis zu ihrer Reifung zur mRNA wird die hnRNA mit diversen Proteinen assoziiert, die ihre Prozessierung regeln. Diese hnRNA-bindenden Proteine, die nicht als stabile Komponenten anderer RNP-Komplexe (z.B. snRNPs) verstanden werden können, werden kollektiv unter dem Namen hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) zusammengefasst. Ursprünglich wurden die hnRNPs als chromatin-assoziierte RNA-bindende Proteine verstanden (Dreyfuss et al., 1993), die aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit Histonen insbesondere für die Verpackung der prä-RNA zuständig sind (Miller und Bakken, 1972). In den letzten 20 Jahren ist jedoch die Multifunktionalität der hnRNPs in der nuklealen, sowie in der translationalen RNA-Prozessierung augenscheinlich geworden: hnRNPs spielen eine wichtige Rolle in einer ganzen Reihe an fundamentalen nuklearen Ereignissen. Die Bindung und Interaktion der hnRNPs mit der RNA beeinflusst deren Struktur und damit letztendlich die Prozessierung und das Schicksal der prä-mRNA. HnRNPs tragen zur Stabilität, Lokalisation und Translation der RNA bei, sie sind unerlässlich für Biogenese, Funktion und Transport der mRNA. Ihr Aufgabenbereich reicht über die Translation bis hin zur Transkription (Dreyfuss et al., 2002).

Rund 5-8% des eukaryotischen Genoms (Stand 2008) codieren für RBPs, tatsächlich wird davon ausgegangen, dass es noch mehr sein werden, da nicht alle RNA-interagierenden Proteine als identifiziert gelten (Glisovic et al., 2008).

Die relativ hohe Anzahl an RBP-Genen kann als Beweis dafür gewertet werden, dass es in eukaryotischen Zellen im Rahmen der Proteinbiosynthese zu einer komplexen und aufwändigen post-transkriptionellen Prozessierung mit einer Vielzahl an beteiligten Proteinen kommt. Die phylogenetische Notwendigkeit einer hohen Diversität an Proteinen durch alternatives Spleißen zu synthetisieren, führte konsequenterweise zu einem steigendem Bedarf an RBPs (Anantharaman et al., 2002).

### **2.10.1 Struktur und Einteilung der hnRNPs**

HnRNPs übernehmen vielschichtige zelluläre Aufgaben und werden nach ihren bislang bekannten RNA-spezifischen Aufgaben und ihrer molekularen Masse in unterschiedliche Kategorien eingeteilt. Die verschiedenen hnRNPs unterscheiden sich in ihrer Struktur, ihrem Vorkommen, sowie in ihren RNA-interagierenden Eigenschaften. Die Gruppe der hnRNPs besteht aus 20 häufiger vorkommenden „Haupt“-hnRNPs (*major hnRNPs*) und einigen seltener vorkommenden Mitgliedern (*minor hnRNPs*). Die 20 *major hnRNPs* reichen in ihrer Größe von 34 kDa bis 120 kDa und werden nach dem Alphabet von A1 bis U bezeichnet (Tabelle 2.9).

Isolierte hnRNPs weisen eine ähnliche Protein-Komposition, wenngleich eine unterschiedliche Stöchiometrie, auf (Dreyfuss et al., 2002). Einer neueren Studie zufolge zeigen einige als hnRNPs klassifizierte RBPs in der Analyse ihrer Vollängensequenz und ihrer konservierten Domänen eine höhere Affinität zu SR, ELAVL-ähnlichen und *CUG-BP and ETR-3 like factor* (CELF) Proteinen (Tang et al., 2012) – das gängige Klassifizierungssystem kann demnach verwirrend erscheinen, da die gruppierten Proteine zueinander weniger ähnlich erscheinen als gruppenübergreifend.

HnRNPs kommen *in vitro* in einem regelmäßigen Muster von 20-25 nm großen Partikeln an der prä-mRNA vor, tatsächlich gibt es allerdings keinen Hinweis auf eine sich wiederholende strukturelle Einheit des hnRNP-Komplexes an der prä-mRNA *in vivo*. Vielmehr handelt es sich bei den hnRNPs um höchst dynamische Einheiten, die je nach Vorkommen und aktueller RNA-Sequenz an jeder mRNA eine individuell

kombinatorische Einheit bilden (van Oordt et al., 2006; Mandal et al., 2001; Habelhah et al., 2001).

hnRNPs gehören neben den Histonen zu den häufigsten nukleären Proteinen. An die mRNA gebunden bilden sie einen essentiellen Teil des Nukleus und kommen z.T. in ~100 Millionen Kopien pro Nukleus (z.B. A1) vor (Kamma et al., 1995; Dreyfuss et al., 2002). Weniger essentielle hnRNPs kommen in geringerem Maße vor, wobei insgesamt ein Überangebot an hnRNPs im Verhältnis zur jeweiligen Bindungsdomäne besteht.

HnRNPs werden ubiquitär exprimiert, wobei Vorkommen und Stöchiometrie nicht nach Zelltyp eingeteilt werden können: bei den hnRNPs handelt es sich um eine heterogene Proteinfamilie mit variierendem strukturellen Eigenschaften (Kamma et al., 1995).

Insgesamt ist das Verständnis von der Funktionalität und Struktur der einzelnen hnRNPs gegenwärtig noch relativ gering.

**Tab. 2.9:** Übersicht hnRNPs (modifiziert nach Dreyfuss et al., 2002; Chaudhury et al., 2010)

Proteine	Domain-Struktur	Beliebteste Bindungssequenz	kDa	Shuttling	Vermutete Funktion
A1	2X RBD, RGG	UAGGG (A/U)	34	+	Spleißen, Export, Biogenese Telomere
<b>A2/B1</b>	2X RBD, RGG	(UUAGGG)	36/38	+	Spleißen, Lokalisation
C1/C2	1X RBD	U6	41/43	-	Spleißen, Stabilität
D(AUF1)	2X RBD, RGG	AU rich	44-48	+	Biogenese Telomere, Stabilität, Rekombination
E1/E2(αCP1,2 oder PCBP1,2)	3X KH	C rich	38,39	+	Stabilität, translationale Kontrolle
F	3X RBD	GGGA	53	unbekannt	Spleißen
G	1X RBD, RGG	CC(A/C)	43	-	Spleißen
H/H'(DSEF-1)	3X RBD	GGGA	56	unbekannt	Spleißen, Polyadenylation
I (PTB)	4X RBD	UCUUC	59	+	Spleißen, Lokalisation, Polyadenylation

Proteine	Domain-Struktur	Beliebteste Bindungssequenz	kDa	Shuttling	Vermutete Funktion
K/J	3X KH,RGG	C rich	62	+	Transkription, translationale Regulierung, Stabilität
L	4X RBD	CA repeat	68	unbekannt	Export, Stabilität, Riboswitch
M	4X RBD	G or U rich	68	+	Spleißen
P2 (FUS/TLS)	RBD	GGUG	72	+	Verhindert Bindung an poly(A), Autoantibody target
Q1NSAP	3X RBD, RGG	GAIT element	55-70	+	Spleißen, Translation
R1/R2	RBD	unbekannt	82	+	Retinal development
U	RGG	unbekannt	120	-	Nukleare Retention

Alternative Namen in Klammern; RBD = RNA-Bindungsdomäne; RGG = arginin/glycine-rich box, KH = K Homologie Domäne, GAIT = *interferon-γ-activated inhibitor of translation*; kDa geschätzt mittels Gel-Elektrophorese

## 2.10.2 RNA-Bindungsdomänen

Die Entdeckung von HnRNPs und weiteren RNA-bindenden Proteinen führte in der Folge zur Identifizierung der ersten Aminosäure-Strukturen, die eine Bindung an die RNA erlauben und die Protein-Protein-Interaktion regulieren. Die verschiedenen hnRNPs zeigen eine unterschiedlich hohe Präferenz für bestimmte Bindungssequenzen (Tabelle 2.3.0), wobei sie allerdings auch an andere, weniger affine RNA-Sequenzen binden können. HnRNPs besitzen eine oder mehrere RNA-Bindungsdömanen. Die verbreitetesten darunter sind bei den hnRNPs die RBD (*RNA-binding domain* oder auch *RNA recognition motif (RRM)*) (Bandziulis et al., 1989; Query et al., 1989), die K-Homologie (KH, Typ I, II) Domäne (Burd und Dreyfuss, 1994) und die RGG (Arg-Gly-Gly) Box (Kiledjian und Dreyfuss, 1992) (Tabelle 2.3.0). Die hoch konservierten, 90 aminosäurelangen RRM's kommen bei den hnRNPs am häufigsten vor und sind auch in anderen Proteinfamilien vertreten. HnRNP A/B Proteine sind strukturell ähnlich aufgebaut: beide verfügen über zwei RBDs an ihren N-Terminus und über eine Glycin-reiche RGG-Box an ihren C-Terminus (Matunis et al., 1992). Bei PCBP2 hingegen lässt sich eine KH-Domäne finden (Siomi et al., 1993; Kiledjian et al., 1995; Leffers et al., 1995).

### **2.10.3 Shuttling**

Obwohl hnRNPs vorwiegend im Nukleus lokalisierbar sind, kommen sie nicht nur ausschließlich dort vor. Vielmehr pendeln sie zwischen Nukleus und Zytoplasma, ein Indiz dafür, dass sie nicht nur für die Verpackung der RNA zuständig sind, sondern auch eine maßgebliche Rolle im nuklear-zytoplasmatischen Austausch und im mRNA-Export innehaben (Piñol-Roma und Dreyfuss, 1992). An Exons gebundene hnRNPs werden mit der mRNA in das Zytoplasma transportiert, während beispielsweise Poly(A)-Bindepoteine (PABP) vorwiegend im Nukleus vorzufinden sind. Im Zytoplasma vorkommende hnRNPs kann eine funktionale Aktivität zugeschrieben werden, da sie in den Polysomen an der zu translatierenden mRNA lokalisierbar sind und damit während der Translation offensichtlich von Bedeutung sind (Visa et al., 1996). Andere Spleißfaktoren wie die SR-Proteine weisen ebenso wie die hnRNPs eine nuklear-zytoplasmatische Wanderaktivität auf – hier zeigt sich wieder, dass das alte Klassifizierungssystem teilweise schwer zu erhalten ist: viele unterschiedlich klassifizierte RNA-bindende Proteine haben mehr Gemeinsamkeiten in Struktur, Verteilung und Aufgabengebiet als Unterschiede. Obig genanntes PABP beispielsweise enthält wie die Gruppe der hnRNPs vorwiegend RBDs und pendelt gleichermaßen zwischen Nukleus und Zytoplasma (Kedersha et al., 2000).

### **2.10.4 HNRNPA2B1**

Das HNRNPA2B1-Gen (auch RNPA2, HNRPA2, HNRPB1, SNRPB1, HNRNPA2, HNRNPB1, IBMPFD2, HNRPA2B1) gehört zu der A/B-Unterfamilie der ubiquitär exprimierten hnRNPs und liegt auf Chromosom 7p15. Das exprimierte Protein hnRNPA2/B1 ist zwischen 36-38 kDa groß und sowohl intranukleär als auch im Zytoplasma zu finden. Es übernimmt als RBP insbesondere Aufgaben im Bereich RNA-Spleißing und RNA-Lokalisation. Es verfügt über zwei unterschiedliche Bindungsdomänen, eine RBD und eine RGG – Box (Tabelle 2.9).

Durch alternatives Spleißen werden Transkripte des HNRNPA2B1-Gens produziert, die zwei homologe hnRNPs kodieren: hnRNPA2 und hnRNPB1. HnRNPA2/B1 wird neben anderen Funktionen eine spleißhemmende Wirkung zugeschrieben: hnRNPA2/B1 bindet mit unterschiedlich hoher Bindungspräferenz an die RNA und verhindert durch Stabilisierung deren Zerkleinerung (Liang et al., 2011).

Weiterhin bedingen und regulieren hnRNPA2/B1 alternative Spleißvorgänge, indem sie als Gegenspieler anderer Spleißfaktoren (v.a. ASF/SF2 → *alternative splicing factor* bzw. *serine/arginine-rich*) auftreten und bestimmte Exons überspringen bzw. inkludieren können (Expert-Benzançon et al., 2004; Chen et al., 2009; Mayeda et al., 1993). Dabei hängt das selektive Auslassen bestimmter Exons durch hnRNPA2 /B1 insbesondere von der Exongröße bzw. vom Polypyrimidin-Trakt des vorhergehenden Introns ab (Mayeda et al., 1993).

Neben Spleißprozessen wird vermutet, dass hnRNPA2 im Differenzierungsprozess von Oligodendriten (Maggipinto et al., 2004), in der Erhaltung der Telomer-Struktur, und im Prozess der DNA-Duplikation, Transkription und Rekombination eine Rolle spielt (Moran-Jones et al., 2005). HnRNPB1 hingegen scheint die Aktivität der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) zu unterdrücken und wirkt somit positiv unterstützend auf die Stabilität des Genoms, zudem scheint es in der Regulierung des Zellzyklus und der apoptotischen Programme involviert (Han et al., 2008).

Missregulierung von hnRNPA2/B1 wird an einer Reihe von Krankheiten, insbesondere Krebserkrankungen, beobachtet: v.a. Lungenkrebs, Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom (Fujiwara et al., 2004; Tockman et al., 1997; Zhou et al., 2001) weisen ein Überexpression dieses Proteins auf. Trotz anfänglich unterstützender Studienlage hnRNPA2/B1 als diagnostische und prognostische Marker dabei einzusetzen, konnten in weiterführenden Studien diese Ergebnisse nicht repliziert werden (Satoh et al., 2000; Zech et al., 2006).

In aktuellen Studien häufen sich Befunde, die auf einen Zusammenhang zwischen HNRNPA2B1 und neurodegenerativen Erkrankungen hindeuten: Die wiederholte Expansion einer vor kurzem identifizierten Hexanukleotid-Sequenz ist die Ursache für die Chromosom 9p-gekoppelte FTLD; an diese Sequenz bindet hnRNPA/B (DeJesus-Hernandez et al, 2011; Renton et al., 2011).

Zudem verfügen hnRNPA2/B1 je über eine C-terminale, Glycin-reiche Domäne, die nach Alberti et al. als eine Prion-ähnliche-Domäne (*prion-like domains*, PrLD) charakterisiert werden kann (Alberti et al., 2009). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass pathogene Mutationen in den PrLD von HNRNPA2B1 die phänotypische Ausprägung der ALS und der Multi-System Proteinopathie (MSP) bedingen (Kim et al., 2013). Insbesondere konnte gezeigt werden, dass die natürlich vorhandene Tendenz von hnRNPA2 fibrilläre Verbände zu bilden, durch diese Mutationen signifikant verstärkt wird (Kim et al., 2013): mutierte hnRNPA2/B1-Hexapeptide

lagern sich vermehrt zu amyloidogenen Fibrillen zusammen, und initiieren durch diese unregulierte Polyreaktionen vermutlich eine pathogene Kaskade, die zur Ausprägung von Proteinopathien führt (Kim et al., 2013). In einer weiteren Studie konnten hingegen keine Mutationen im HNRNPA2B1 Gen eines holländischen bzw. französischen Kollektivs mit ALS und FTLD identifiziert werden (Seelen et al., 2014; Le Ber et al., 2014).

Bezüglich der Alzheimer Demenz deuten immunhistochemische Untersuchungen zur hnRNP A2/B1 Expression auf post-transkriptionale Störungen in hippocampalen Neuronen bei AD-Patienten hin (Mizukami et al., 2005). Am Mausmodell führte Neurotoxin induziertes Absterben der cholinergen Neurone zu einem AD-ähnlichem Rückgang von hnRNPA/B und in der Folge zu veränderten Spleißbedingungen (Berson et al., 2012). Die Gruppe um Berson konnte weiterhin im entorinalem Cortex der untersuchten Mäuse den selektiven Verlust von hnRNPA/B Spleißfaktoren feststellen. Der globale hnRNPA/B-*knockdown* in besagten Bereichen führte bei den Mäusen zu Dendritenschwund und Gedächtnisschwierigkeiten.

Diese Befunde lassen insgesamt vermuten, dass cholinerg bedingter hnRNPA/B Verlust und der in der Folge gestörte RNA-Metabolismus wichtige, in die AD-Entstehung involvierte Mechanismen sind. Interessanterweise zeigten transgene Mäuse mit Tau- oder APP-Mutationen keine hnRNPA/B Veränderungen: der Verlust von hnRNPA/B in AD scheint also nicht durch Amyloid und Tau bedingt zu sein.

Eine weitere Studie, die *postmortem* an AD-Patienten durchgeführt wurde zeigte auf, dass selbst im fortgeschrittenen AD-Stadium die überlebenden Neurone im inferioren temporalen Cortex eine ausgeprägte Immunoreaktivität für hnRNPB1 aufweisen, und hnRNPB1 möglicherweise eine protektive Rolle vor AD-induziertem Absterben in neuronalem Gewebe innehat (Ishikawa et al., 2004).

Den bislang erhobenen Befunden nach zu urteilen, scheint eine verminderte Expression von hnRNPA/B zu neuronalen Schäden zu führen, die den sporadischen AD-Phänotyp möglicherweise mitbedingen.

Eine an Alzheimer- und FTLD-Patienten durchgeföhrte genomweite Assoziationsstudie, konnte keine Assoziation zwischen der Alzheimer Demenz und dem HNRNPA1-Gen feststellen; der Genotyp C/C für rs7967622 konnte allerdings als Risikofaktor in der männlichen Patientenpopulation für FTLD identifiziert werden (Villa et al., 2011).

## 2.10.5 HNRNPH3

Vergleichsweise wenig ist von der H-Familie der hnRNPs bekannt. Sicher ist, dass diese wichtige Spleißentscheidungen mittragen und -bedingen, deren Komplexität und Arbitrarität bislang nur sehr unzureichend verstanden werden: hnRNPH zeigt je nach Bindungskontext entweder eine *enhancing* oder *silencing*-Aktivität (Black, 2003) und bedingt den temperaturinvolvierten Spleißarrest mit, indem es den hnRNP-Komplex vorübergehend verlässt (NCBI, 2012). Das ubiquitär exprimierte hnRNPH3 ist verglichen mit seinen Familienmitgliedern ein kleineres Protein, von dem bislang zwei identifizierte alternativ gespleißte Isoformen existieren (Mauger et al., 2008). Das Protein hnRNPH3 verfügt über zwei quasi-RRM-Bindungsdomänen und ist in den NBs (*nuclear bodies* = PML bodies) des Nukleus lokalisierbar.

Das für hnRNPH3 codierende Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 10 (10q22). Die gegenwärtige Studienlage gibt keinen Hinweis auf eine mögliche Assoziation von HNRNPH3 und Alzheimer oder anderen demenziellen Erkrankungen.

## 2.10.6 PCBP2

Das multifunktionale PCBP2-Protein ist gemeinsam mit den restlichen PCBP-Familienmitgliedern 1-4 und hnRNPK eines der wichtigsten Poly(rC)-bindendes-Protein, das durch seine spezifische Bindung an C-Motive eine wichtige Rolle in der posttranskriptionalen und translationalen Regulierung der Zelle einnimmt (Leffers et al., 1995). Das Gen PCBP2 befindet sich auf Chromosom 12q13.13, das generierte Protein wird u.a. in neuronalem Gewebe der Cortex exprimiert (GeneCards, 1996).

PCBPs verfügen über drei KH-Bindungsdomänen: zwei liegen nahe des N-terminalen Endes, eine Dritte ist am C-Terminus zu finden (Makeyey und Liebhaber, 2002).

PCBP2 ist neben seiner Spleißaktivität insbesondere für seine Interaktion mit MAVS (*mitochondrial antiviral signaling protein*, auch *virus-induced signaling adapter* (VISA)) bekannt. MAVS sind Proteine, die unablässlich für die Aktivierung von intermediären Transkriptionsfaktoren (RIG-I-like Helikase) in der komplexen Signalkaskade der antiviralen Immunantwort sind, und die Aktivierung von diversen Proteinkinasen einleiten. Die Regulierung der MAVS ist essentiell, um eine exzessive

und schädliche Immunantwort zu verhindern. PCBP2 wurde als negativer Regulationsfaktor im MAVS-Signalweg identifiziert (You et al., 2009). Überexpression von PCBP2 führte zur Aufhebung der zellulären Antwort bei einer viralen Infektion, während PCBP2-*knockdown* den gegenteiligen Effekt zur Folge hatte (You et al., 2009). PCBP2 scheint für das *fine tuning* in der zellulären Immunantwort eine Rolle zu spielen, wenngleich weiterführende Studien zu diesem Zeitpunkt noch fehlen.

Neben einer Interaktion mit der zellulären Immunantwort, wird PCBP2 auch mit SG (*stress granules*) in Verbindung gebracht. SGs sind aggregierte RNA- und Proteinkörnchen, die sowohl im Zytosol als auch im Nukleus vorkommen können und sich bilden, wenn die Zelle unter Stress steht. Diese Akkumulierung geschieht vermutlich, um die RNAs zu schützen, und Interaktionen mit schädlichen Chemikalien zu erschweren (Nover et al., 1989). PCBP2 interagiert offensichtlich mit den SGs und pendelt bei Stress zwischen Nukleus und Zytosol: ist die Zelle Stressfaktoren wie etwa Hitze oder Arsensäure ausgesetzt, wird PCBP2 vermehrt bei SGs lokalisiert und trägt möglicherweise zur stressinduzierten zellulären Veränderung bei (Fujimura et al., 2008). Weiterhin konnte die Überexpression von PCBP2 mit vermehrtem Gliomwachstum in Verbindung gebracht werden (Han et al., 2013).

Insgesamt ist der Aufgabenbereich von PCBP2 insbesondere dem immunologischen Gebiet und der mRNA-Prozessierung zuzuordnen. Zu den Krankheiten, die bislang mit PCBP2 assoziiert worden sind, zählen Hepatitis A (Graff et al., 1998) und die Myotone Dystrophie Typ 2 (Gerbasi et al., 2007). Einen Link von PCBP2 zu Alzheimer bzw. anderen Erkrankungen aus dem demenziellen Formenkreis oder kognitiven Beeinträchtigungen gibt es bislang keinen.

## 2.11 ELAVL4

Ein weiteres RNA-bindendes Protein, (RBP, *RNA-binding protein*) das allerdings nicht zu den hnRNPs zählt, ist das ELAV (*Embryonic Lethal Abnormal Vision, Drosophila*) *Like Neuron-Specific RNA Binding Protein* 4, auch HuD (*Hu antigen D*) genannt.

Das Gen, das dieses Protein codiert, befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p34). ELAVL4 wird insbesondere in neuronalem Gewebe exprimiert (GeneCards, 1996).

RBPs binden an die RNA und steigern oder hemmen deren Regulierung. ELAVL4 wird ausschließlich in Neuronen exprimiert und bindet vorwiegend an AU-reiche (*Adenylate-Uridylate-rich Elements* → ARE) Sequenzen in den 3' untranslatierten Bereichen (3'-UTR → *three prime untranslated region*) der mRNAs (Levine et al., 1993; Nabors et al., 2001). Die 3'-UTR schließt an eine codierende Region der mRNA an und kann verschiedene regulatorische Sequenzen beinhalten (Mazumder et al., 2002). Neben alternativen Spleißen stellt die 3' UTR Regulierung einen wichtigen Teil der post-transkriptionalen RNA-Prozessierung dar. Dies lässt vermuten, dass ELAVL4 als Regulator diverser Prozesse in der mRNA-Prozessierung fungiert. Alle Mitglieder der ELAV-Familie verfügen über drei hochkonservierte RNA  (RRMs).

Menschliche ELAV-Proteine werden vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert, wo sie gemeinsam mit mRNAs, Mikrotubuli und mRNP den α-Komplex bilden, der sich in Folge mit den Polysomen zu einem dichten Translationskomplex (β-Komplex) zusammenschließt (Antic und Keene, 1997). Dabei übernimmt ELAVL4 eine essentielle Rolle in der Entwicklung und Erhaltung neuronaler Zellen durch die Regulierung der Genexpression auf spatiotemporaler Ebene (Antic und Keene, 1997; Perrone-Bizzozero und Bolognani, 2002; Yao et al., 1993; Schramm et al., 1999).

Hinreichend nachgewiesen wurde weiterhin bislang, dass ELAVL4 Proteine das alternative Spleißen von prä-mRNAs beeinflussen (Hinman und Lou, 2008; Lebedeva et al., 2011; Mukherjee et al., 2011). Nicht abschließend geklärt ist, welche spezifischen RNAs von ELAVL4 reguliert werden.

Im Tiermodell ließ sich nachweisen, dass Hu-Proteine in allen Stadien der neuralen Differenzierung exprimiert werden (am Huhn: Wakamatsu und Weston, 1997; an Maus und Ratte: Okano und Darnell, 1997). In einigen reifen Neuronen besteht ein hohes Level an Hu-Proteinen: insbesondere in Neuronen des Hippokampus und des Cortex werden Hu-Proteine exprimiert (Okano et al., 1997). Welche Funktion die ELAV/Hu-Proteine in der neuronalen Plastizität spielen ist bislang nicht ausreichend geklärt ist, sicher scheint aber, dass sie eine spielen: Bei Mäusen und Ratten, die Aufgaben zum räumlichen Lernen zu bewältigen hatten, wurde eine erhöhte ELAV/Hu-Proteinexpression im Zytoplasma von hippocampalen Pyramidenzellen festgestellt (Quattrone et al., 2001). Die Hochregulierung von ELAV-*like* Proteinen war ausschließlich lernspezifisch und fand nur bei den „lernenden“ Mäusen statt.

Befunde dieser Plastizität fungieren Art lassen vermuten dass ELAVL-Proteine lerninduzierte postranskriptionale Veränderungen in bestimmten Neuronen verantworten, und als wichtige Regulatoren während neuronaler Entwicklungsvorgänge und zeitlebens in Prozessen der synaptischen (Bolognani et al., 2007).

HuD-Proteine sind nicht nur für Gedächtnisvorgänge, sondern auch für axonale Wiederherstellungsprozesse und neuronaler Regenerierung mitverantwortlich (Anderson et al., 2005; Akten et al., 2011).

Erstmals identifiziert wurden Hu-Proteine als Autoantikörper in Patienten mit paraneoplastischer Encephalomyelitis (Dalmau et al., 1990). Inzwischen werden sie mit einer ganzen Reihe an Erkrankungen in Verbindung gebracht: neben Krebserkrankungen (v.a. kleinzelliger Lungenkrebs) und Tumoren, scheinen sie auch mit neurologischen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden zu können. In zwei Studien konnte ELAVL4 mit Parkinson, einer Erkrankung aus dem demenziellen Formenkreis, assoziiert werden (Noureddine et al., 2005; DeStefano et al., 2008).

Hinsichtlich der AD konnten in den letzten Jahren Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von ELAV-like Proteinen in der Entstehung und Entwicklung der Erkrankung gefunden werden (Pascale und Govoni, 2012): Naj et al. konnten in einer genomweiten Assoziationsstudie einen Polymorphismus auf ELAVL4 (rs11583200) mit LOAD-Fällen, die zusätzlich an einer Depression litten, assoziieren (Naj et al., 2009). Das dabei untersuchte Patientenkollektiv umfasst 399 LOAD-Fälle und 356 Kontrollprobanden. Eine Replikation dieser Studie liegt bislang nicht vor.

Ein SNP (rs10838725) auf dem CELF1-Gen (CUGBP, *Elav-like family member 1*) konnte des Weiteren sowohl mit der AD, als auch mit Übergewicht assoziiert werden (Hinney et al., 2014). In einer weiteren Studie konnte CELF1 am Modellorganismus Drosophila insbesondere mit Tau-bedingter neuronaler Dysfunktion im Rahmen der AD in Verbindung gebracht werden (Shulman et al., 2014). Zudem wurde ein Zusammenhang zwischen neuronalem ELAVL (nELAVL) und der AD beschrieben: A $\beta$ (1-42) scheint die Bindung von nELAVL an die ADAM10 (*a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*) mRNA zu erschweren, was eine erniedrigte ADAM10-Aktivität und demnach veränderte APP Prozessierungsbedingungen zur Folge hat (Amadio et al., 2009).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass ELAVL-Proteine durch ihr regulatorisches Eingreifen in die Genexpression einen tiefgreifenden biologischen Effekt auf den

Phänotyp haben können, und auch ganz besonders auf die synaptische Plastizität und infolgedessen auf Lernvorgänge ihren Einfluss nehmen.

### 3 Fragestellung

Bislang ist es allein für einen kleinen Prozentsatz der weniger häufig auftretenden EOAD gelungen, autosomal-dominante Mutationen zu identifizieren und somit der Erkrankung einen ätiologischen Hintergrund zuzuweisen. Den monogenen Alzheimererkrankungen stehen all jene EOAD- und LOAD-Fälle gegenüber, die nicht auf die Variation eines einzelnen Gens zurückzuführen sind. Für diesen zahlenmäßig überwiegenden Teil der Alzheimer Demenzen ist die genaue Pathogenese nach wie vor unklar. Klar ist bislang einzig, dass es sich bei der AD um eine komplexe multifaktorielle Erkrankung handelt, bei der genetische Varianten an mehreren Loci zusammen mit anderen Umweltfaktoren den Krankheitsausbruch bedingen. Erst durch die additive Genwirkung verschiedener Suszeptibilitätsgene bzw. durch die Beeinflussung der Gene untereinander, kommt es zur Ausprägung des komplexen alzheimer'schen Phänotyps. Dies resultiert zum einen in moderaten oder schwachen Penetranzen der Risikoloci, zum anderen in einer großen Diversität in der phänotypischen Ausprägung.

Bei komplexen und heterogenen Erkrankungen wie der Alzheimer Demenz, bieten sich Assoziationsstudien mit einem ausreichend großen Stichprobenumfang an, um Gene oder Marker mit geringem Effekt zu identifizieren.

Grundsätzliches Ziel dieser Arbeit war vordergründig mögliche Zusammenhänge zwischen ausgewählten SNPs der vier Gene HNRNPA2B1, HNRNPH3, ELAVL4 und PCBP2 und der Alzheimer Erkrankung festzustellen. Bei den vier untersuchten Genen handelt es sich um RBPs (*RNA-binding proteins*), die neben Spleißprozessen eine Reihe weiterer, fundamentaler Prozesse an der RNA katalysieren. Dass veränderte RNA-Prozessierung zu einer Reihe von Erkrankungen führen, gilt als gesichert. Der Zusammenhang zwischen RBPs und demenziellen Erkrankungen findet gegenwärtig, unterstützt durch neuere Befundlage (insbesondere bezüglich der FTLD), erstmals wissenschaftliche Aufmerksamkeit.

Um mögliche Zusammenhänge zwischen den ausgesuchten Polymorphismen und Haplotypen der Gene festzustellen, wurden die Allel-, Genotyp- und Haplotypfrequenzen zwischen 323 Alzheimerpatienten (87 EOAD und 236 LOAD) und 677 gesunden Kontrollprobanden bestimmt, verglichen und statistisch ausgewertet.

Unter der Annahme, dass bei polygenen Erkrankungen mehrere Genorte additiv zusammenwirken, die jeweils einen geringen Suszeptibilitätseffekt auf den komplexen und vielschichtigen Phänotyp haben, wurden die Polymorphismen in einem zweiten Schritt auf eine mögliche Assoziation mit unterschiedlichen, alzheimertypischen kognitiven Defiziten untersucht. Ziel war dabei insbesondere zu analysieren, ob bestimmte Polymorphismen bzw. Haplotypen mit Beeinträchtigungen in unterschiedlichen kognitiven Domänen einhergehen. Untersucht wurden dabei insbesondere das Neu- und Arbeitsgedächtnis, die Wortfindungsfähigkeit, die visuelle Wahrnehmung und die Diskriminationsfähigkeit.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Studienmodalitäten**

Die vorliegende Fall-Kontroll-Assoziationsstudie wurde an insgesamt 1000 Studienteilnehmer an der Ludwig-Maximilians Universität München durchgeführt. Ziel dieser Arbeit war die Assoziation ausgesuchter Marker mit der Alzheimer Demenz bzw. mit spezifischen, relevanten kognitiven Endophänotypen.

Dazu wurden 19 SNPs auf vier verschiedenen Genen (ELAVL4, HNRNPA2B1, HNRNPH3 und PCBP2) im Patienten- sowie im Kontrollkollektiv genotypisiert und bezüglich ihrer Unterschiede in Genotyp-, Allel- und Haplotypfrequenzen untersucht. In einem zweiten Schritt wurden die Marker auf eine mögliche Assoziation mit diversen kognitiven Domänen analysiert. Die dabei verwendeten neuropsychologischen Tests setzen sich aus Untertests der CERAD-Batterie (*Consortium to Establish a Registry for Alzheimers' Disease*) (Morris et al., 1989) und dem MMSE (*Mini Mental State Examination*) (Folstein et al., 1975) zusammen. Neben den standardisierten Tests wurde eine detaillierte Anamnese erhoben.

Die klinischen Interviews und die neuropsychologischen Testungen der Patienten, sowie die Interpretation und Analyse der Daten, ebenso wie deren Aufarbeitung im Hinblick auf ihre wissenschaftliche Relevanz wurden von der Doktorandin im Rahmen ihrer Arbeit an der LMU durchgeführt.

### **4.2 Vorbedingungen**

Die Durchführung der Studie erfolgte nach Zustimmung der lokalen Ethikkommission an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) auf freiwilliger Basis. Bei den Teilnehmern dieser Studie handelt es sich um gesunde Kontrollprobanden und um an der Alzheimer Demenz erkrankte Personen.

Alle Probanden wurden *a priori* in einem Gespräch über Ziel, Umfang und Modalitäten der Studie unterrichtet. Bei entmündigten Alzheimer-Patienten entschieden die rechtlichen Betreuer im Sinne des Patienten und nach Berücksichtigung deren Wünsche über die Teilnahme an der Studie. Die Durchführung der Tests erfolgte ausschließlich analog nach den standardisierten Normen und von geschultem Personal.

Sensorische Einschränkungen der Probanden wurden vor Testdurchführung abgeklärt und mit unterstützenden Maßnahmen (Hörgerät, Brille, lautes Sprechen etc.) behoben, um ein Verfälschen der Ergebnisse zu reduzieren.

Die Verarbeitung und Analyse der Daten aller Teilnehmer erfolgte ausschließlich in anonymisierter Form.

#### **4.2.1 Alzheimer-Patienten**

Alle Alzheimer-Patienten wurden für diese Studie an der LMU rekrutiert. Die Diagnosestellung erfolgte nach den aktuellen NINCDS-ADRDA-Kriterien, in die Studie eingeschlossen wurden 288 Patienten mit "wahrscheinlicher" AD, sowie 35 Patienten mit einem begründetem Verdacht auf eine AD. Die Patienten wurden ausschließlich dann in die Studie eingeschlossen, wenn keine maßgeblichen vaskulären Veränderungen vorlagen, die die kognitiven Beeinträchtigungen erklären bzw. die Diagnose "vaskuläre Demenz" bedingen konnten. Demenzerkrankungen jeglicher anderer Ätiologie flossen in die Datenauswertung nicht mit ein.

Sowohl *early-onset* AD-Patienten, sowie *late-onset* AD-Patienten wurden in die Studie miteinbezogen; diese beiden diagnostischen Gruppen wurden in der Auswertung der Daten sowohl im Kollektiv, als auch separat betrachtet. Soziale und berufliche Kontextbedingungen wurden mit einem eigens entworfenen Fragebogen erfasst. Um populationsspezifische Differenzen in Allel- und Genotypverteilung auszuschließen, wurden ausschließlich kaukasische Patienten in die Untersuchung eingeschlossen.

Die neuropsychologische Datenerhebung wurde den Fähigkeiten des Patienten entsprechend durchgeführt und bei Bedarf abgebrochen. Insgesamt nahmen 323 Alzheimer-Patienten an dieser Studie teil. Davon zählten 236 Personen zur LOAD- und 87 Teilnehmer zur EOAD-Gruppe (Tabelle 4.1).

**Tab.4.1:** Übersicht Studienteilnehmer

Probanden		Anzahl
Alzheimer Patienten	<i>Early-Onset</i>	87
	<i>Late-Onset</i>	236
	<b>GESAMT</b>	323
Kontrollen		677
<b>Gesamt</b>		<b>1000</b>

#### **4.2.2 Kontrollprobanden**

Die Kontrollgruppe setzte sich aus 677 nicht verwandten und zufällig ausgewählten Personen aus dem Münchener Raum zusammen. Dabei wurden die deutschen Probanden dem Alter der Patientengruppe nach selektiv angeglichen, um in den Testverfahren ein vergleichbares Ergebnis zu erzielen.

Eingeschlossen wurden ausschließlich Probanden ohne demenzielle, psychiatrische oder neurologische Erkrankungen, frei von Alkohol-, Drogen-, oder Medikamentenmissbrauch und Suizidalität. Dies galt ebenso für den Probanden selbst, als auch für seine nächsten biologischen Verwandten. Zur Erfassung der anamnestischen Daten wurde derselbe Fragebogen wie bei den Patienten sowie das *Strukturierte Klinische Interview* (SKID I und II, Wittchen et al., 1997) verwendet. Probanden mit relevanten somatischen oder psychiatrischen Erkrankungen wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

#### **4.3 Neuropsychologische Untersuchung**

Die AD ist eine heterogene und multifaktoriell bedingte Erkrankung, deren unterschiedliche genetische Risikovarianten zugrunde liegen. Das ätiologisch und klinisch inhomogene Krankheitsbild der AD erschwert die Suche nach Suszeptibilitätsgenen, daher bietet sich die Auswahl eines intermediären klinischen Phänotyps an. Das Konzept der Endophänotypen dient als Brücke zwischen heterogenen, klinischen Phänotypen und den zugrundeliegenden, multiplen Genotypen. Gedächtnisstörungen gehören neben anderen zu den Kernmerkmalen

der AD, und sind demnach ein geeigneter Parameter für die Suche nach intermediären, endophänotypischen Markern.

Um die SNPs mit neuropsychologischen Endophänotypen zu assoziieren, die insbesondere bei der Alzheimer Demenz beeinträchtigt sind, wurde mit allen Studienteilnehmern ein Set an psychometrischen Tests durchgeführt, die eine quantifizierende Erfassung alzheimerspezifischer kognitiver Beeinträchtigungen relativ zur alters-, geschlechts- und bildungsspezifischen Normpopulation erlauben.

In die Auswertung der vorliegende Studie miteinbezogen wurde dabei der MMSE (*Mini Mental State Examination*) und die CERAD-Testbatterie (*Consortium to Establish a Registry for Alzheimers' Disease*). Alle in der Auswertung berücksichtigten Subtests erfassen verschiedene Gedächtnisleistungen.

#### **4.3.1 Mini Mental State Examination**

Der *MMSE* (Folstein et al., 1975) ist ein kompaktes Screeningverfahren zur Erfassung der allgemeinen kognitiven Leistungsfähigkeit bei älteren Patienten. Acht Aufgabenkomplexe erfassen Orientierung (zeitlich, örtlich, situativ, zur eigenen Person), Merkfähigkeit, Konzentration, Rechenfähigkeit, Sprache und Praxie. Für jede richtig gelöste Aufgabe bekommt der Proband einen Punkt bei einer maximalen Punktewertung von 30. Beim *MMSE* handelt es sich um ein Interview mit praxisnahen Handlungsaufgaben (beispielsweise subtrahieren oder abzeichnen zweier Fünfecke), das zwischen zehn und fünfzehn Minuten dauert.

Der *MMSE* wird als ökonomisches Verfahren zum Schnell-Screening im klinischen Alltag verbreitet eingesetzt. Insgesamt erfasst er grob zwei der zentralen Demenz-Diagnosekriterien (Gedächtnisstörungen und mindestens eine weitere kognitive Funktion), lässt aber keinen Rückschluss auf eine Unterscheidung zwischen den Demenzformen zu. Da der *MMSE* anfällig für Störeinflüsse ist, wurde insbesondere auf die Reduzierung dergleichen geachtet: die Probanden wurden in denselben Räumen zu denselben Bedingungen und ausschließlich von geschultem Personal getestet.

#### **4.3.2 CERAD**

Das *Consortium to Establish a Registry for Alzheimers' Disease* entwickelte 1989 die CERAD-Testbatterie mit dem Ziel, ein einheitliches und standardisiertes Instrument zur Erfassung alzheimerspezifischer Defizite zu generieren (Morris et al., 1989). Die klinischen, neuropsychologischen und neuropathologischen Anzeichen einer Alzheimer Demenz werden in der CERAD mit insgesamt sieben Subtests erfasst (exklusive MMSE), in der CERAD-plus Version kommen drei weitere Tests (*Trail Making Test A* und *B*, phonematische Flüssigkeit) hinzu.

Dabei werden insbesondere die für Alzheimer-Patienten typischerweise beeinträchtigten kognitiven Leistungen untersucht: eine spezielle Gewichtung erfährt das Gedächtnis und die Lernfähigkeit, sowie Sprache, Praxie und Orientierung.

Mitte der 90er Jahre wurde im Rahmen des *Memory Clinic* Treffens in Zürich beschlossen, eine deutsche Version der CERAD als minimales gemeinsames Untersuchungsset in den deutschsprachigen europäischen Ländern zur Alzheimerdiagnostik zu verwenden (Thalmann et al., 1997). Dies erleichtert die Kommunikation zwischen den Einrichtungen und erlaubt eine Vergleichbarkeit und Kompatibilität der Daten zu Forschungszwecken.

Der CERAD wurde in mehreren Studien eine gute Auswertungsobjektivität, *Interrater* und *Test-Retest*-Reliabilität sowie Validität (Spezifität 98%, Sensitivität 87%) nachgewiesen (Morris et al., 1989; Welsh et al., 1993; Morris et al., 1993; Aebi, 2002; Chandler et al., 2005). Demographische Daten wie Alter, Ausbildung und Geschlecht beeinflussen nachweislich die Leistung in der CERAD und werden in die Berechnung der z-Werte miteinbezogen.

Die Durchführung der CERAD-plus-Batterie inklusive MMSE dauerte in dieser Studie je nach Patient und Erkrankungsstadium zwischen 30 und 60 Minuten. Nach ihren Entwicklern sind die Aufgaben der CERAD-Batterie so gewählt, dass eine kontinuierliche Testung über den Krankheitsverlauf möglich ist (Morris et al., 1989), tatsächlich gestaltet sich eine Testung im fortgeschrittenen Krankheitsstadium allerdings oft schwierig, da die Instruktionen größtenteils missverstanden werden. Hilfestellungen von Seiten des Testleiters verfälschen die Reliabilität der Testung und können daher nicht angeboten werden. Insofern ist ein Abbruch der Testung, insbesondere um den Patienten nicht unnötig zu frustrieren, in schweren Fällen geboten.

Die CERAD-Batterie setzt sich aus folgenden Untertests zusammen:

1. *Verbale Flüssigkeit* (Isaacs und Kennie, 1973)

Der Patient hat eine Minute Zeit, so viele Wörter als möglich zu einer bestimmten Kategorie (Tiere) zu nennen. Gewertet wird die Anzahl korrekt genannter Tiere. Bei der „verbalen Flüssigkeit“ wird insbesondere die verbale Produktionsfähigkeit des Patienten bewertet, ebenso wie das semantische Gedächtnis, die Sprache und die exekutiven Funktionen (Tabelle 4.2).

2. *Boston Naming Test* (Goodglass und Kaplan, 1983)

Die in der CERAD-Batterie auf 15 Bilder verkürzte Version des *Boston Naming Tests* (Originalversion umfasst 60 Bilder) erfasst die visuelle Wahrnehmung und die Wortfindung. Der Proband muss 15 verschiedene Objekte erkennen, die ihm in Form von Zeichnungen präsentiert werden und je nach Auftretenshäufigkeit in der Spontansprache den drei Kategorien („häufig“, „mittel“ und „selten“) zugeteilt werden.

3. *Wortliste Gedächtnis*

Dem Proband werden nacheinander 10 Wörter präsentiert, die er laut vorlesen (falls dies nicht mehr möglich ist, werden die Wörter vom Testleiter vorgelesen) und sich einprägen soll. Dieser Lerndurchgang wird (mit jeweils unterschiedlicher Reihenfolge der Wörter) insgesamt dreimal durchgeführt, im Anschluss an jeden Durchgang werden die Wörter frei aus dem Gedächtnis abgerufen. Die Endsumme ergibt die nach jedem der drei Durchgänge richtig reproduzierten Wörter (max. 30). Dieses umfassende Gedächtnisitem der CERAD erfasst die Fähigkeit, neue verbale Informationen zu lernen und frei abzurufen.

4. *Konstruktive Praxis*

Dem Proband werden vier mit steigender Komplexität verbundene geometrische Figuren präsentiert, die er möglichst genau abzeichnen soll. Bei den Figuren handelt es sich um einen Kreis, einen Rhombus, zwei sich überschneidende Rechtecke und einen Würfel (max. Punktzahl 11).

### **5. Wortliste abrufen**

Der Proband wird aufgefordert, die 10 zuvor gelernten Wörter wiederzugeben. Hier stellt sich heraus, ob der Proband neu gelernte Informationen über eine kurze Zeitspanne im verbal episodischen Gedächtnis behalten kann.

### **6. Wiedererkennen**

Erneut wird die zuvor gelernte Wortliste präsentiert, allerdings mit zusätzlichen 10 Distraktoren. Der Proband wird aufgefordert, die gelernten Wörter aus Aufgabe 4 von den Distraktoren zu unterscheiden (max. Punktewertung 10). Das Abrufen der Wörter unter erleichterten Bedingungen zeigt insbesondere auf, ob der Proband vorwiegend an Gedächtnissstörungen oder an Abruf- und Speicherproblemen leidet.

### **7. Konstruktive Praxis abrufen**

Der Proband soll abschließend die zuvor abgezeichneten Figuren frei aus dem Gedächtnis nochmals auf ein leeres Blatt zeichnen. Getestet wird damit insbesondere das nicht-verbale Gedächtnis.

**Tab.4.2:** Übersichtstabelle CERAD

CERAD-Subtest	Kognitive Leistung	Maximale Punktezahl
Verbale Flüssigkeit	Semantisches Gedächtnis, Sprache, exekutive Funktion	keine max. Punktezahl
<i>Boston Naming Test</i>	Wortfindung, visuelle Wahrnehmung	15
Wortliste Gedächtnis	Neugedächtnis, verbales Gedächtnis	30
Konstruktive Praxis	Visuell-räumliches Gedächtnis	11
Wortliste abrufen	Episodisches Gedächtnis	10
Wortliste wiedererkennen	Gedächtnis, Diskrimination	10
Konstruktive Praxis abrufen	Nicht-verbales Gedächtnis	11

In vorliegender Arbeit wurden die Ergebnisse des MMSE, der drei Aufgaben zur Wortliste (Wortliste lernen, abrufen und wiedererkennen) und des *Boston Naming Test* für die Überprüfung der Assoziation von Gedächtnisleistungen mit 19 ausgewählten Markern verwendet.

## 4.4 Laborverfahren

Sämtliche Laborverfahren wurden nach Standardprotokollen von Mitarbeitern der Sektion molekulare und klinische Neurobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

### 4.4.1 Gewinnung des Genmaterials

Sämtlichen Probanden wurde im Rahmen des Screenings ca. 7 ml venöses Blut in EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) -haltigen und damit gerinnungshemmenden Röhrchen (Sarsted, Nürnberg) für die Genotypisierung der SNPs abgenommen.

#### 4.4.1.1 DNA-Extraktion

Die Isolierung genomicscher DNA erfolgte mit dem Reagenziensystem *QiaAmp DNA blood Maxi Kit* nach Herstellerprotokoll. Die DNA-Extraktion wird dabei dank ihrer selektiven Bindung an eine Silikagelmembran gewährleistet.

Das abgenommene Blut wurde 10 min (3000 rpm, *revolutions per minute*) zentrifugiert, der Plasma-Überstand abgenommen und bei -80°C gelagert, während der Blutkuchen bis zur DNA-Extraktion bei -20°C gelagert wurde. Zur Extraktion wurde der aufgetaute Blutkuchen (RT) mit 1xPBS-Puffer auf ein insgesamtes Volumen von 10 ml gestreckt. Um an die DNA im Zellinneren zu gelangen, wurden die Zellen mit 500 µl QIAGEN Protease lysiert, im Anschluss wurde 12 ml Guanidiumhydrochlorid-haltiger Lysepuffer (Qiagen, Hilden) dazugegeben und gut durchgemischt (Vortexer, Firma Scientific Industries, New York). Die Probe wurde für einen maximalen Ertrag an DNA bei 70°C für 30 min im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Ethanol (96-100%) zugesetzt und erneut gemischt. Durch sukzessive Zentrifugation (jeweils 3 min bei 3000 rpm) des Gemischs fand

eine selektive Absorption der DNA an der Silikamembran statt. Die Entfernung von Kontaminationen (Proteine, RNA) erfolgte durch Zentrifugation (2 min bei 4000 rpm). In einem zweiten Waschschritt wurden mit 5 ml ethanolhaltigem Waschpuffer AW2 Guanidiumhydrochlorid-Salze entfernt. Die verbleibenden Ethanolrückstände wurden in der Zentrifuge (15 min bei 4000 rpm) entfernt und die Membran getrocknet. Zur Eluierung der DNA von der Membran, wurde sie zweimal mit Elutionspuffer AE (1,5 ml, pH über 9) inkubiert und im Anschluss zentrifugiert (2 min bei 5000 rpm). Die extrahierte DNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

#### **4.4.1.2 Bestimmung und Einstellung der DNA-Konzentration**

Vor Weiterprozessierung der extrahierten DNA-Lösung musste die DNA-Konzentration bestimmt und auf einen einheitlichen Wert von 50 ng/ $\mu$ l eingestellt werden.

Die DNA-Konzentration wurde mittels einer Fluoreszenzmessung mit *PicoGreen* ermittelt: dazu wurden die DNA-Lösungen mit dem interkalativen Farbstoff *PicoGreen* (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt. *PicoGreen* absorbiert als Komplex in Kombination mit doppelsträngiger DNA Licht bei 480 nm und emittiert bei Lichtbestrahlung Licht bei 520 nm Wellenlänge. Mittels der proportional zum DNA-Vorkommen emittierten Lichtquanten und einer interpolierten Standardkurve kann die vorliegende DNA-Konzentration erschlossen werden.

Für die Quantifizierung mittels Standardkurve der DNA wurde eine Verdünnungsreihe (1:2) mit einem DNA-Standard (100 ng/ $\mu$ l; Firma Clontech, Mountain View, USA) und autoklaviertem Acqua dest. angesetzt. Ausgehend von Standard 1 (100 ng/ml) wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die DNA-Konzentrationen sind in Tabelle 4.3 angeführt, Standard 8 dient als leerer Referenzwert.

**Tab.4.3:** Verdünnungsreihe DNA-Standard

<b>Standard</b>	<b>Volumen (µl)</b>	<b>Konzentration genomischer DNA (ng/ml)</b>
1	100 µl	100 ng/ml
2	100 µl	50 ng/ml
3	100 µl	25 ng/ml
4	100 µl	12,5 ng/ml
5	100 µl	6,25 ng/ml
6	100 µl	3,125 ng/ml
7	200 µl	1,5262 ng/ml
8	100 µl	0

Die DNA-Lösungen wurden mit autoklaviertem Acqua dest. 1:10 verdünnt (5 µl DNA und 45 µl Acqua dest.).

5 µl der DNA-Lösung bzw. des Standardverdünnungsreihe wurden zu vorgelegten 50 µl Acqua dest. in eine *Thermo fast 96 well plate* (Firma ABgene, Hamburg) gegeben.

Um Messfehler auszuschließen und Abweichungen sichtbar zu machen, wurde sowohl von den Proben als auch von der Standardreihe jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Der lichtempfindliche Farbstoff wurde kurz vor Verwendung unter geringem Lichteinfall mit Acqua dest. 1:156 verdünnt und je 145 µl zu den Proben- bzw. der Standardlösung gegeben (Endverdünnung PicoGreen: 1:200). Unmittelbar nach Zugabe des Farbstoffes erfolgte die Messung im *Victor3 1420 Multilabelcounter*.

Anhand der ermittelten Messwerte (Mittelwert der Doppelbestimmungen) erfolgte eine DNA-Konzentrationseinstellung durch den Pipettierroboter auf 50 ng/µl.

#### **4.4.2 Genotypisierung**

Die Gene wurden anhand von vorläufigen Ergebnissen der Sektion aus Untersuchungen zur differentiellen mRNA Expression bei Alzheimer Demenz mit Unterschieden sowohl für das Gesamttranskript, wie auch einzelner Exons mittels RNA Expressionsarrays ausgewählt.

#### **4.4.2.1 Bestimmung der APOE Epsilon Allele**

Die Genotypisierung der Allele  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  und  $\epsilon 4$  des APOE Gens wurde mithilfe von TaqMan SNP Assays (Applied Biosystems) durchgeführt und erfolgte nach Herstellerprotokoll. Dazu wurden 10  $\mu\text{l}$  PCR *Master Mix*, 0,5  $\mu\text{l}$  SNP-spezifischer *Genotyping Assay Mix* und 6,5  $\mu\text{l}$  DNase freies Wasser gemischt und zur DNA (15 ng; 5 ng/ $\mu\text{l}$ ) beigegeben. Die Amplifizierung erfolgte in einem Thermocycler: Die Denaturierung erfolgte durch Erhitzen auf 95°C, gefolgt von 40 Zyklen bei 92°C. Die Hybridisierung und Elongation erfolgte bei 60°C (1 min). Im Anschluss an die PCR wurden die Genotypen mithilfe einer Software (PRISM 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems) analysiert.

#### **4.4.2.2 SNP Auswahl und Assay Design**

Die Auswahl geeigneter SNPs beruhte auf folgenden Kriterien:

- 1) Exonische Variationen mit einer minimalen Allelfrequenz von 1% in der kaukasischen Stichprobe des internationalen Hapmap Consortiums: Hier waren zum Zeitpunkt der SNP-Auswahl lediglich für ELAVL4 und HNRNPH3 jeweils ein SNP annotiert, wobei der exonische SNP im ELAVL4-Gen nicht auswertbar war.
- 2) Bestimmung der LD Blöcke und Auswahl einer Variation auf dem entsprechenden Block.
- 3) Überprüfung der ausgewählten SNPs im Hinblick auf die Kompatibilität mit der Genotypisierungsmethode.

Insgesamt wurden so 6 SNPs für HNRNPA2B1, jeweils 11 SNPs für HNRNPH3 bzw. PCBP2 und 12 SNPs für ELAVL4 ausgewählt, von denen jedoch 21 Assays aus verschiedenen Gründen (Totalausfall, Verschmelzung der Genotypcluster, Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE), abweichende Genotypen in der Kontroll-Population) die Qualitätskontrollen nicht bestanden.

Um einen Zusammenhang zwischen den 4 ausgesuchten Genen (HNRNPA2B1, HNRNPH3, PCBP2 und ELAVL4) und der AD festzustellen, wurden schließlich insgesamt 19 verschiedene SNPs dieser Gene erfolgreich genotypisiert und hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht (Tabelle 4.4).

**Tab.4.4:** ELAVL4, HNRNPA2B1, HNRNPH3 und PCBP2 mit den jeweiligen SNPs (NCBI, GRCh38)

Gen	SNPs	Lokalisation	Allele	Funktionale Konsequenzen
<b>ELAVL4</b> Chromosom 1: 50048014- 50203770	rs4412638	Chr.1: 50148004	G/T	Intron
	rs12024093	Chr.1: 50163179	A/G	Intron
	rs12043872	Chr.1: 50179219	T/C	Intron
	rs3009113	Chr.1: 50184027	C/T	Intron
	rs913858	Chr.1: 50192398	A/G	Intron
<b>HNRNPA2B1</b> Chromosom 7: 26189927- 26200793	rs12113404*	Chr.7: 26192747	A/G	Intron
	rs12672536	Chr.7: 26194030	C/T	Intron
	rs4722589	Chr.7: 26183674	A/C	Intron
<b>HNRNPH3</b> Chromosom 10: 68332011- 68343196	rs10998072	Chr.10: 68332166	C/T	Intron
	rs10998076	Chr.10: 68336729	A/G	Intron
	rs1162757	Chr.10: 68340598	C/T	Intron
	rs16925347	Chr.10: 68341660	C/G	Exon 9 (RUFY2:Intron)
	rs1162756	Chr.10: 68343179	A/T	3'-UTR (RUFY2:Intron)
<b>PCBP2</b> Chromosom 12: 53452102- 53481162	rs1683152	Chr.12: 53456212	C/T	Intron
	rs784566	Chr.12: 53464398	A/G	Intron
	rs11170562	Chr.12: 53471071	A/G	Intron
	rs784563	Chr.12: 53472835	G/T	Intron
	rs2249381	Chr.12: 53473528	A/G	Intron
	rs1716966*	Chr.12: 53456212	C/T	Intron

\*diese SNPs werden in die Haplotypanalyse miteinbezogen, da sie im *linkage disequilibrium* mit den SNPs der jeweiligen Gene (HNRNPA2B1 und PCBP2) liegen. Lokalisiert sind sie auf NFE2L3 (rs12113404) und MAP3K12 (rs1716966); UTR = *untranslated region*

Die untersuchten Marker befinden sich bis auf rs16925347 und rs1162756 in intronischen Bereichen. Beide SNPs sind sowohl auf HNRNPH3, als auch in intronischen Regionen des überlappenden Gens RUFY2 lokalisiert, wobei rs16925347 in Exon 9 des HNRNPH3-Gens zu einem Aminosäureaustausch von Glycin nach Alanin führt und rs1162756 sich im 3' untranslatierten Bereich des Gens befindet, dieser schließt an eine kodierende Region an. Die beiden SNPs rs12113404 und rs1716966 befinden sich in möglicherweise regulatorischen 3' Bereichen von HNRNPA2B1 und PCBP2 sowie im *linkage disequilibrium* (LD) mit den jeweiligen SNPs dieser Gene, sodass sie für die Haplotypanalyse dazugenommen wurden. Beide sind zusätzlich auf einem anderen Gen lokalisiert (rs12113404 auf NFE2L3 und rs1716966 auf MAP3K12).

Die Software *AssayDesign 3.1* ermittelte nach Berücksichtigung diverser Angaben (SNP-Allele, flankierende Sequenzen) für die 19 SNPs die Plexzusammenstellung (= Set kombinierbarer SNPs) und generierte für jeden SNP ein *Primerset* bestehend aus zwei PCR-Primern (Tabelle 4.5) und einem *Extendprimer*. Die optimalen Primer lagen dabei etwa 100 bp auseinander und in unmittelbarer Nähe der zu amplifizierenden SNPs. Damit wurde nur ein selektiver Bereich von rund 100 bp um die SNPs herum amplifiziert.

**Tab.4.5:** PCR-Primer der untersuchten SNPs

SNP	Chr.	GEN	1. PCR-PRIMER	2.PCR-PRIMER
rs4412638	1	ELAVL4	XATGTCCCCAGCACATAACAC	XATCCCTGGCTGTGAATTGTC
rs12024093	1	ELAVL4	XAGATGAGAGAGGGCTTCTG	XTTGCCCTTGACTGCCTATTG
rs12043872	1	ELAVL4	XCACCCACCCTGTATCAAAC	XTCCTACAGTGTCTCAGAAC
rs3009113	1	ELAVL4	XAACGTGTCTCTGGTTCTGC	XAATGCTTCTCTGCCAAGGTC
rs913858	1	ELAVL4	XAGTAATGTGGACCCCTGCTTC	XGGTTCTGCTCATCCTTCATC
rs12113404	7	HNRNPA2B1	XTAAAGCCCCAACCAGTTTAG	XCTGCCCATTCAAGATGTCTC
rs12672536	7	HNRNPA2B1	XATCCTTGCAGCCAGTTAGC	XAAAGAATAGGGTCAGCCACG
rs4722589	7	HNRNPA2B1	XTTGTGGGTAAAGGACTGTGAG	XATCTTTGGGCCAGTAGGAG
rs10998072	10	HNRNPH3	XCCTGTCAGCGATAGTTAC	XTACACGAGGCAAACGACTTC
rs10998076	10	HNRNPH3	XGACTTCTGTGATATTGTCC	XATCCACTAACATCAAGAGCC
rs1162757	10	HNRNPH3	XTAGAGACCCAATGCCATT	XCCCAGTAAGATCTAGAGCAC
rs16925347	10	HNRNPH3	XTCTGGCATGGAGGTTCTG	XCATCGATAAGCAGCTAACCC
rs1162756	10	HNRNPH3	XTTCTAGGACAGACGCCATAC	XACCTGTTGATGTGAATTAG
rs1683152	12	PCBP2	XTCCTGACCTCGTTATCTGC	XAAAGAGTCACCTGAGGCTGG
rs784566	12	PCBP2	XGCAGCTCTTCTATGAGTGG	XAGGTCCATCTGTGGACATTG
rs11170562	12	PCBP2	XCCTACACCCTTACTCATAC	XTTGGCTCAGAACTGGCTGTC
rs784563	12	PCBP2	XGTAGCAGTCTGACTTTGCC	XTGGTGGGTGGACAAGAAAAC
rs2249381	12	PCBP2	XTTCTTCGATAGGCTTGC	XTATTGCAGGAGCTAGGCAAG
rs1716966	12	PCBP2	XCCTCACTTACCTGGAGAG	XCTCTAGGAACACTCAACTC

X= ACGTTGGATG (Massenanhang)

#### 4.4.2.3 Das iPLEX-Verfahren

Mit der iPLEX-Methode lassen sich bis zu 36 SNPs einer DNA-Probe untersuchen. Dazu ist in einem ersten Schritt die Amplifizierung der Zielsequenz mittels PCR

notwendig, um diese in ausreichender Konzentration für den *Extendprimer* vorliegen zu haben. In einem zweiten Schritt werden die verbleibenden Nukleotide mittels Dephosphorylierung durch die SAP entfernt, um eine störungsfreie Einzelbasenverlängerung durch die iPLEX-Reaktion zu gewährleisten. Das PCR-Produkt wird mit den *Extendprimern*, einer termophilen DNA-Polymerase und den vier Didesoxynukleotiden versetzt. In einer zyklischen Reaktion entsteht schlussendlich für jedes Allel ein massenspezifisches Produkt, welches im MALDI-TOF bestimmt wird und somit auf den zugrunde liegenden Genotyp geschlossen werden kann.

#### 4.4.2.4 Initiale PCR

**Tab.4.6:** Reagenzien und Materialien für die PCR

Verbrauchsmaterial/Gerät
Centrifuge 5810 R; Eppendorf, Hamburg
Dan Klotrix (Verhinderung von DNA-Kontamination); Colgate-Palmolive, Hamburg
dNTP Set, 100nM; ABene, Hamburg
Easy Peel Heat Sealing Foil; ABgene, Hamburg
Eppendorf Research Pipetten; Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (0,5-20µl; 2-200µl; 50-1000µl); Eppendorf, Hamburg
Gene Amp PCR System 9700; Applied Biosystems, Foster City, USA
Heat Sealer ALPS-300; ABgene, Hamburg
HotStar Taq-Polymerase (5U/µl); Qiagen, Hilden
MgCl <sub>2</sub> , 25mM; Qiagen, Hilden
Pipettierroboter MICROLAB MPH 96; Hamilton, Reno, USA
Mikrotestplatte 96 K; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettierwanne für Mehrkanalpipetten; Ratiolab, Dreieich
PCR-Puffer 10x; Qiagen, Hilden
Reinstwasseranlage Purelab Ultra; ELGA, Celle
Spritzen, 50ml; BD Bioscience GmbH, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter, 0,22µM zur Wasserfilterung; Qualilab, Olivet, Frankreich
Thermo Fast 384 Well Plate; ABgene, Hamburg

Die relativ kurzen genomischen Bereiche um die 19 SNPs herum wurden zunächst mit einer konventionellen PCR amplifiziert. Die kombinierten SNPs eines Plexes können dabei parallel prozessiert (= SNP *Capture Methode*, Sequenom, 2005) werden.

In einem ersten Schritt wurde die auf 50 ng/ $\mu$ l eingestellte DNA-Konzentration mit destilliertem, sterilfiltriertem Wasser 1:10 auf 5 ng/ $\mu$ l verdünnt (90  $\mu$ l Acqua dest. + 10  $\mu$ l Arbeitslösung). Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Platten mit einer Folie abgedeckt auf -20°C gelagert.

Die verwendeten Primer (Tabelle 4.5; Firma Metabion, Martinsried) wurden gefroren in 96er-Matrixplatten geliefert, vor Gebrauch aufgetaut und vorsichtig auf dem Vortexer gemischt. Zu den aufgetauten Reagenzien (10x PCR-Puffer, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM dNTP Mix) wurden die Primer und kurz vor Gebrauch die Taq-Polymerase gegeben (Tabelle 4.7). Das Gemisch wurde sorgfältig abzentrifugiert.

In einem nächsten Schritt wurde 2,5  $\mu$ l DNA (5 ng/ $\mu$ l) in eine 384 well Platte vorgelegt. 3  $\mu$ l des vorbereiteten Reaktionsgemisches wurden dazugegeben.

**Tab.4.7:** Zusammensetzung Volumina Reagenzien für die PCR

Reagenz	Volumen für eine Reaktion
Wasser	1,850 $\mu$ l
10xPCR-Puffer	0,625 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 25mM	0,325 $\mu$ l
dNTP Mix 25mM	0,100 $\mu$ l
Primer Mix 500nM	1,000 $\mu$ l
Hotstar Taq Polymerase 5U/ $\mu$ l	0,100 $\mu$ l
<b>TOTAL</b>	<b>4,000 <math>\mu</math>l</b>

Die abzentrifugierten Reaktionsplatten wurden zur temperaturabhängigen Denaturierung, Hybridisierung und Amplifikation in *Thermocyclern* weiterverarbeitet (zur Übersicht Tabelle 4.8).

In einem ersten Schritt kommt es durch kurzzeitiges Erhitzen (20 Sekunden) des Gemisches auf 95°C zur Denaturierung der DNA: die Doppelhelix teilt sich in die beiden Einzelstränge auf. Durch Senkung der Temperatur auf 56°C (30 Sekunden) kommt es zur Hybridisierung der beiden Einzelstränge und die Primer lagern sich an den jeweils komplementären Strang an. Optimale Temperaturbedingungen für die verwendete Taq-Polymerase werden mit Erhöhung der Temperatur für 60 Sekunden

auf 72°C geschaffen. Die Polymerase beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und füllt sukzessive Richtung 5'-Ende den einzelnen DNA-Strang mit freien Nukleotiden auf.

**Tab.4.8:** PCR-Vorgang

PCR-Schritte	Dauer	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung (erster Zyklus)	5 min	95°C	1 Zyklus
Denaturierung	20 sec	95°C	45 Zyklen
Primerhybridisierung	30 sec	56°C	
Elongation	60 sec	72°C	
Finale Elongation	3 min	72°C	1 Zyklus
Abschluss	unbegrenzt	4°C	-

Die so entstandenen PCR-Produkte dienen jeweils als Ausgangsmaterial für den darauffolgenden Amplifikationszyklus (insgesamt 45 Zyklen). Die Extensionsprodukte wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

#### 4.4.2.5 Dephosphorylierung

**Tab.4.9:** Reagenzien und Materialien für die PCR

Verbrauchsmaterialien/Gerät
Centrifuge 5810R; Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research Pipetten; Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, (0,5-20µl; 2-200µl; 50-1000µl); Eppendorf, Hamburg
Gene Amp PCR System 9700; Applied Biosystems, Forster City, USA
Mikrotestplatte 96 K; Sarstedt, Nümbrecht
Multimek Pipettierroboter; Beckmann, Fullerton, USA
Pipettierwanne für Mehrkanalpipetten; Ratiolab, Dreieich
Reinstwasseranlage Purelab Ultra; ELGA, Celle
SAP-Buffer; Sequenom, San Diego, USA
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) Enzyme; Sequenom, San Diego, USA
Spritzen, 50ml; BD Bioscience GmbH, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter, 0,22µM zur Wasserfilterung

Um die Folgereaktionen und die Messresultate im MALDI-TOF nicht zu verfälschen, müssen die in der PCR nicht inkorporierten Nukleotide entfernt bzw. enzymatisch inaktiviert werden. Dazu wird eine aus Eismeer-garnelen isolierte Phosphatase verwendet, die freie Nukleotide dephosphoryliert. Die *Shrimp Alkaline Phosphatase* hat bei niedrigen Temperaturen ihr Arbeitsoptimum und wird durch Erhitzen auf 85°C inaktiviert.

Um die unerwünschten dNTPs zu dephosphorylisieren werden 5 µl der einzelnen Reaktionsprodukte mit einem SAP-Gemisch (bestehend aus SAP-Enzym und Puffer, Wasser) behandelt (Tabelle 4.10).

**Tab.4.10:** Volumina der Reagenzien (SAP – Gemisch)

Reagenzien	Volumina
Wasser	1,530 µl
10x SAP Buffer	0,170 µl
SAP-Enzym	0,300 µl
Total	2,000 µl

Für den Dephosphorylierungsvorgang werden die mit dem SAP-Gemisch abzentrifugierten Proben im *Thermocycler* bei 37°C inkubiert. Daraufhin wird die SAP bei 85°C dauerhaft inaktiviert (10 min).

#### 4.4.2.6 iPLEX – Primerextensionsreaktion

**Tab.4.11:** Reagenzien und Materialien für die Primerextensionsreaktion

Verbrauchsmaterial/Gerät
<i>Centrifuge 5810 R; Eppendorf, Hamburg</i>
<i>Easy Peel Heat Sealing Foil; ABgene, Hamburg</i>
<i>Eppendorf Research Pipetten; Eppendorf, Hamburg</i>
<i>Pipettenspitzen (0,5-20µl; 2-200µl; 50-1000µl); Eppendorf, Hamburg</i>
<i>Gene Amp PCR System 9700; Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
<i>Heat Sealer ALPS-300; ABgene, Hamburg</i>
<i>iPLEX Buffer Plus; Sequenom, San Diego, USA</i>
<i>iPLEX Enzyme; Sequenom, San Diego, USA</i>
<i>iPLEX Termination Mix; Sequenom, San Diego, USA</i>
<i>Mikrotestplatte 96 Wells; Sarstedt AG &amp; Co. Nümbrecht</i>
<i>Multimek Pipettierroboter (Zugabe Extend-Mastermix); Beckmann, Fullerton, USA</i>
<i>Pipettierwanne für Mehrkanalpipetten; Ratiolab, Dreieich</i>
<i>Reinstwasseranlage Purelab Ultra; ELGA, Celle</i>
<i>Spritzen, 50ml; BD Bioscience GmbH, Heidelberg</i>
<i>Spritzenvorsatzfilter, 0,22µM zur Wasserfilterung; Qualilab, Olivet, Frankreich</i>
<i>Thermo Fast 384 Well Plate; ABgene, Hamburg</i>

Nach der Dephosphorylierung der freien Nukleotide konnten die PCR-Produkte der Einzelbasenextensionsreaktion zugeführt werden. Dabei wird für das jeweilige Allel der 19 untersuchten SNPs ein Extensionsprodukt mit messbaren massenspezifischen Unterschieden generiert. Die dazu benötigten *Extendprimer* (Tabelle 4.12) lagern sich jeweils unmittelbar vor den zu untersuchenden SNPs an und werden in der iPLEX-Reaktion um exakt eine Base verlängert, die jeweils komplementär zum untersuchten SNP ist. Um eine weitere Elongation zu verhindern, werden artifizielle Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTP) verwendet, deren Ribose an der 2' und 3' Position desoxidiert ist und denen folgedessen am 3'-Ende ein Sauerstoffatom fehlt. Die fehlende Hydroxygruppe führt zum sofortigen Abbruch des Elongationsvorgangs, sodass das nächste Nukleotid keine Phosphodiesterbindung mit dem Strang eingehen kann. Um vernünftig messbare massenspezifische Unterschiede zwischen den Einzelbasenextensionsprodukten zu erhalten, wurden massenmodifizierte ddNTPs verwendet.

**Tab.4.12:** Extendprimer der ausgewählten SNPs

<b>SNP</b>	<b>Extendprimer</b>
rs4412638	TTCTCCGTTGAGAACAGA
rs12024093	CTGCCTATTGCCTGGCT
rs12043872	GTAAAGTGTCTCAGAAGCCCACATTACC
rs3009113	TGGAGCCAAGAGAGAGCA
rs913858	TCATCTTCTTGCTAGACC
rs12113404	GGGTAGAGAACACAAAAAGTCATC
rs12672536	ATTGTCAGCCACGAAATAAAATGTCT
rs4722589	CAGTAGGAGGAAGTGCTCTT
rs10998072	CCCAAACGACTTCTCCCTCT
rs10998076	GGAGAAAAATGCAATGAGTACTGAT
rs1162757	GAGCACACCATTGCTTT
rs16925347	TGCCCATTCATCTCTCCGTAG
rs1162756	GCCAGAAATGTTATTAAATAATGTCA
rs1683152	GGGTGGCTCATGGCTGTA
rs784566	AAAAAGGCCTGTGGGAAC
rs11170562	TCACTGGCTGTCACTCACC
rs784563	ACACAAAGAGTAGTAGCACCT

Bis auf das Enzym wurden alle Reagenzien aufgetaut, gemischt, abzentrifugiert und gemeinsam mit dem Wasser, dem iPLEX Buffer und dem *Termination Mix* (alles Firma Sequenom, Tabelle 4.13) in einem 15 ml Röhrchen vorgelegt, mit dem *Vortexer* gemischt und abzentrifugiert. Das iPLEX-Enzym wurde erst kurz vor Einsatz aufgetaut und abzentrifugiert. Mit dem Pipettierroboter wurden jeweils 2 µl des Gemisches zu den bereinigten PCR-Produkten gegeben.

**Tab.4.13:** Volumina der Reagenzien (iPLEX – Gemisch)

<b>Reagenzien</b>	<b>Volumina (inklusive Überhang)</b>
Wasser	0,755 µl
iPLEX Buffer Plus	0,200 µl
iPLEX Termination Mix	0,200 µl
Primer Mix (7µM bis 14µM)	0,804 µl
iPLEX Enzym	0,041 µl
<b>TOTAL</b>	<b>2,000 µl</b>

Die abzentrifugierten Reaktionsplatten wurden in einem nächsten Schritt erneut zur temperaturabhängigen Primerhybridisierung im *Thermocycler* weiterverarbeitet (zur Übersicht: Tabelle 4.14).

**Tab.4.14:** iPLEX-Programm

iPLEX-Reaktion	Dauer	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung (erster Zyklus)	30 sec	94°C	1
Denaturierung	5 sec	94°C	1
Primerhybridisierung	5 sec	52°C	5
Extension	5 sec	80°C	40
Finale Extension	3 min	72°C	1
Abschluss	unbestimmt	4°C	-

#### 4.4.2.7 Entsalzung der Reaktionsprodukte

**Tab.4.15:** Reagenzien und Materialien für die Entsalzung

Verbrauchsmaterial/Gerät
Centrifuge 5810 R; Eppendorf, Hamburg
Clean Resin Sequenom, San Diego, USA
Dimple Plates Sequenom, San Diego, USA
Pipettierroboter Multimek Beckmann, Fullerton, USA
Reinstwasseranlage <i>Purelab Ultra</i> ELGA, Celle
Spritzen, 50ml BD Bioscience GmbH, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter, 0,22µM zur Wasserfilterung Qualilab, Olivet, Frankreich

Nach Abschluss der Extendprimerhybridisierung war es nötig, sämtliche Proben zu entsalzen, damit keine Natrium- und Kaliumionen mit der empfindlichen massenspezifischen Messung im MALDI-TOF interferieren. Dazu wurden zu den Proben jeweils 6 mg *Clean Resin* (Sequenom, San Diego) und 25 µl sterilfiltriertes, destilliertes Wasser gegeben. Die verschlossenen Platten wurden 10 min zum Zwecke einer homogenen Verteilung gemischt und anschließend abzentrifugiert (5 min bei 2500 rpm), damit sich das *Clean Resin* wieder am Boden absetzen kann.

#### 4.4.2.8 Messung im MALDI-TOF

**Tab.4.16:** Reagenzien und Materialien für die Messung im MALDI-TOF-MS

Verbrauchsmaterial/Gerät
3 Point Calibrant (zur Kalibrierung der Massenspektren); Sequenom, San Diego, USA
AssayEditor 3.4.0.7; Sequenom, San Diego, USA
MassARRAY POINT Nanodispenser; Sequenom, San Diego, USA
MNL 200 Stickstofflaser; LTB Laser Technik, Berlin
Autoflex Massenspektrometer; Bruker Daltonics, Bremen
Nitrogen Generator; Parker Balston, Haverhill, USA
PlateEditor 3.4.0.48; Sequenom, San Diego, USA
RT Workstation 3.4 Chiplinker; Sequenom, San Diego, USA
SpectroAcquire 3.3.1.3; Sequenom, San Diego, USA
SpectroCHIPs; Sequenom, San Diego, USA
SpectroTARGET; Sequenom, San Diego, USA
TyperAnalyzer 3.4.0.18; Sequenom, San Diego, USA

Die Analyse der entsalzten Extensionsprodukte erfolgte in dieser Studie mit einer kombinierten massenspektrometrischen Methode, dem MALDI-TOF: einerseits kommt es durch die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI)) zur Ionisation der Moleküle, andererseits kann durch Messung der Flugzeit (*time of flight, TOF*) auf das Masse-zu-Ladung-Verhältnis der entstandenen Ionen geschlossen werden.

Um die Kokristallisierung von Matrix und Analyt zu gewährleisten, wurden die Proben mit dem *MassARRAY Point Nanodispenser* (Firma Sequenom) auf Siliziumchips (ibid) mit 384 präparierten Matrixpunkten aufgetragen und getrocknet. Damit werden rund 0,5 µl Analytlösung übertragen. Weitere acht Matrixspots wurden mit einem *3 Point Calibrant* (Sequenom, Hamburg) mit bekannten Massen zum Zwecke der Kalibrierung benetzt. Der beladene Chip wurde unverzüglich in das Massenspektrometer eingeschleust (Firma Bruker Daltonics). Durch Beschuss der Matrixpunkte mit kurzen Laserimpulsen kommt es zur Ionisierung der Extensionsprodukte, die durch ein Magnetfeld beschleunigt je nach ihrer Masse zu spezifischen Zeitpunkten auf dem Detektor auftreffen. Der Flugzeitanalysator (TOF) kann demnach abhängig vom Masse-Ladungs-Verhältnis der ionisierten Proben aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeiten auf das Molekulargewicht der vorliegenden Proben schließen.

Ermöglicht wird die Bestimmung der Nukleotide durch die vorangegangene Primerextensions-Reaktion: dabei wurden die Primer um je ein Nukleotid (ddNTP) verlängert, welches sich jeweils massenspezifisch von den drei anderen unterscheidet (Adenin: 313 Da, Guanin: 329 Da, Thymin: 304 Da, Cytosin: 289 Da).

#### 4.4.2.9 Qualitätskontrolle der Genotypisierung

Alle Genotypen eines Polymorphismus, die in die statistische Auswertung eingingen, mussten eine Reihe von Qualitätskriterien erfüllen:

Für alle Ergebnisse wurde mittels der TyperAnalyzer Software (Firma Sequenom, San Diego) ein *clusterplot* generiert. Wenn die *cluster* der einzelnen Genotypen eine in sich geschlossene und sauber getrennte Gruppe darstellen, wurden sie für valide und qualitativ hochwertig befunden (Abbildung 4.1). Diffuse *cluster* oder Artefakte und Nebensignale führten zur Verwerfung der Ergebnisse.

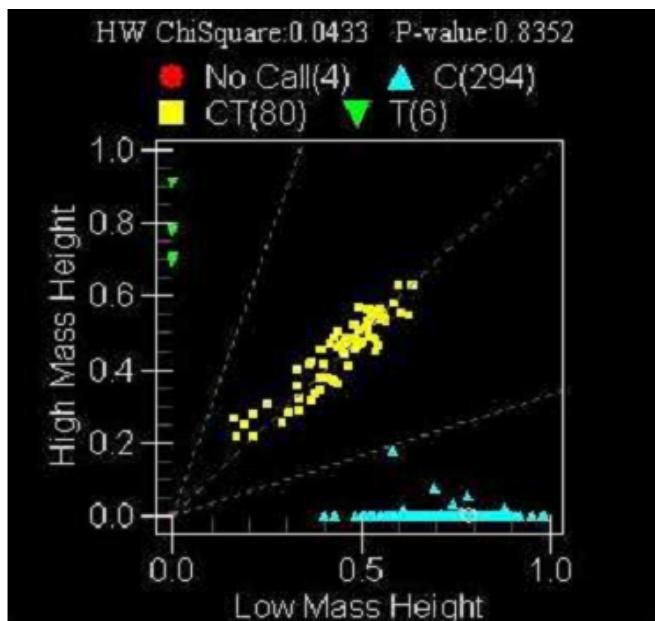


Abbildung 4.1: Clusterplot eines qualitativ hochwertigen SNPs mit sauber getrennten und in sich geschlossenen *clustern*. Blaue und grüne Datenpunkte: homozygote Genotypen, gelbe Datenpunkte: heterozygote Genotypen.

Zudem wurde jeder 96-well-Platte eine Blindprobe (Wasser statt DNA) beigefügt, deren Position jeweils unterschiedlich war, um die DNA-Platten eindeutig identifizieren zu können. Für Blindproben wurde nur das Signal des verlängerten Extensionsprimers generiert. SNPs, die unklare Signale aufwiesen, wurden verworfen.

Des Weiteren wurden Kontrollproben an unterschiedlichen Positionen jeder 96-well-Platte zugefügt, die denselben Genotyp aufweisen mussten. Neben den Kontrollproben wurden zudem in jedem Plex die Referenzproben des *Centre d'Étude du Polymorphisme Humain* (CEPH) mitverarbeitet, die die zu erwartenden Genotypen aufweisen mussten. Diese sind in der HapMap Datenbank gesammelt und dort einsehbar (International HapMap Consortium, 2003). Die ermittelten Genotypen für die CEPH-Proben wurden mit der HapMap-Datenbank abgeglichen und mussten die zu erwartenden Genotypen aufweisen, um in die weitere Analyse einzufließen.

In einem weiteren Schritt wurden alle als valide eingestuften Ergebnisse auf weitere Qualitätsmerkmale überprüft: die Probanden-*call rate* musste mindestens 0,8 ergeben, d.h. mindestens 80 % aller untersuchten SNPs in einem Plex mussten für einen Probanden einen auswertbaren Genotyp ergeben; Probanden mit einer geringeren Rate wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Zusätzlich wurde im Anschluss für jeden Polymorphismus der Anteil an erfolgreich bestimmten Genotypen im Verhältnis zur maximal möglichen Anzahl der Genotypen bestimmt. Dabei flossen nur Polymorphismen mit einer SNP-*call rate* von über 0,95 in die weitere Auswertung ein. Zur weiteren Qualitätssicherung wurde für jeden SNP das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überprüft (Kapitel 5.2). Polymorphismen, die einen p-Wert kleiner als 0,05 aufwiesen, wurden im weiteren Verlauf genau geprüft, während SNPs mit Abweichungen  $p < 10^{-5}$  verworfen wurden.

Sämtliche Proben, die die angeführten Kriterien zur Qualitätssicherung nicht erfüllten, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Anzahl (n) der für valide befindenen Genotypen ist daher nicht für alle Polymorphismen gleich hoch.

## 4.5 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Geno- und Haplotypeverteilung bzw. ihre Assoziation mit kognitiven Parametern erfolgte mit Hilfe von IBM SPSS Statistics 19, PLINK (PLINK v1.07, Purcell et al. 2007), R v 2.13.0 (R Development Core Team, 2011) und Haplovie (Haplovie 4.2, Barrett et al., 2005).

In einer ersten Überprüfung wurden alle 19 SNPs auf ihr Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) untersucht. Dazu wurde die Genotypverteilung der vorliegenden Stichprobe

mit dem exakten Test nach Fisher überprüft. Als Grenzwert galt dabei ein p-Wert von 0,05; Polymorphismen mit signifikant abweichenden Werten ( $<0,05$ ) wurden in die weitere Berechnung nicht miteinbezogen. Die Signifikanz der Genotyp- und Allelverteilungsdifferenzen zwischen den Gruppen (Kontrollen und Alzheimer Patienten bzw. EOAD und LOAD) wurden mit dem exakten Test nach Fisher bestimmt.

Der Einfluss der unterschiedlichen Genotypen wurde mit einer multiplen linearen Regression bestimmt. Da von keinem bivariaten Zusammenhang zwischen Genotypverteilung und kognitiven Parametern ausgegangen werden kann, wurden die Soziovariablen Alter, Geschlecht, Bildungsgrad, sowie ApoE-Genotyp als Kovariablen in die Berechnung integriert. Die Genotypen bzw. Allele flossen als unabhängige Variablen, die Ergebnisse der CERAD-Untertests und des MMSE als abhängige Zielvariablen, in die Berechnung mit ein. Der Genotypeffekt auf die phänotypische Ausprägung wurde mit einem additiven Modell ermittelt, um eine aussagekräftige Vorhersage für die abhängigen Variablen zu erzielen. Als Effektallel wurde das Allel A1 mit der jeweils geringeren Stichprobenfrequenz definiert (die möglichen Genotypkombinationen setzen sich demnach aus 0, 1 oder 2 Effektallelen zusammen).

Die Haplotypanalyse erfolgte mit der Haplovew Software (Haplovew 4.2, Barrett et al., 2005). Die zu einem Haplotype Block gehörigen SNPs wurden vom Programm nach Stacey Gabriels Methode generiert (Gabriel et al., 2002). In den Fall-Kontroll-Vergleichen, sowie in der Assoziation der Haplotypen mit den kognitiven Faktoren, flossen nur Haplotypen mit einer Frequenz über 1% ein.

Für alle durchgeführten statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  als statistische Berechnungsgrundlage festgelegt. Ab  $p < 0,1$  wurde von einem Trend zur Signifikanz ausgegangen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Gesamtstichprobenanalyse

Ziel dieser Arbeit war einerseits die Feststellung eines möglichen Zusammenhangs zwischen vier ausgewählten Genen und der Alzheimer-Erkrankung, andererseits wurde in einer weiteren Analyse nach möglichen Assoziationen der genetischen Variationen mit gedächtnisspezifischen Teilleistungen im CERAD und dem MMSE gesucht.

Bei den untersuchten Genen handelt es sich um HNRNPA2B1, HNRNPH3, PCBP2 und ELAVL4, die allesamt vorwiegend in der prä-mRNA Prozessierung eine maßgebliche Rolle spielen. 19 Marker in Form von SNPs, die innerhalb der unterschiedlichen Gene lokalisierbar sind, wurden auf eine Assoziation mit AD bzw. auf bestimmte phänotypische Teilleistungen hin untersucht.

Das untersuchte kaukasische Patientenkollektiv von insgesamt 323 Alzheimer-Patienten bestand aus 87 *early-onset* AD Patienten (41,38% Männer, 58,62% Frauen) und 236 *late-onset* AD Patienten (29,66% Männer, 70,34% Frauen). Weiterhin wurden die Marker an 677 kaukasischen und ca. gleichaltrigen Kontrollprobanden (58,05% Männer, 41,95% Frauen) genotypisiert, und hinsichtlich signifikanter Unterschiede im Vergleich zur Patientengruppe in Genotyp-, Allel- und Haplotypfrequenzen untersucht. Insgesamt überwiegt in den Patientengruppen das weibliche Geschlecht.

**Tab.5.1:** Übersicht Geschlechtsverteilung Gesamtstichprobe

	Männlich	Weiblich	n
<b>EOAD</b>	41,38%	58,62%	87
<b>LOAD</b>	29,66%	70,34%	236
<b>AD gesamt</b>	32,82%	67,18%	323
<b>Kontrollen</b>	58,05%	41,95%	677
<b>GESAMT</b>	499	501	1000

EOAD = Patienten mit *early-onset Alzheimer's Disease*; LOAD = Patienten mit *late-onset Alzheimer's Disease*; AD = *Alzheimer's Disease*

Zum Zeitpunkt der Testung waren die Kontrollprobanden im Mittel 60 (59,78) Jahre alt, während sich die Gesamtstichprobe der AD-Patienten um das 73. Lebensjahr gruppiert. Die Einteilung des Patientenkollektivs in *early-onset* und *late-onset* zeichnet sich deutlich im Altersunterschied ab: zum Zeitpunkt der Testung waren EOAD-Patienten im Mittel 62 Jahre, LOAD-Patienten hingegen 77 Jahre alt. Das Alter des jüngsten Kontrollprobanden war z. Z. der Testung 30 Jahre. Der jüngste EOAD-Patient war 35 Jahre alt, der jüngste LOAD zeigt sich hingegen vergleichsweise älter mit 67 Jahren. Das insgesamt untersuchte Altersintervall in der Gesamtstichprobe zieht sich demnach von 30 bis 92 Jahren.

**Tab.5.2:** Alter zum Zeitpunkt der Datenerhebung, Gesamtstichprobe

	Mittelwert	Minimum	Maximum	n
<b>Kontrollen</b>	59,78	30	79	677
<b>EOAD</b>	62,51	35	72	87
<b>LOAD</b>	77,43	67	92	236

AD = *Alzheimer's Disease*; EOAD = Patienten mit *early-onset Alzheimer's Disease*; LOAD = Patienten mit *late-onset Alzheimer's Disease*

Das Alter bei Krankheitsausbruch (*age at onset*) beträgt in der Gesamtstichprobe der untersuchten AD-Patienten 70 Jahre, wobei eine separate Betrachtung der beiden Patientengruppen sinnvoll ist: mit einer klaren Altersverschiebung beläuft sich das Durchschnittsalter der EOAD-Gruppe auf 58 Jahre, während sich das Mittel der LOAD-Gruppe auf 74 Jahren verschiebt.

Jeweils ein Drittel von den insgesamt 677 Kontrollprobanden ließ sich einem hohen, mittleren und niedrigeren Bildungsweg zuordnen (33,53% Abitur, 32,93% Realschulabschluss, 33,38% Hauptschulabschluss, 0,1% keine Information vorhanden), während von den Alzheimer-Patienten nur 15% das Abitur hatten und der Großteil mit 49,5% dem Hauptschulabschluss zuzuweisen war. Von 73 Alzheimerpatienten (22,6%) aus der Gesamtstichprobe ist der Bildungsweg unbekannt (Tabelle 5.3).

**Tab.5.3:** Verteilung des Bildungsniveaus

	<b>Hauptschule</b>	<b>Realschule</b>	<b>Abitur</b>	<b>n.a.</b>	<b>n</b>
<b>Kontrollen</b>	33,38%	32,93%	33,53%	0,10%	677
<b>EOAD</b>	49,42%	13,79%	17,24%	19,54%	87
<b>LOAD</b>	49,57%	11,44%	15,25%	23,72%	236
<b>AD gesamt</b>	49,53%	12,07%	15,78%	22,60%	323

AD = *Alzheimer's Disease*; EOAD = Patienten mit *early-onset Alzheimer's Disease*; LOAD = Patienten mit *late-onset Alzheimer's Disease*; n.a. = nicht angegeben

Da Träger bestimmter ApoE-Allelkombinationen mit einem erhöhten AD-Erkrankungsrisiko assoziiert werden, wurden alle Probanden auf ihre allelspezifische ApoE-Kombination untersucht (Tabelle 5.4). Tatsächlich konnte auch in dieser Stichprobe der Genotyp ApoE4/4 vergleichsweise häufig im Patientenkollektiv identifiziert werden (12,38% im Patientenkollektiv vs. 1,62% in der Probandengruppe), während mit 63% der Großteil der Probanden homozygote Träger des E3-Allels sind. Die E3/E3-Variante ist die verbreiteteste Allelkombination in der gesunden Bevölkerung. Die E2-Variante, der ein protektiver Effekt zugeschrieben wird, kam in der Patientengruppe in einem relativ geringen Prozentsatz vor, bei den gesunden Probanden fanden sich immerhin 11,67% mit der E2/E3-Kombination. Heterozygote Träger eines E4 Allels fanden sich auch in der Kontrollgruppe, wobei die Kombination E3/E4 mit 20,68% am häufigsten anzutreffen war. Insgesamt entsprechen diese Befunde den aktuellen Forschungsergebnissen und spiegeln das erhöhte Erkrankungsrisiko verbunden mit ApoEε4 wider.

**Tab.5.4:** ApoE-Allel-Verteilung Gesamtstichprobe

	<b>E2/E2</b>	<b>E2/E3</b>	<b>E2/E4</b>	<b>E3/E3</b>	<b>E3/E4</b>	<b>E4/E4</b>	<b>n</b>
<b>Kontrollen</b>	1,03%	11,67%	1,77%	63,22%	20,68%	1,62%	677
<b>EOAD</b>	2,29%	3,45%	3,45%	41,38%	34,48%	14,94%	87
<b>LOAD</b>	0,00%	1,69%	0,42%	38,13%	48,30%	11,44%	236
<b>AD gesamt</b>	0,62%	2,17%	1,24%	39,00%	44,58%	12,38%	323

AD = *Alzheimer's Disease*; EOAD = Patienten mit *early-onset Alzheimer's Disease*; LOAD = Patienten mit *late-onset Alzheimer's Disease*

Die ausgeführten Soziovariablen Alter, Schulbildung, Geschlecht sowie die ApoE-Allelverteilung wurden als Covariablen in die Berechnung integriert.

## 5.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Nach dem Hardy-Weinberg-Prinzip befindet sich eine genetische Population dann im idealen Gleichgewicht (*Hardy-Weinberg-Equilibrium* HWE), wenn sich die Häufigkeiten der Allele nicht verändern, sondern über die Generationen konstant bleiben. In diesem hypothetischen Konstrukt, das allein bei großer Individuenzahl gegeben ist, findet keine Evolution statt. Um die Allelfrequenz modellhaft zu erhalten sind des Weiteren alle Genotypen in ihrer Fortpflanzung gleich wahrscheinlich und erfolgreich (Panmixie), es gibt weder Selektion, noch Mutation, noch Migration. Im realen Kollektiv sind diese Bedingungen nicht gegeben, trotzdem lässt sich das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bei größeren Stichproben anwenden, um etwaige grobe Abweichungen von der erwarteten Verteilung festzustellen.

Die Genotypverteilung der vorliegenden Stichprobe wurde mit dem exakten Test nach Fisher auf das HWE geprüft und wies keine auffälligen Abweichungen auf (Tabelle 5.5 und Tabelle 5.6). Die Häufigkeit der Heterozygoten in der untersuchten Population war nie größer als 50%; die selteneren Allele (A1) kamen vorwiegend in heterozygoten Genotypen vor.

**Tab.5.5:** HWE der Gesamtstichprobe und Kontrollgruppe

SNP	A1	A2	HWE-Gesamt p-Wert	Gesamt (n)	HWE-Kontrollen p-Wert	Kontrollen (n)
ELAVL4 rs4412638	G	T	0,097	910	0,377	612
ELAVL4 rs12024093	A	G	0,736	948	0,798	642
ELAVL4 rs12043872	T	C	0,162	920	0,390	617
ELAVL4 rs3009113	C	T	0,483	956	0,452	649
ELAVL4 rs913858	A	G	0,841	906	1,000	609
HNRNPA2B1 rs12113404	G	A	0,258	947	0,373	644
HNRNPA2B1 rs12672536	C	T	0,123	921	0,809	622
HNRNPA2B1 rs4722589	C	A	0,718	973	1,000	659
HNRNPH3 rs10998072	C	T	0,072	970	0,286	654
HNRNPH3 rs10998076	G	A	0,179	942	0,060	637
HNRNPH3 rs1162757	T	C	0,111	963	0,292	653
HNRNPH3 rs16925347	C	G	0,437	913	0,160	616
HNRNPH3 rs1162756	A	T	1,000	957	0,673	643
PCBP2 rs1683152	C	T	0,492	946	0,349	635
PCBP2 rs784566	A	G	0,289	969	0,165	654
PCBP2 rs11170562	G	A	0,292	960	0,403	645
PCBP2 rs784563	G	T	0,161	899	0,625	605
PCBP2 rs2249381	G	A	0,847	970	0,274	655
PCBP2 rs1716966	T	C	0,521	969	0,241	655

A1 = Allel mit minorer Frequenz; A2 = Allel mit majorer Frequenz

**Tab.5.6:** HWE der Patientengruppe (Gesamt, EOAD und LOAD)

SNPs	A1	A2	HWE-ALZ p-Wert	ALZ (n)	HWE-EOAD p-Wert	EOAD (n)	HWE-LOAD p-Wert	LOAD (n)
ELAVL4 rs4412638	G	T	0,098	298	0,059	79	0,561	219
ELAVL4 rs12024093	A	G	0,164	306	0,589	82	0,310	224
ELAVL4 rs12043872	T	C	1,000	303	1,000	79	1,000	224
ELAVL4 rs3009113	C	T	0,019*	307	0,591	80	0,024*	227
ELAVL4 rs913858	A	G	0,618	297	0,506	79	1,000	218
HNRNPA2B1 rs12113404	G	A	0,302	303	0,039*	78	1,000	225
HNRNPA2B1 rs12672536	C	T	0,093	299	0,586	76	0,230	223
HNRNPA2B1 rs4722589	C	A	0,579	314	0,099	84	0,709	230
HNRNPH3 rs10998072	C	T	0,080	316	0,088	85	0,320	231
HNRNPH3 rs10998076	G	A	1,000	305	1,000	79	1,000	226
HNRNPH3 rs1162757	T	C	0,202	310	0,131	81	0,610	229
HNRNPH3 rs16925347	C	G	0,489	297	0,359	80	0,229	217
HNRNPH3 rs1162756	A	T	1,000	314	1,000	83	1,000	231
PCBP2 rs1683152	C	T	1,000	311	1,000	83	1,000	228
PCBP2 rs784566	A	G	1,000	315	1,000	84	1,000	231
PCBP2 rs11170562	G	A	0,606	315	0,340	84	1,000	231
PCBP2 rs784563	G	T	0,080	294	0,650	77	0,078	217
PCBP2 rs2249381	G	A	0,216	315	0,662	85	0,291	230
PCBP2 rs1716966	T	C	0,570	314	1,000	85	0,508	229

A1 = Allel mit minorer Frequenz; A2 = Allel mit majorer Frequenz; EOAD = Patienten mit *early-onset Alzheimer's Disease*; LOAD = Patienten mit *late-onset Alzheimer's Disease*; ALZ = Gesamtgruppe der Patienten mit Alzheimer Demenz; \* signifikante Abweichung

Bei einer Annahme von  $p=0,05$  lag die Genotypverteilung sowohl in der Kontrollgruppe, als auch im Patientenkollektiv demnach grundsätzlich im Gleichgewicht. Eine marginal auffallende Abweichung gab es allein bei den Patienten (Tabelle 5.6), die jedoch in diesem Fall nicht zum Ausschluss der SNPs führte.

### 5.3 Genotypverteilung

Die 19 SNPs wurden auf ihre Genotypverteilung in der Kontroll- sowie in der Patientengruppe (EOAD und LOAD) untersucht, um im Folgenden signifikante Genotyphäufungen in der untersuchten Population identifizieren zu können.

Eine Übersicht der Genotypverteilung der verschiedenen Gruppen (Patientengruppe/Kontrollgruppe (Tabelle 5.7), Patienten aufgeteilt in EOAD- und LOAD-Gruppe (Tabelle 5.8)) werden in folgenden Tabellen angeführt.

Die Genotypen ergeben sich hierbei grundsätzlich aus dem

- 1.) homozygoten Genotypen Allel 1 (Allel mit geringerer Frequenz), dem
- 2.) heterozygoten Genotypen Allel 1 und Allel 2 (Allel mit höherer Frequenz) sowie
- 3.) dem zweiten homozygoten Genotyp Allel 2. rs4412638

**Tab.5.7:** Genotypverteilung der Patientengruppe und der Kontrollgruppe

SNPs	A1/A1		A1/A2		A2/A2		ALZ (n)	KON (n)
	ALZ	KON	ALZ	KON	ALZ	KON		
ELAVL4 rs4412638	G/G		G/T		T/T			
	10	31	115	232	173	349	298	612
ELAVL4 rs12024093	A/A		A/G		G/G			
	3	24	83	196	220	422	306	642
ELAVL4 rs12043872	T/T		T/C		C/C			
	0	0	29	61	274	556	303	617
ELAVL4 rs3009113	C/C		C/T		T/T			
	41	87	116	314	150	248	307	649
ELAVL4 rs913858	A/A		A/G		G/G			
	13	25	107	196	177	388	297	609
HNRNPA2B1 rs12113404	G/G		G/A		A/A			
	4	8	48	110	251	526	303	644
HNRNPA2B1 rs12672536	C/C		C/T		T/T			
	0	4	59	107	240	511	299	622
HNRNPA2B1 rs4722589	C/C		C/A		A/A			
	5	5	62	108	247	546	314	659
HNRNPH3 rs10998072	C/C		C/T		T/T			
	4	6	39	92	273	556	316	654

SNPs	A1/A1		A1/A2		A2/A2		ALZ (n)	KON (n)
	ALZ	KON	ALZ	KON	ALZ	KON		
HNRNPH3 rs10998076	G/G		G/A		A/A			
	0	3	26	43	279	591	305	637
HNRNPH3 rs1162757	T/T		T/C		C/C			
	11	19	77	163	222	471	310	653
HNRNPH3 rs16925347	C/C		C/G		G/G			
	1	9	51	101	245	506	297	616
HNRNPH3 rs1162756	A/A		A/T		T/T			
	0	2	27	61	287	580	314	643
PCBP2 rs1683152	C/C		C/T		T/T			
	30	64	134	259	147	312	311	635
PCBP2 rs784566	A/A		A/G		G/G			
	30	68	136	261	149	325	315	654
PCBP2 rs11170562	G/G		G/A		A/A			
	35	65	133	264	147	316	315	645
PCBP2 rs784563	G/G		G/T		T/T			
	69	130	163	308	62	167	294	605
PCBP2 rs2249381	G/G		G/A		A/A			
	77	158	169	313	69	184	315	655
PCBP2 rs1716966	T/T		T/C		C/C			
	64	168	162	312	88	175	314	655

A1 = Allel mit minorer Frequenz; A2 = Allel mit majorer Frequenz; ALZ = Patienten mit Alzheimer Demenz; KON = Kontrollen

**Tab.5.8:** Genotypverteilung der EOAD- und LOAD-Gruppen

SNPs	A1/A1		A1/A2		A2/A2		EOAD (n)	LOAD (n)
	EOAD	LOAD	EOAD	LOAD	EOAD	LOAD		
ELAVL4 rs4412638	G/G		G/T		T/T			
	1	9	34	81	44	129	79	219
ELAVL4 rs12024093	A/A		A/G		G/G			
	0	3	19	64	63	157	82	224
ELAVL4 rs12043872	T/T		T/C		C/C			
	0	0	10	19	69	205	79	224
ELAVL4 rs3009113	C/C		C/T		T/T			
	8	33	31	85	41	109	80	227
ELAVL4 rs913858	A/A		A/G		G/G			
	2	11	28	79	49	128	79	218
HNRNPA2B1 rs12113404	G/G		G/A		A/A			
	3	1	11	37	64	187	78	225
HNRNPA2B1 rs12672536	C/C		C/T		T/T			
	0	0	17	42	59	181	76	223
HNRNPA2B1 rs4722589	C/C		C/A		A/A			
	4	1	18	44	62	185	84	230
HNRNPH3 rs10998072	C/C		C/T		T/T			
	2	2	10	29	73	200	85	231
HNRNPH3 rs10998076	G/G		G/A		A/A			
	0	0	6	20	73	206	79	226
HNRNPH3 rs1162757	T/T		T/C		C/C			
	5	6	20	57	56	166	81	229
HNRNPH3 rs16925347	C/C		C/G		G/G			
	1	0	10	41	69	176	80	217
HNRNPH3 rs1162756	A/A		A/T		T/T			
	0	0	7	20	76	211	83	231
PCBP2 rs1683152	C/C		C/T		T/T			
	8	22	37	97	38	109	83	228
PCBP2 rs784566	A/A		A/G		G/G			
	9	21	38	98	37	112	84	231

SNPs	A1/A1		A1/A2		A2/A2		EOAD (n)	LOAD (n)
	EOAD	LOAD	EOAD	LOAD	EOAD	LOAD		
PCBP2 rs11170562	G/G		G/A		A/A			
	12	23	34	99	38	109	84	231
PCBP2 rs784563	G/G		G/T		T/T			
	20	49	41	122	16	46	77	217
PCBP2 rs2249381	G/G		G/A		A/A			
	24	53	45	124	16	53	85	230
PCBP2 rs1716966	T/T		T/C		C/C			
	16	48	42	120	27	61	85	229

A1 = Allel mit minorer Frequenz; A2 = Allel mit majorer Frequenz; EOAD = Patienten mit *early-onset Alzheimer's Disease*; LOAD = Patienten mit *late-onset Alzheimer's Disease*

## 5.4 Einzel-SNP-Analyse im Hinblick auf eine Assoziation mit der Alzheimer Demenz

### 5.4.1 Allel- und Genotypverteilung in der Gruppe der Alzheimer Patienten

Um signifikante Abweichungen in der Genotypverteilung zwischen Patienten und Kontrollen festzustellen, wurde in einem ersten Schritt die genaue Genotypverteilung (homozygot A1/A1, heterozygot A1/A2 und homozygot A2/A2) verglichen und statistisch ausgewertet. Dazu wurden die drei möglichen Allelkombinationen der 19 SNPs im Patientenkollektiv der Kontrollgruppe gegenübergestellt.

Signifikante Unterschiede in der Genotypfrequenz zwischen Patienten und Kontrollen fanden sich an zwei SNPs, die jeweils dem ELAVL4-Gen zugeordnet werden: rs12024093 ( $p=0,019$ ) und rs3009113 ( $p=0,004$ ). Bei rs2249381 auf PCBP2 ließ sich mit einem  $p$ -Wert von 0,099 ein Trend zu einer Assoziation feststellen (Tabelle 5.9).

**Tab.5.9:** Alzheimer Patienten vs. Kontrollen

SNP	Genotyp p-Wert	Dominantes Modell p-Wert	Rezessives Modell p-Wert	Allelverteilung p-Wert
ELAVL4 rs4412638	0,542	0,776	0,307	0,556
ELAVL4 rs12024093	<b>0,019**</b>	0,063*	<b>0,020**</b>	<b>0,017**</b>
ELAVL4 rs12043872	0,907	0,907	1,000	1,000
ELAVL4 rs3009113	<b>0,004**</b>	<b>0,002**</b>	1,000	<b>0,025**</b>
ELAVL4 rs913858	0,482	0,243	0,861	0,296
HNRNPA2B1 rs12113404	0,881	0,717	1,000	0,739
HNRNPA2B1 rs12672536	0,313	0,526	0,310	0,671
HNRNPA2B1 rs4722589	0,186	0,133	0,307	0,086*
HNRNPH3 rs10998072	0,640	0,627	0,736	0,719
HNRNPH3 rs10998076	0,369	0,513	0,555	0,706
HNRNPH3 rs1162757	0,869	0,878	0,692	0,737
HNRNPH3 rs16925347	0,329	0,927	0,180	0,669
HNRNPH3 rs1162756	0,751	0,628	1,000	0,497
PCBP2 rs1683152	0,807	0,494	0,908	0,751
PCBP2 rs784566	0,631	0,494	0,734	0,752
PCBP2 rs11170562	0,755	0,536	0,653	0,463
PCBP2 rs784563	0,109	<b>0,041**</b>	0,495	0,097*
PCBP2 rs2249381	0,099*	<b>0,042**</b>	0,936	0,191
PCBP2 rs1716966	0,195	0,700	0,077*	0,190

\*\*Signifikanz; \*Trend; dominantes Modell = A1A1 + A1A2 vs. A2A2; rezessives Modell = A1A2 + A2A2 vs. A1A1

Tritt ein Allel signifikant gehäuft im Patientenkollektiv auf, kann dies für eine mögliche Assoziation des Markers mit der Erkrankung sprechen. Um eine exaktere Interpretation der Genotypfrequenzen zu ermöglichen, wurden in einem ersten Schritt alle homo- bzw. heterozygoten A1-Träger (A1/A1 und A1/A2) den Nicht-A1-Trägern (und demnach homozygoten A2/A2-Trägern) gegenübergestellt (dominantes Modell, Tabelle 5.9). Allel 1 (A1) kommt im Vergleich zu Allel 2 (A2) mit minorer Frequenz in der untersuchten Stichprobe seltener vor.

Beim Vergleich der homozygoten Träger des dominanten Allels (A1) mit dem Rest, zeigten sich dabei signifikante Assoziationen in der Verteilungsfrequenz zwischen A1-Trägern und Nicht-A1-Trägern in jeweils drei SNPs (rs3009113, rs784563, rs2249381). Ein Weiterer zeigte einen Trend zur Assoziation (rs12024093).

Bei rs3009113 auf ELAVL4 wiesen die Gesunden eine höhere Zahl an A1-Trägern auf (61,79%) während die Verteilung zwischen den beiden Allelgruppen im Patientenkollektiv ausgeglichene 51,14% zu 48,86% betrug (Tabelle 5.10). Bei den beiden PCBP2-SNPs rs784563 und rs2249381 wurde jeweils eine signifikante Häufung zugunsten der G-Allel-Träger im Patientenkollektiv festgestellt. Bei diesen drei SNPs überwog demnach in der Gesamtstichprobe der Genotyp A1/A1 bzw. A1/A2 (Tabelle 5.10).

**Tab. 5.10:** Prozentualer Anteil bei  $p < 0,05$  im dominanten Modell (A1- vs. Nicht-A1-Träger)

SNP	Gruppe	A1	A1-Träger (%)	A2	Nicht-A1-Träger (%)	n	p-Wert
ELAVL4 rs3009113	Patienten	C	157 (51,14)	T	150 (48,86)	307	0,002
	Kontrollen		401 (61,79)		248 (38,21)	649	
	Gesamt		558 (58,37)		398 (41,63)	956	
PCBP2 rs784563	Patienten	G	232 (78,91)	T	62 (21,09)	294	0,041
	Kontrollen		438 (72,40)		167 (27,60)	605	
	Gesamt		670 (74,53)		229 (25,47)	899	
PCBP2 rs2249381	Patienten	G	246 (78,09)	A	69 (21,90)	315	0,042
	Kontrollen		471 (71,91)		184 (28,09)	655	
	Gesamt		717 (73,92)		253 (26,08)	970	

A1 = Allel mit minorer Frequenz; A2 = Allel mit majorer Frequenz; n = Gesamtanzahl (100%)

Analog dazu wurde in einem zweiten Schritt der A2-Genotyp (homozygot A2/A2 und heterozygot A1/A2) dem Rest (homozygot A1/A1, rezessives Modell) gegenübergestellt und auf seine Verteilungshäufigkeit überprüft (Tabelle 5.9).

Dabei zeichnete sich bei rs12024093 auf ELAVL4 eine Signifikanz mit einem prozentualen Anteil von 97,15% der G-Allel-Träger in der Gesamtstichprobe aus (Tabelle 5.11), wobei in der untersuchten Patientengruppe 99% A2-Allele besitzen, während sich im gesunden Kollektiv 96% A2-Träger befanden.

**Tab.5.11:** Prozentualer Anteil bei  $p < 0.05$  im rezessiven Modell (A2- vs. Nicht-A2-Träger)

<b>SNP</b>	<b>Gruppe</b>	<b>A2</b>	<b>A2-Träger (%)</b>	<b>A1</b>	<b>Nicht-A2-Träger (%)</b>	<b>n</b>	<b>p-Wert</b>
<b>ELAVL4 rs12024093</b>	Patienten	G	303 (99,01)	A	3 (0,98)	306	<b>0,020</b>
	Kontrollen		618 (96,26)		24 (3,85)	642	
	Gesamt		921 (97,15)		27 (2,85)	948	

A1 = Allel mit minorer Frequenz; A2 = Allel mit majorer Frequenz; n = Gesamtanzahl (100%)

Bei zwei SNPs konnte ein signifikanter Unterschied in der Allelhäufigkeit zwischen den Patienten und den gesunden Probanden festgestellt werden. Prozentual gesehen überwog sowohl bei rs12024093 (ELAVL4) als auch bei rs3009113 (ELAVL4) jeweils das A2-Allel. Dabei zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede: während bei rs12024093 fünf Prozent mehr Patienten im Vergleich zu den Gesunden A2-Träger sind, überwogen bei rs3009113 die A2-Träger mit 27% im Kontrollkollektiv verglichen zu den Patienten (Tabelle 5.12).

**Tab.5.12:** Prozentualer Anteil der Allelverteilung bei  $p < 0.05$ 

<b>SNP</b>	<b>Gruppe</b>	<b>A1 (%)</b>	<b>A2 (%)</b>	<b>n</b>	<b>p-Wert</b>
<b>ELAVL4 rs12024093</b>	Patienten	89 (14,54)	523 (85,56)	612	<b>0,017</b>
	Kontrollen	244 (19,55)	1040 (80,99)	1284	
	Gesamt	333 (17,56)	1563 (82,44)	1896	
<b>ELAVL4 rs3009113</b>	Patienten	198 (32,25)	416 (67,75)	614	<b>0,025</b>
	Kontrollen	61 (4,94)	1173 (95,06)	1234	
	Gesamt	259 (14,02)	1589 (85,98)	1848	

A1 = Allel mit minorer Frequenz; A2 = Allel mit majorer Frequenz; n = Gesamtanzahl (100%)

#### 5.4.2 Allel- und Genotypverteilung in der EOAD- und LOAD-Gruppe

Eine inhaltlich differenziertere Interpretation der Resultate lässt die Aufspaltung des Patientenkollektivs in EOAD und LOAD zu. Die beschriebenen Schritte zu Analyse der Genotypverteilung wurden separat für beide Gruppen der Patienten mit frühem bzw. spätem Beginn der AD wiederholt. Erneut wurden zum einen alle homo- bzw. heterozygoten A1-Träger (A1/A1 und A1/A2) den Nicht-A1-Trägern gegenübergestellt, zum anderen wurde der homozygote Genotyp A1/A1 der A2-Gruppe gegenübergestellt (Tabelle 5.13 und 5.14).

**Tab.5.13: Early-onset Alzheimer Patienten (EOAD) vs. Kontrollen**

SNP	Genotyp p-Wert	Dominantes Modell p-Wert	Rezessives Modell p-Wert	Allelverteilung p-Wert
ELAVL4 rs4412638	0,275	0,904	0,161	0,767
ELAVL4 rs12024093	0,051*	<b>0,046**</b>	0,097*	<b>0,018**</b>
ELAVL4 rs12043872	0,431	0,431	1,000	0,442
ELAVL4 rs3009113	0,088*	<b>0,029**</b>	0,483	0,045
ELAVL4 rs913858	0,779	0,804	0,758	1,000
HNRNPA2B1 rs12113404	0,169	1,000	0,106	0,670
HNRNPA2B1 rs12672536	0,540	0,347	1,000	0,462
HNRNPA2B1 rs4722589	<b>0,008**</b>	0,051*	<b>0,012**</b>	<b>0,012**</b>
HNRNPH3 rs10998072	0,324	1,000	0,232	0,881
HNRNPH3 rs10998076	0,868	0,820	1,000	1,000
HNRNPH3 rs1162757	0,285	0,601	0,172	0,304
HNRNPH3 rs16925347	0,703	0,434	1,000	0,472
HNRNPH3 rs1162756	1,000	0,844	1,000	0,849
PCBP2 rs1683152	0,808	0,641	1,000	0,721
PCBP2 rs784566	0,588	0,355	0,851	0,425
PCBP2 rs11170562	0,458	0,563	0,256	0,289
PCBP2 rs784563	0,387	0,222	0,382	0,199
PCBP2 rs2249381	0,183	0,091*	0,423	0,104
PCBP2 rs1716966	0,333	0,365	0,185	0,166

\*\*Signifikanz; \*Trend; dominantes Modell = A1A1 + A1A2 vs. A2A2; rezessives Modell = A1A2 + A2A2 vs. A1A1

Bei der separaten Betrachtung der Genotypverteilung des in EOAD und LOAD aufgeteilten Patientenkollektivs, zeigt in der EOAD-Gruppe rs4722589 auf HNRNPA2B1 eine signifikante Abweichung bei einem p-Wert von 0,008. Zwei weitere SNPs (rs12024093 und rs3009113) auf dem ELAVL4-Gen zeigten einen Trend auf.

Im Genotypvergleich der LOAD-Gruppe mit den gesunden Probanden ergab sich eine weitere Assoziation des SNPs rs3009113 (ELAVL4) bei einem p-Wert von 0,013 (Tabelle 5.14).

**Tab.5.14:** Late-onset Alzheimer Patienten (LOAD) vs. Kontrollen

SNP	Genotyp p-Wert	Dominantes Modell p-Wert	Rezessives Modell p-Wert	Allelverteilung p-Wert
ELAVL4 rs4412638	0,834	0,691	0,713	0,600
ELAVL4 rs12024093	0,149	0,249	0,115	0,117
ELAVL4 rs12043872	0,597	0,597	1,000	0,606
ELAVL4 rs3009113	<b>0,013**</b>	<b>0,012**</b>	0,655	0,101
ELAVL4 rs913858	0,406	0,194	0,564	0,193
HNRNPA2B1 rs12113404	0,677	0,687	0,460	0,515
HNRNPA2B1 rs12672536	0,593	0,761	0,578	0,924
HNRNPA2B1 rs4722589	0,600	0,424	1,000	0,513
HNRNPH3 rs10998072	0,893	0,590	1,000	0,614
HNRNPH3 rs10998076	0,390	0,466	0,571	0,578
HNRNPH3 rs1162757	1,000	0,932	1,000	0,940
HNRNPH3 rs16925347	0,156	0,759	0,122	1,000
HNRNPH3 rs1162756	0,887	0,695	1,000	0,615
PCBP2 rs1683152	0,893	0,758	0,898	0,859
PCBP2 rs784566	0,760	0,760	0,613	1,000
PCBP2 rs11170562	0,877	0,646	1,000	0,769
PCBP2 rs784563	0,169	0,071*	0,774	0,198
PCBP2 rs2249381	0,226	0,142	0,788	0,481
PCBP2 rs1716966	0,320	1,000	0,180	0,416

\*\*Signifikanz; \*Trend; dominantes Modell = A1A1 + A1A2 vs. A2A2; rezessives Modell = A1A2 + A2A2 vs. A1A1

Während sich in der Gruppe der A1-Träger vs. A2/A2 (dominantes Modell) sowohl in der EOAD als auch in der LOAD-Gruppe signifikante Unterschiede präsentierten, zeigte sich in der zweiten Gruppe (A2 vs. A1/A1 = rezessives Modell) allein

rs4722589 in der EOAD Gruppe mit einem p-Wert von 0,012 auffällig. Zudem wies rs12024093 auf ELAVL4 einen Trend auf und kam häufiger in der homozygoten A2/A2 Variante vor. Bei rs3009113 (ELAVL4) kam sowohl im EOAD- als auch im LOAD-Kollektiv ebenfalls die A2/A2 Variante im Vergleich häufiger vor. Bei rs4722589 (HNRNPA2B1) in der EOAD-Gruppe wiederum ließ sich feststellen, dass Nicht-A2-Träger bei den Kontrollen fast nie vorkommen (0,76%), während sie bei den Patienten mit 4,76% vertreten sind (Tabelle 5.15).

**Tab.5.15:** Prozentualer Anteil bei p <0,05 im dominanten und rezessiven Modell

SNP	Gruppe	A1	A1-Träger (%)	A2	Nicht-A1-Träger (%)	n	p-Wert
ELAVL4 rs12024093	Patienten EOAD	A	19 (23,17)	G	63 (76,83)	82	0,046
	Kontrollen		229 (34,27)		422 (65,73)	642	
	Gesamt		339 (33,01)		485 (66,99)	724	
ELAVL4 rs3009113	Patienten EOAD	C	39 (48,75)	T	41 (51,25)	80	0,029
	Kontrollen		401 (61,79)		248 (38,21)	649	
	Gesamt		440 (60,69)		289 (39,38)	725	
ELAVL4 rs3009113	Patienten LOAD	C	118 (51,98)	T	109 (48,02)	227	0,012
	Kontrollen		401 (61,79)		248 (38,21)	649	
	Gesamt		519 (59,25)		357 (40,75)	876	
SNP	Gruppe	A2	A2-Träger (%)	A1	Nicht-A2-Träger (%)	n	p-Wert
HNRNPA2B1 rs4722589	Patienten EOAD	A	80 (95,24)	C	4 (4,76)	84	0,012
	Kontrollen		654 (97,87)		5 (0,76)	659	
	Gesamt		734 (98,79)		9 (1,21)	743	

A1 = Allel mit minorer Frequenz; A2 = Allel mit majorer Frequenz; n = Gesamtanzahl (100%)

Die absolute Allelverteilung zeigte sich bei zwei SNPs in der EOAD-Gruppe auffällig (Tabelle 5.15). Die häufigeren A2-Allele zeigten sich dabei bei rs12024093 (ELAVL4) mit rund 7% häufiger im Patientenkollektiv verglichen mit den Kontrollen. Bei rs4722589 (HNRNPA2B1) überwog das A-Allel mit 15% in der Patientengruppe, während nur 8,9% der Kontrollen C-Träger waren (Tabelle 5.16). In der LOAD-Gruppe konnte weder ein Trend-, noch ein Signifikanzniveau erreicht werden.

**Tab.5.16:** Prozentualer Anteil der Allelverteilung bei  $p < 0.05$  im EOAD-Kollektiv

SNP	Gruppe	A1 (%)	A2 (%)	n	p-Wert
ELAVL4 rs12024093	Patienten EOAD	19 (11,59)	145 (88,41)	164	0,018
	Kontrollen	244 (19,00)	1040 (80,99)	1284	
	Gesamt	263 (18,16)	1185 (81,84)	1448	
HNRNPA2B1 rs4722589	Patienten EOAD	26 (15,48)	142 (84,52)	168	0,012
	Kontrollen	118 (8,95)	1200 (91,05)	1318	
	Gesamt	144 (9,69)	1342 (90,31)	1486	

A1 = Allel mit minorer Frequenz; A2 = Allel mit majorer Frequenz; n = Gesamtanzahl (100%)

## 5.5 Assoziation der Polymorphismen mit Subtests der CERAD und dem MMSE

Neben einer grundsätzlichen Assoziation mit der Alzheimer Erkrankung war das Ziel dieser Studie die Feststellung eines möglichen Zusammenhangs zwischen den Genotypen der untersuchten SNPs und bestimmten kognitiven Parametern.

Dazu wurde mit den 323 Alzheimerpatienten und 677 Kontrollprobanden eine strukturierte Testbatterie zur Erfassung der kognitiven Domänen bzw. der defizitären Ausfälle im Rahmen der AD durchgeführt. Die Assoziation zwischen den Genotypfrequenzen und den neuropsychologischen Tests im MMSE und den Subtests der CERAD-Batterie (*Boston Naming* Test, Wortliste lernen (abrufen) und wiedererkennen), wurden mittels multipler linearer Regression bestimmt. Die CERAD-Batterie wurde ausschließlich mit den Patienten durchgeführt. Alter, Geschlecht, Bildungsgrad, sowie ApoE-Genotyp gingen als Kovariablen in die Berechnung mit ein.

In einem ersten Schritt wurden die Genotypen zwischen den Gruppen mit der jeweiligen Punktewertung verglichen. Um zu bestimmen, ob ein bestimmtes Allel einen signifikanten Einfluss auf den Punktewert hatte, wurden in weiteren Berechnungen jeweils die Träger des minoren Allels (A1) mit den homozygoten Trägern des häufigeren Allels (A2) verglichen. Analog dazu, wurden die Träger des häufigeren Allels A2 den homozygoten A1-Trägern gegenübergestellt.

## 5.5.1 MMSE

### a) Patienten mit Alzheimer Demenz (EOAD und LOAD)

In der Gesamtgruppe der Alzheimerpatienten (EOAD und LOAD) zeigten sich bei vier SNPs des PCBP2-Gens unterschiedliche Leistungen zwischen den Genotypen (Tabelle 5.17). Bei rs1683152, rs784566 und rs11170562 war eine bessere Leistung bei den homozygoten A2-Trägern zu beobachten, während homozygote A1-Träger jeweils das schlechteste Ergebnis erzielten. Dabei lag zwischen den homozygoten Genotypen eine durchschnittliche Differenz von rund 4 Punkten. Umgekehrt verhielt es sich einzig bei rs1716966: homozygote Träger des Effektallels (Allel mit minorer Frequenz) A1 erzielten ein im Schnitt um 2 Punkte besseres Ergebnis. Damit deuten die untersuchten Polymorphismen auf dem PCBP2-Gen auf eine Assoziation der Genotypverteilung mit den erreichten Punkten beim MMSE hin: Außer bei rs1716966 schnitten A2-Träger im Durchschnitt besser ab. Dies wurde bereits bei der Analyse des additiven Modells augenscheinlich, und verdeutlichte sich nochmals beim Vergleich der Allelträger im dominanten bzw. rezessiven Modell, wobei das A2-Allel der drei SNPs rs1683152, rs784566 und rs11170562 jeweils mit einer höheren Punktewertung assoziierbar war (Abbildung 5.1).

**Tab.5.17:** MMSE Gesamtgruppe Patienten

SNP	A1	A2	MW (SE) A1/A1	MW (SE) A1/A2	MW (SE) A2/A2	ADD p-Wert	REZ p-Wert	DOM p-Wert
rs1683152 <b>PCBP2</b>	C	T	16,871 (0,962)	18,690 (0,477)	20,509 (0,573)	<b>0,003**</b>	<b>0,014**</b>	<b>0,016**</b>
rs784566 <b>PCBP2</b>	A	G	16,820 (0,972)	18,637 (0,482)	20,453 (0,577)	<b>0,002**</b>	<b>0,021**</b>	<b>0,009**</b>
rs11170562 <b>PCBP2</b>	G	A	16,786 (0,926)	18,704 (0,463)	20,623 (0,571)	<b>0,002**</b>	<b>0,006**</b>	<b>0,013**</b>
rs1716966 <b>PCBP2</b>	T	C	20,749 (0,761)	19,531 (0,419)	18,313 (0,706)	<b>0,031**</b>	-	<b>0,027**</b>
rs12113404 <b>HNRNPA2B1</b>	G	A	16,134 (1,878)	17,99 (0,928)	19,846 (0,463)	0,057*	-	<b>0,024**</b>
rs12672536 <b>HNRNPA2B1</b>	C	T	13,449 (2,099)	16,78 (1,020)	20,114 (0,475)	<b>0,004**</b>	n.a.	<b>0,004**</b>

MW = adjustierter Mittelwert (additives Modell); SE = Standardfehler; A1 = Allel mit niedrigerer Frequenz; A2 = Allel mit höherer Frequenz; \*\* = Signifikanz; \* = Trend; - = weder Trend- noch Signifikanzniveau erreicht; REZ = rezessives Modell (A1/A1 vs. A1/A2 & A2/A2); DOM = dominantes Modell (A2/A2 vs. A1/A2 und A1/A1); ADD = additives Modell (A1/A1 vs. A2/A2 vs. A1/A2)

Zwei weitere SNPs auf dem HNRNPA2B1-Gen konnten im Vergleich mit einer besseren Leistung der heterozygoten A2-Träger assoziiert werden: rs12113404 und rs12672536 zeigten jeweils eine bessere Leistung im A2-Kollektiv.

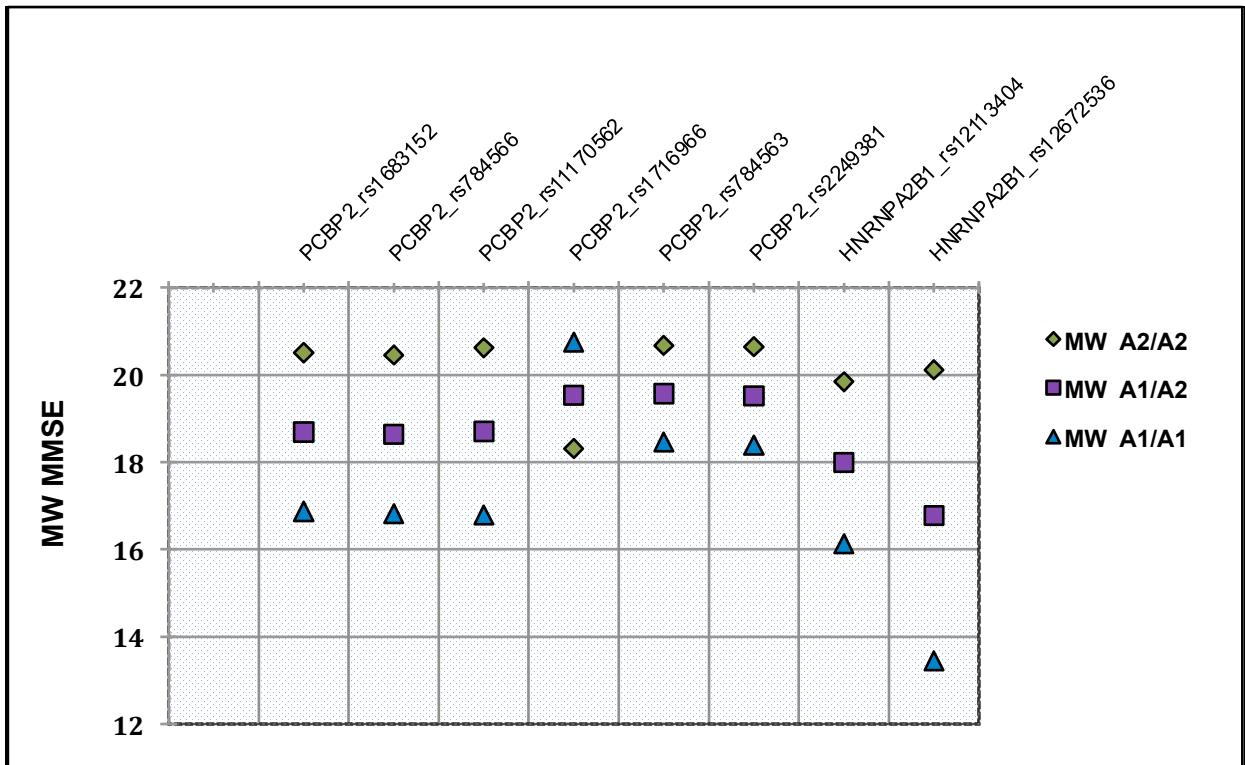


Abbildung 5.1: Adjustierte Mittelwerte (MW) MMSE

### 5.5.2 Boston Naming Test (CERAD)

#### a) Patienten mit Alzheimer Demenz (EOAD und LOAD)

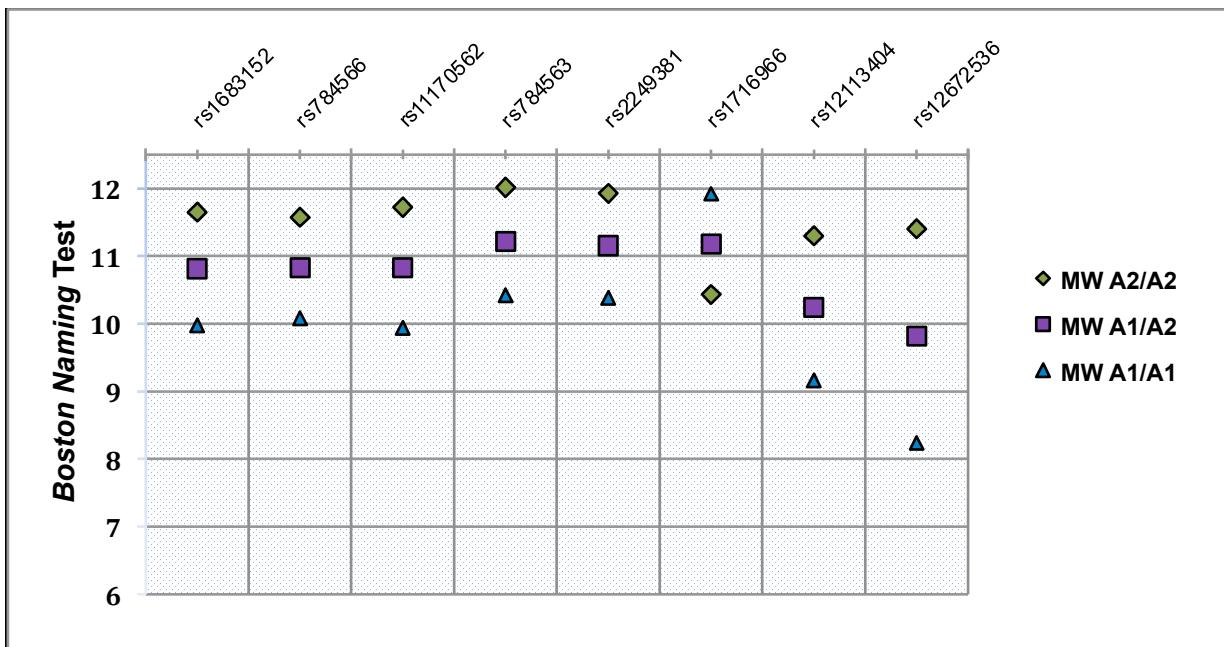
Beim *Boston Naming Test* zeigten sich in der Assoziation der kognitiven Leistung mit der Genotypverteilung im additiven Modell alle 6 SNPs auf dem PCBP2-Gen auffällig (Tabelle 5.18).

**Tab.5.18: Boston Naming Test Gesamtgruppe Patienten**

SNP	A1	A2	MW (SE) A1/A1	MW (SE) A1/A2	MW (SE) A2/A2	ADD p-Wert	REZ p-Wert	DOM p-Wert
rs1683152 <b>PCBP2</b>	C	T	9,981 (0,543)	10,815 (0,269)	11,650 (0,326)	<b>0,019**</b>	<b>0,046**</b>	0,059*
rs784566 <b>PCBP2</b>	A	G	10,079 (0,542)	10,827 (0,268)	11,576 (0,323)	<b>0,035**</b>	<b>0,047**</b>	-
rs11170562 <b>PCBP2</b>	G	A	9,937 (0,525)	10,830 (0,262)	11,723 (0,325)	<b>0,011**</b>	<b>0,017**</b>	0,054*
rs784563 <b>PCBP2</b>	G	T	10,423 (0,420)	11,219 (0,236)	12,016 (0,431)	<b>0,025**</b>	<b>0,041**</b>	-
rs2249381 <b>PCBP2</b>	G	A	10,383 (0,409)	11,155 (0,233)	11,927 (0,419)	<b>0,024**</b>	0,090*	0,051*
rs1716966 <b>PCBP2</b>	T	C	11,922 (0,428)	11,178 (0,235)	10,434 (0,397)	<b>0,029**</b>	<b>0,033**</b>	-
rs12113404 <b>HNRNPA2B1</b>	G	A	9,167 (1,035)	10,24 (0,511)	11,302 (0,256)	0,058*	-	<b>0,011**</b>
rs12672536 <b>HNRNPA2B1</b>	C	T	8,240 (1,146)	9,82 (0,557)	11,404 (0,261)	<b>0,009**</b>	n.a.	<b>0,009**</b>

MW = adjustierter Mittelwert (additives Modell); SE = Standardfehler; A1 = Allel mit niedrigerer Frequenz; A2 = Allel mit höherer Frequenz; \*\* = Signifikanz; \* = Trend; - = weder Trend- noch Signifikanzniveau erreicht; REZ = rezessives Modell (A1/A1 vs. A1/A2 & A2/A2); DOM = dominantes Modell (A2/A2 vs. A1/A2 und A1/A1); ADD = additives Modell (A1/A1 vs. A2/A2 vs. A1/A2)

Bei rs1683152, rs784566, rs11170562, rs784563 und rs2249381 war bei homozygoten A1-Trägern jeweils die schlechtere Leistung zu beobachten. Heterozygote Träger schnitten im Vergleich besser als homozygote A1-Träger, aber schlechter als homozygote A2-Träger ab. Bei rs1716966 ging der Trend in die umgekehrte Richtung: Träger des weniger häufigen C-Allels schnitten durchschnittlich schlechter beim *Boston Naming Test* ab (Abbildung 5.2). Es konnten keine weiteren Assoziationen der Polymorphismen auf den anderen Genen festgestellt werden.



**Abbildung 5.2:** Adjustierte Mittelwerte (MW) im *Boston Naming Test*

### b) EOAD

Bei der Gruppe der jüngeren EOAD-Patienten wiederholten sich teilweise die Ergebnisse der Gesamtgruppe: rs11170562, rs2249381 und rs1716966 (alle drei auf PCBP2) zeigten signifikante Abweichungen im konfrontativen Benennen zwischen den Genotypen, wobei bei rs1716966 im Gegensatz zur Gesamtgruppenanalyse die homozygoten T-Träger am schlechtesten abschnitten (Tabelle 5.19). Bei rs1683152 ließ sich ein Trend feststellen ( $p = 0,048$ ). Ein weiterer SNP auf ELAVL4 (rs913858) zeigte im rezessiven Modell eine signifikante Abweichung ( $p = 0,017$ ).

**Tab.5.19:** *Boston Naming Test* EOAD

SNP	A1	A2	MW (SE) A1/A1	MW (SE) A1/A2	MW (SE) A2/A2	ADD p-Wert	REZ p-Wert	DOM p-Wert
rs913858 <b>ELAVL4</b>	A	G	11,231 (1,218)	11,238 (0,593)	11,246 (0,677)	-	<b>0,017**</b>	-
rs11170562 <b>PCBP2</b>	G	A	9,040 (1,089)	10,48 (0,534)	11,925 (0,757)	<b>0,025**</b>	<b>0,032**</b>	-
rs2249381 <b>PCBP2</b>	G	A	9,880 (0,877)	11,308 (0,520)	12,736 (1,017)	<b>0,037**</b>		0,056*
rs1716966 <b>PCBP2</b>	T	C	9,668 (0,778)	11,186 (0,506)	12,703 (0,990)	<b>0,048**</b>	0,073*	-

MW = adjustierter Mittelwerte (additives Modell); SE = Standardfehler; A1 = Allel mit niedrigerer Frequenz; A2 = Allel mit höherer Frequenz; \*\* =Signifikanz; \* = Trend; - = weder Trend- noch Signifikanzniveau erreicht; REZ = rezessives Modell (A1/A1 vs. A1/A2 & A2/A2); DOM = dominantes Modell (A2/A2 vs. A1/A2 und A1/A1); ADD = additives Modell (A1/A1 vs. A2/A2 vs. A1/A2)

### c) LOAD

Im Genotypvergleich der LOAD-Gruppe ließ sich im dominanten, sowie im additiven Modell, bei zwei SNPs (rs12113404 und rs12672536) des HNRNPA2B1-Gens das jeweilige A2-Allel mit einer besseren Performance im *Boston Naming Test* assoziieren (Tabelle 5.20). Auf den weiteren Genen konnte kein Polymorphismus mit einer abweichenden Leistung im *Boston Naming Test* assoziiert werden.

**Tab.5.20:** *Boston Naming Test* LOAD

SNP	A1	A2	MW (SE) A1/A1	MW (SE) A1/A2	MW (SE) A2/A2	ADD p-Wert	REZ p-Wert	DOM p-Wert
rs12113404 <b>HNRNPA2B1</b>	G	A	8,119 (1,289)	9,795 (0,632)	11,470 (0,282)	<b>0,018**</b>	-	<b>0,010**</b>
rs12672536 <b>HNRNPA2B1</b>	C	T	8,159 (1,304)	9,836 (0,635)	11,514 (0,286)	<b>0,017**</b>	n.a.	<b>0,017**</b>

MW = adjustierter Mittelwert (additives Modell); SE = Standardfehler; A1 = Allel mit niedrigerer Frequenz; A2 = Allel mit höherer Frequenz; \*\* = Signifikanz; \* = Trend; - = weder Trend- noch Signifikanzniveau erreicht; n.a. = nicht angegeben; REZ = rezessives Modell (A1/A1 vs. A1/A2 & A2/A2); DOM = dominantes Modell (A2/A2 vs. A1/A2 und A1/A1); ADD = additives Modell (A1/A1 vs. A2/A2 vs. A1/A2)

### 5.5.3 Wortliste Gedächtnis

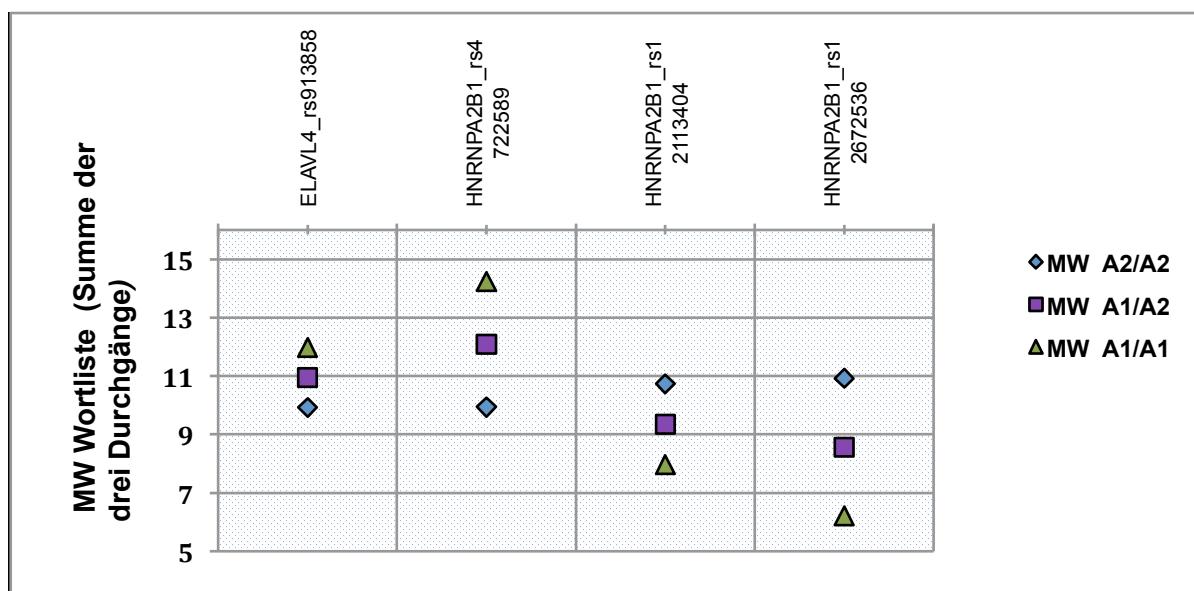
#### a) Patienten mit Alzheimer Demenz (EOAD und LOAD)

Im Gesamtergebnis der drei Lerndurchgänge bei der Wortliste konnten bei zwei SNPs auf ELAVL4 und HNRNPA2B1 signifikante Assoziationen zwischen Genotyp und Gedächtnisleistung festgestellt werden. Bei einem weiterem SNP (rs11170562, PCBP2) fand sich eine tendenzielle Verbesserung der Leistung bei homozygoten G-Trägern (A1) bei einem p-Wert von 0,081. In der Analyse der Allele ließen sich weiterhin bei rs12113404 und rs12672536 die jeweiligen A2-Allele mit einer überzeugend besseren Gedächtnisleistung assoziieren (Tabelle 5.21 und Abbildung 5.3).

**Tab.5.21:** Wortliste Gesamtergebnis Gesamtgruppe Patienten

SNP	A1	A2	MW (SE) A1/A1	MW (SE) A1/A2	MW (SE) A2/A2	ADD p-Wert	REZ p-Wert	DOM p-Wert
rs913858 <b>ELAVL4</b>	A	G	11,978 (1,037)	10,951 (0,500)	9,924 (0,433)	0,088*	<b>0,037**</b>	-
rs4722589 <b>HNRNPA2B1</b>	C	A	14,226 (1,296)	12,086 (0,632)	9,946 (0,379)	<b>0,003**</b>	0,069*	<b>0,007**</b>
rs12113404 <b>HNRNPA2B1</b>	G	A	7,968 (1,510)	9,348 (0,746)	10,729 (0,372)	0,064*	-	<b>0,017**</b>
rs12672536 <b>HNRNPA2B1</b>	C	T	6,214 (1,706)	8,566 (0,829)	10,918 (0,385)	<b>0,006**</b>	n.a.	<b>0,006**</b>

MW = adjustierter Mittelwert (additives Modell); SE = Standardfehler; A1 = Allel mit niedrigerer Frequenz; A2 = Allel mit höherer Frequenz; \*\* = Signifikanz; \* = Trend; - = weder Trend- noch Signifikanzniveau erreicht; n.a. = nicht angegeben; REZ = rezessives Modell (A1/A1 vs. A1/A2 & A2/A2); DOM = dominantes Modell (A2/A2 vs. A1/A2 und A1/A1); ADD = additives Modell (A1/A1 vs. A2/A2 vs. A1/A2)



**Abbildung 5.3:** Adjustierte Mittelwerte (MW) Gesamtwert Wortliste signifikanter SNPs

## b) EOAD

Beim Genotypvergleich der EOAD-Gruppe zeigte sich rs4722589 auf HNRNPA2B1 auffällig und in der Allelanalyse konnte eine bessere Leistung bei A2-Trägern festgestellt werden (Tabelle 5.22). Die Differenz zwischen homozygoten A1- bzw. A2-Trägern bei rs4722589 betrug dabei im Durchschnitt 7,5 Punkte.

**Tab.5.22:** Wortliste Gesamtergebnis EOAD

SNP	A1	A2	MW (SE) A1/A1	MW (SE) A1/A2	MW (SE) A2/A2	ADD p-Wert	REZ p-Wert	DOM p-Wert
rs4722589 <b>HNRNPA2B1</b>	C	A	2,574 (3,813)	6,303 (1,828)	10,033 (0,966)	<b>0,019**</b>	-	<b>0,026**</b>

MW = adjustierter Mittelwert (additives Modell); SE = Standardfehler; A1 = Allel mit niedrigerer Frequenz; A2 = Allel mit höherer Frequenz; \*\* = Signifikanz; \* = Trend; - = weder Trend- noch Signifikanzniveau erreicht; REZ = rezessives Modell (A1/A1 vs. A1/A2 & A2/A2); DOM = dominantes Modell (A2/A2 vs. A1/A2 und A1/A1); ADD = additives Modell (A1/A1 vs. A2/A2 vs. A1/A2)

### c) LOAD

In der LOAD-Gruppe fand sich bei rs913858 (ELAVL4) im additiven Modell eine Signifikanz von  $p = 0,019$ . Dabei war das A1-Allel in seiner homozygoten Ausführung mit der besten Leistung verbunden. Von fünf weiteren SNPs konnte im Genotypvergleich kein Ergebnis erlangt werden. Neben ELAVL4 waren auf HNRNPA2B1 zwei SNPs mit einer besseren Gedächtnisleistung bei der A2/A2- bzw. A1/A2-Kombination assoziierbar (Tabelle 5.23).

**Tab.5.23:** Wortliste Gesamtergebnis LOAD

SNP	A1	A2	MW (SE) A1/A1	MW (SE) A1/A2	MW (SE) A2/A2	ADD p-Wert	REZ p-Wert	DOM p-Wert
rs913858 <b>ELAVL4</b>	A	G	13,086 (1,027)	11,670 (0,500)	10,254 (0,458)	<b>0,019**</b>	<b>0,034**</b>	0,061*
rs12113404 <b>HNRNPA2B1</b>	G	A	8,280 (1,805)	9,761 (0,886)	11,242 (0,388)	0,065*	-	<b>0,029**</b>
rs12672536 <b>HNRNPA2B1</b>	C	T	7,751 (1,844)	9,501 (0,900)	11,252 (0,396)	<b>0,036**</b>	n.a.	<b>0,036**</b>

MW = adjustierter Mittelwert (additives Modell); SE = Standardfehler; A1 = Allel mit niedrigerer Frequenz; A2 = Allel mit höherer Frequenz; \*\* = Signifikanz; \* = Trend; - = weder Trend- noch Signifikanzniveau erreicht; n.a. = nicht angegeben; REZ = rezessives Modell (A1/A1 vs. A1/A2 & A2/A2); DOM = dominantes Modell (A2/A2 vs. A1/A2 und A1/A1); ADD = additives Modell (A1/A1 vs. A2/A2 vs. A1/A2)

### 5.5.4 Wortliste abrufen

#### a) Patienten mit Alzheimer Demenz (EOAD und LOAD)

Das verbale episodische Gedächtnis der Patienten ließ sich bei rs913858 (ELAVL4) und rs1716966 auf PCBP2 mit einer besseren Leistung der Allel-1-Träger assoziieren (Tabelle 5.24). Der marginal verbesserte Abruf ist dabei um maximal 0,919 Punkte (ELAVL4) bzw. 0,735 (PCBP2) besser. Bei weiteren 3 SNPs (rs1683152, rs784566 und rs11170562) auf PCBP2 und einem SNP (rs12672536) auf HNRNPA2B1 war eine bessere Gedächtnisleistung hingegen jeweils mit der A2-Variante assoziierbar.

**Tab.5.24:** Wortliste abrufen Gesamtgruppe Patienten

SNP	A1	A2	MW (SE) A1/A1	MW (SE) A1/A2	MW (SE) A2/A2	ADD p-Wert	REZ p-Wert	DOM p-Wert
rs913858 <b>ELAVL4</b>	A	G	2,338 (0,377)	1,879 (0,182)	1,419 (0,157)	<b>0,035**</b>	<b>0,009**</b>	-
rs1716966 <b>PCBP2</b>	T	C	1,982 (0,223)	1,614 (0,123)	1,247 (0,208)	<b>0,032**</b>	0,062*	0,098*
rs1683152 <b>PCBP2</b>	C	T	0,893 (0,282)	1,404 (0,140)	1,914 (0,167)	<b>0,011**</b>	-	<b>0,009**</b>
rs784566 <b>PCBP2</b>	A	G	0,923 (0,286)	1,408 (0,142)	1,892 (0,168)	<b>0,018**</b>	-	<b>0,017**</b>
rs11170562 <b>PCBP2</b>	G	A	0,945 (0,273)	1,413 (0,137)	1,881 (0,166)	<b>0,017**</b>	-	<b>0,014**</b>
rs12672536 <b>HNRNPA2B1</b>	C	T	0,261 (0,621)	1,004 (0,302)	1,747 (0,140)	<b>0,025**</b>	n.a.	<b>0,025**</b>

MW = adjustierter Mittelwert (additives Modell); SE = Standardfehler; A1 = Allel mit niedrigerer Frequenz; A2 = Allel mit höherer Frequenz; \*\* = Signifikanz; \* = Trend; - = weder Trend- noch Signifikanzniveau erreicht; n.a. = nicht angegeben; REZ = rezessives Modell (A1/A1 vs. A1/A2 & A2/A2); DOM = dominantes Modell (A2/A2 vs. A1/A2 und A1/A1); ADD = additives Modell (A1/A1 vs. A2/A2 vs. A1/A2)

### b) EOAD

Im EOAD-Patientenkollektiv wurde bei drei SNPs auf dem PCBP2-Gen eine Signifikanz festgestellt: bei rs2249381 wurde eine bessere Gedächtnisleistung mit homozygoten A2-Trägern assoziiert, bei rs2249381 schnitten homozygote C-Träger um 1,2 Punkte besser ab als homozygote T-Träger und bei rs784563 zeigten T-Träger eine bessere Leistung auf. Ein zusätzlicher SNP auf HNRNPH3, sowie ein weiterer auf HNRNPA2B1 zeigten signifikante Abweichungen (Tabelle 5.25).

**Tab.5.25:** Wortliste abrufen EOAD

SNP	A1	A2	MW (SE) A1/A1	MW (SE) A1/A2	MW (SE) A2/A2	ADD p-Wert	REZ p-Wert	DOM p-Wert
rs2249381 <b>PCBP2</b>	A	G	1,336 (0,431)	1,866 (0,252)	2,397 (0,490)	0,082*	-	<b>0,006**</b>
rs1716966 <b>PCBP2</b>	T	C	1,182 (0,374)	1,808 (0,241)	2,433 (0,469)	<b>0,020**</b>	<b>0,008**</b>	-
rs784563 <b>PCBP2</b>	G	T	1,071 (0,489)	1,579 (0,249)	2,086 (0,344)	-	-	<b>0,026**</b>
rs16925347 <b>HNRNPH3</b>	C	G	1,977 (0,873)	1,889 (0,431)	1,800 (0,286)	<b>0,013**</b>	-	<b>0,015**</b>
rs12672536 <b>HNRNPA2B1</b>	C	T	1,338 (0,861)	1,545 (0,432)	1,753 (0,273)	<b>0,018**</b>	n.a.	<b>0,018**</b>

MW = adjustierter Mittelwert (additives Modell); SE = Standardfehler; A1 = Allel mit niedrigerer Frequenz; A2 = Allel mit höherer Frequenz; \*\* = Signifikanz; \* = Trend; - = weder Trend- noch Signifikanzniveau erreicht; n.a. = nicht angegeben; REZ = rezessives Modell (A1/A1 vs. A1/A2 & A2/A2); DOM = dominantes Modell (A2/A2 vs. A1/A2 und A1/A1); ADD = additives Modell (A1/A1 vs. A2/A2 vs. A1/A2)

### c) LOAD

Bei den Patienten mit spätem Ausbruch der AD waren drei SNPs auf PCBP2 und einer auf ELAVL4 hinsichtlich der Gedächtnisleistung auffällig (Tabelle 5.26). Während bei rs913858 eine verbesserte Leistung mit dem homozygoten G-Genotyp assoziiert werden konnte, konnte bei rs1683152 und rs784566 das jeweilige Allel mit der häufigeren Frequenz mit einer besseren Leistung assoziiert werden. Träger des homozygoten A-Allels schnitten bei rs11170562 besser ab.

**Tab.5.26:** Wortliste abrufen LOAD

SNP	A1	A2	MW (SE) A1/A1	MW (SE) A1/A2	MW (SE) A2/A2	ADD p-Wert	REZ p-Wert	DOM p-Wert
rs913858 <b>ELAVL4</b>	A	G	2,451 (0,407)	1,881 (0,198)	1,310 (0,180)	<b>0,019**</b>	<b>0,012**</b>	0,090*
rs1683152 <b>PCBP2</b>	C	T	0,834 (0,331)	1,342 (0,165)	1,851 (0,188)	<b>0,023**</b>	0,074**	0,052*
rs784566 <b>PCBP2</b>	A	G	0,872 (0,335)	1,358 (0,167)	1,844 (0,187)	<b>0,030**</b>	0,062*	0,077*
rs11170562 <b>PCBP2</b>	G	A	0,862 (0,328)	1,338 (0,163)	1,813 (0,188)	<b>0,033**</b>	0,078*	0,078*

MW = adjustierter Mittelwert (additives Modell); SE = Standardfehler; A1 = Allel mit niedrigerer Frequenz; A2 = Allel mit höherer Frequenz; \*\* = Signifikanz; \* = Trend; - = weder Trend- noch Signifikanzniveau erreicht; REZ = rezessives Modell (A1/A1 vs. A1/A2 & A2/A2); DOM = dominantes Modell (A2/A2 vs. A1/A2 und A1/A1); ADD = additives Modell (A1/A1 vs. A2/A2 vs. A1/A2)

### 5.5.5 Wortliste erkennen

#### a) Patienten mit Alzheimer Demenz (EOAD und LOAD)

Beim unterstützten Abrufen konnte in der Gesamtgruppe der Patienten jeweils ein SNP auf dem HNRNPA2B1- und dem PCBP2-Gen als signifikant identifiziert werden (Tabelle 5.27).

**Tab.5.27:** Wortliste erkennen Gesamtgruppe Patienten

SNP	A1	A2	MW (SE) A1/A1	MW (SE) A1/A2	MW (SE) A2/A2	ADD p-Wert	REZ p-Wert	DOM p-Wert
rs12672536 <b>HNRNPA2B1</b>	C	T	2,465 (1,109)	3,925 (0,539)	5,385 (0,251)	<b>0,011**</b>	n.a.	<b>0,011**</b>
rs1683152 <b>PCBP2</b>	C	T	4,164 (0,514)	4,935 (0,255)	5,706 (0,304)	<b>0,039**</b>	-	<b>0,033**</b>

MW = adjustierter Mittelwert (additives Modell); SE = Standardfehler; A1 = Allel mit niedrigerer Frequenz; A2 = Allel mit höherer Frequenz; \*\* = Signifikanz; \* = Trend; - = weder Trend- noch Signifikanzniveau erreicht; n.a. = nicht angegeben; REZ = rezessives Modell (A1/A1 vs. A1/A2 & A2/A2); DOM = dominantes Modell (A2/A2 vs. A1/A2 und A1/A1); ADD = additives Modell (A1/A1 vs. A2/A2 vs. A1/A2)

## b) EOAD

In der EOAD-Gruppe zeigten bei rs1683152 (PCBP2) C-Allel-Träger eine bessere Leistung, während bei rs11170562 (ebenso PCBP2) A-Träger besser abschnitten (Tabelle 5.28).

**Tab.5.28:** Wortliste erkennen EOAD

SNP	A1	A2	MW (SE) A1/A1	MW (SE) A1/A2	MW (SE) A2/A2	ADD p-Wert	REZ p-Wert	DOM p-Wert
rs1683152 <b>PCBP2</b>	C	T	6,342 (3,270)	5,682 (1,619)	5,022 (0,414)	0,088*	-	<b>0,029**</b>
rs11170562 <b>PCBP2</b>	G	A	3,724 (0,906)	4,718 (0,437)	5,712 (0,604)	0,055*	-	<b>0,029**</b>

MW = adjustierter Mittelwert (additives Modell); SE = Standardfehler; A1 = Allel mit niedrigerer Frequenz; A2 = Allel mit höherer Frequenz; \*\* = Signifikanz; \* = Trend; - = weder Trend- noch Signifikanzniveau erreicht; REZ = rezessives Modell (A1/A1 vs. A1/A2 & A2/A2); DOM = dominantes Modell (A2/A2 vs. A1/A2 und A1/A1); ADD = additives Modell (A1/A1 vs. A2/A2 vs. A1/A2)

## c) LOAD

In der LOAD-Gruppe konnten bei rs12113404 und rs12672536 (beide HNRNPA2B1) bessere Gedächtnisleistungen mit dem jeweiligen A2-Allel assoziiert werden (Tabelle 5.29).

**Tab.5.29:** Wortliste erkennen LOAD

SNP	A1	A2	MW (SE) A1/A1	MW (SE) A1/A2	MW (SE) A2/A2	ADD p-Wert	REZ p-Wert	DOM p-Wert
rs12113404 <b>HNRNPA2B1</b>	G	A	3,260 (1,342)	4,387 (0,659)	5,513 (0,289)	0,086*	-	<b>0,043**</b>
rs12672536 <b>HNRNPA2B1</b>	C	T	1,743 (1,348)	3,585 (0,657)	5,426 (0,290)	<b>0,007**</b>	n.a.	<b>0,007**</b>

MW = adjustierter Mittelwert (additives Modell); SE = Standardfehler; A1 = Allel mit niedrigerer Frequenz; A2 = Allel mit höherer Frequenz; \*\* = Signifikanz; \* = Trend; - = weder Trend- noch Signifikanzniveau erreicht; n.a. = nicht angegeben; REZ = rezessives Modell (A1/A1 vs. A1/A2 & A2/A2); DOM = dominantes Modell (A2/A2 vs. A1/A2 und A1/A1); ADD = additives Modell (A1/A1 vs. A2/A2 vs. A1/A2)

## 5.6 Haplotypanalyse

Die Wahrscheinlichkeit gemeinsam vererbt zu werden, steigt für Allele proportional zu ihrer physikalischen Nähe zueinander. Zwei benachbarte Genorte sind während der Meiose einem geringeren *crossing-over* Risiko ausgesetzt, d.h. sie werden mit einer höheren Wahrscheinlichkeit durch den chromosomalen Rekombinationsprozess nicht getrennt. Solche Allele befinden sich im *linkage disequilibrium* (Kopplungsungleichgewicht): zwei gekoppelte Marker einer Population werden aufgrund ihrer Lokalisation häufiger gemeinsam vererbt als nach ihren individuellen Frequenzen zu erwarten wäre, daher kann bei Vorliegen einer solcher Variante mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Zweite geschlossen werden. Das Kopplungsungleichgewicht ist demnach ein Maß für die Abhängigkeit zwischen Allelen zweier Loci. Diese Varianten von *non-random-associated* Loci erlauben durch ihre Lokalisation und Vererbungsmuster die Erstellung von sog. *genetic linkage maps*.

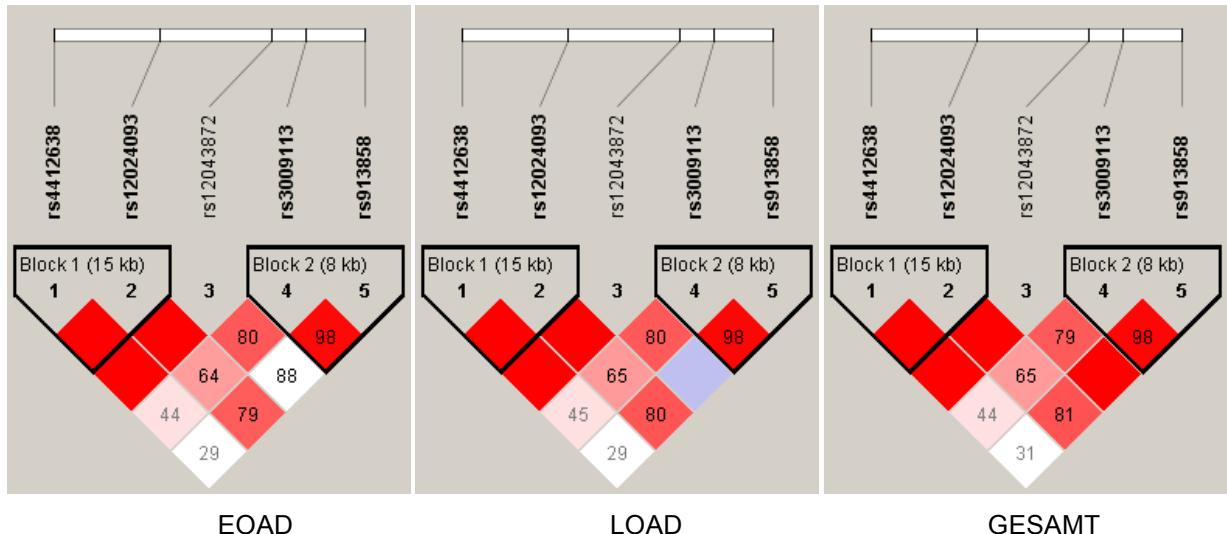
Alle 19 Marker auf den 4 verschiedenen Genen (ELAVL4, HNRNPA2B1, PCBP2 und HNRNPH3), die auf vier verschiedenen Chromosomen liegen, wurden auf ihr LD untersucht. Dabei ergaben sich 4 verschiedene Blöcke von zusammengehörigen SNPs, die im LD liegen. Auf ELAVL4 sind das zum einen rs4412638 mit rs12024093, sowie rs3009113 mit rs913858. Auf HNRNPA2B1 liegen rs12113404 und rs12672536 im Kopplungsungleichgewicht; auf PCBP2 liegen alle sechs SNPs (rs1683152, rs784566, rs11170562, rs784563, rs2249381 und rs1716966) im LD. Auf HNRNPH3 lagen keine Marker im *linkage disequilibrium*. Diese jeweils als zu einem Block zugehörig identifizierten SNPs lagen auf allen drei Genen sowohl im Patientenkollektiv (EOAD und LOAD) als auch in der Gesamtstichprobe im Kopplungsungleichgewicht.

**Tab.5.30:** SNPs im Kopplungsungleichgewicht

Gen	SNPs im Kopplungsungleichgewicht
ELAVL4	rs4412638, rs12024093
ELAVL4	rs3009113, rs913858
HNRNPA2B1	rs12113404, rs12672536
PCBP2	rs1683152, rs784566, rs11170562, rs784563, rs2249381, rs1716966

## 5.6.1 Haplotypverteilungsanalyse auf eine Assoziation mit der Alzheimer Demenz

### a) ELAVL4



**Abbildung 5.4:** Haplotypblöcke der untersuchten SNPs auf ELAVL4 (rote Kästchen ohne Zahl = Wert von 100)

Auf ELAVL4 ließen sich mittels *Haplovview* (Barrett et al., 2005) zwei LD-Blöcke identifizieren. Im Kopplungsungleichgewicht liegen demnach auf Block 1 ein 15 Kilobasenpaar langer Genombereich mit den SNPs rs4412638 und rs12024093, sowie auf einem zweiten, acht Kilobasenpaaren langer LD-Block rs3009113 und rs913858 (Abbildung 5.4).

Die Haplotypanalyse ergab dabei zum einen einen Zusammenhang zwischen dem Haplotypblock 1, bestehend aus rs4412638 und rs12024093 und der Alzheimer Demenz, sowie eine weitere signifikante Assoziation des zweiten Blocks, bestehend aus rs3009113 und rs913858 (Tabelle 5.31).

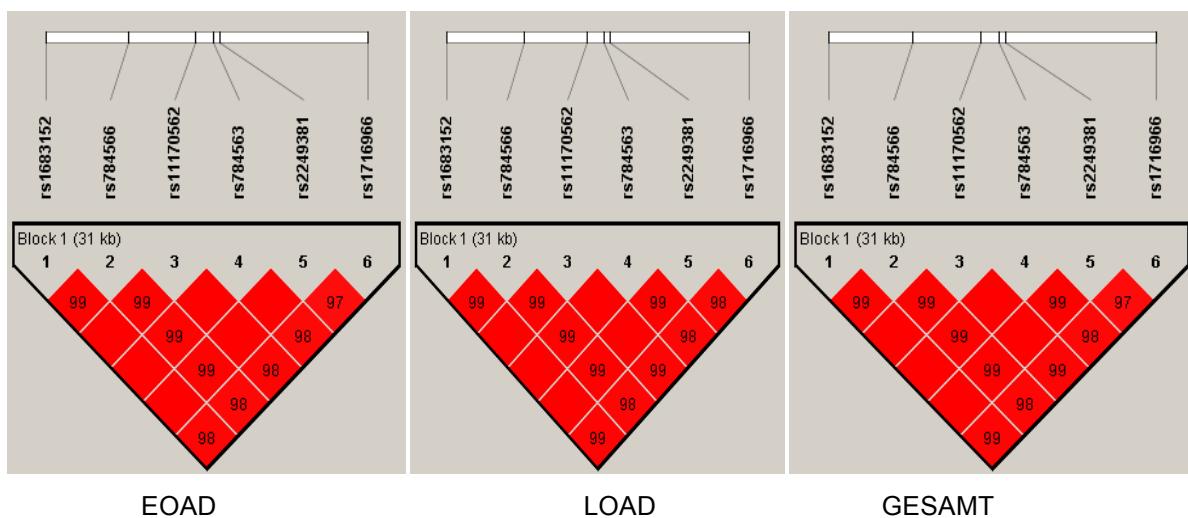
**Tab.5.31:** Assoziation der Haplotypen auf ELAVL4 mit EOAD und LOAD

ELAVL4	Haplotyp	Frequenz		Score		Simulierter p-Wert	
		EOAD	LOAD	EOAD	LOAD	EOAD	LOAD
<b>Block 1:</b> rs4412638 rs12024093	TG	0,762	0,766	0,218	0,64	0,920	0,56
	GA	0,177	0,176	-1,807	-1,391	0,081*	0,159
	GG	0,061	0,059	2,472	1,059	<b>0,017**</b>	0,319
<b>Block 2:</b> rs3009113 rs913858	TG	0,431	0,432	1,491	1,122	0,124	0,251
	CG	0,368	0,362	-1,657	-1,821	0,109	0,062*
	TA	0,201	0,206	0,145	0,8	0,829	0,43

EOAD = *early-onset Alzheimer's Disease*; LOAD = *late-onset Alzheimer's Disease*

Aus den Ergebnissen der Analyse geht hervor, dass sich Träger mit der Haplotypkombination GG auf Block 1 in der untersuchten Stichprobe signifikant häufiger unter EOAD-Patienten finden lassen (score = 2,472; p = 0,017). Auf Block zwei fand sich weiterhin ein Trend zur Assoziation mit der Allelkombination CG in der LOAD Gruppe: an sporadischer Alzheimer Demenz Erkrankte zeigten eine geringere CG-Kombination (score = -1,821, p = 0,062) als die gesunden Kontrollprobanden.

### b) PCBP2



**Abbildung 5.5:** Haplotypblöcke der untersuchten SNPs auf PCBP2 (Kästchen ohne Zahl = Wert von 100)

Auf PCBP2 ließ sich auf Block 1 bestehend aus rs1683152, rs784566, rs11170562, rs784563, rs2249381 und rs1716966 eine Assoziation mit TGATAT-Trägern feststellen: Träger einer solchen Haplotypkombination fanden sich signifikant seltener bei EOAD-Patienten (score = -1,971, p = 0,045) (Tabelle 5.32).

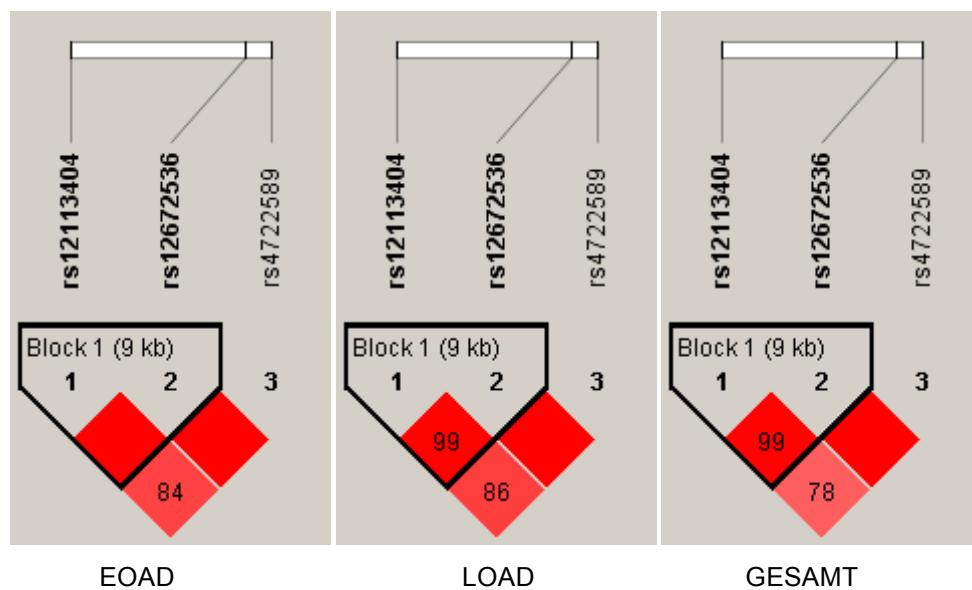
**Tab.5.32:** Assoziation der Haplotypen auf PCBP2 mit EOAD und LOAD

PCBP2	Haplotyp	Frequenz		Score		Simulierter p-Wert	
		EOAD	LOAD	EOAD	LOAD	EOAD	LOAD
<b>Block 1:</b> rs1683152, rs784566, rs11170562, rs784563, rs2249381, rs1716966	TGATAT	0,487	0,486	-1,971	0,148	<b>0,045**</b>	0,129
	CAGGGC	0,306	0,302	0,859	0,986	0,401	0,987
	TGAGGC	0,163	0,170	0,189	0,210	0,852	0,189
	TGATAC	0,028	0,029	1,045	0,389	0,404	0,391

EOAD = early-onset Alzheimer's Disease; LOAD = late-onset Alzheimer's Disease

### c) HNRNPA2B1

Die beiden zu einem Haplotypenblock zugehörigen SNPs s12113404 und rs12672536 auf HNRNPA2B1 zeigten hinsichtlich ihrer Verteilung zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 5.6:** Haplotypblöcke der untersuchten SNPs auf HNRNPA2B1 (Kästchen ohne Zahl = Wert von 100)

## **5.6.2 Assoziation der Haplotypverteilung mit Subtests der CERAD und dem MMSE**

Analog zu den Untersuchungen der einzelnen varianten Allele wurde untersucht, ob ganze Haplotypen mit unterschiedlichen kognitiven Parametern korreliert werden können. Dazu sollte analysiert werden, ob eine bestimmte Kombination von kopplungsungleichen SNPs signifikant häufiger in einer der untersuchten Gruppen mit den Leistungen in der neuropsychologischen Testung assoziierbar ist. Der Zusammenhang zwischen der Genotyp-Phänotyp-Ausprägung wurde mittels linearer Regression ermittelt.

Einzelne Haplotypkombinationen auf HNRNPA2B1, PCBP2 und ELAVL4 konnten mit besseren bzw. schlechteren kognitiven Leistungen assoziiert werden; da auf HNRNPH3 keine Marker im Kopplungsungleichgewicht lagen, liegt für dieses Gen keine Analyse vor.

### **5.6.2.1 HNRNPA2B1**

Auf HNRNPA2B1 konnte jeweils Haplotypeblock 1 (rs12113404 und rs12672536) sowohl in der EOAD- als auch in der LOAD-Gruppe mit einer signifikant abweichenden Leistung in unterschiedlichen kognitiven Tests assoziiert werden (Tabelle 5.33): die Haplotypvariante GC konnte in der EOAD- und in der LOAD-Gruppe mit der jeweils schlechteren Leistung in Kurzzeitgedächtnisaufgaben assoziiert werden (*score* EOAD = -2,528, *p* = 0,015 (Wortliste Gesamtergebnis); *score* EOAD (Wortliste abrufen) = -2,948, *p* = 0,002; *score* LOAD (Wortliste erkennen) = -2,078, *p* = 0,042). Die GT-Kombination in der EOAD-Gruppe war ebenso wie die AT-Kombination (beide jeweils auf Block 1) in der LOAD-Gruppe mit einer besseren Leistung verbunden (*GT score* (EOAD, Wortliste abrufen) = 1,754, *p* = 0,064; *AT score* (LOAD, *Boston Naming Test*) = 2,360, *p* = 0,017).

**Tab.5.33:** Assoziation der Haplotypen auf HNRNPA2B1 mit kognitiven Domänen

HNRNPA2B1	Haplotyp	Frequenz	Score	Simulierter p-Wert	Phänotyp
<b>Block 1:</b> rs12113404, rs12672536	GC	0,080	-2,528	<b>0,015**</b>	Wsum/EOAD
	GC	0,080	-2,948	<b>0,002**</b>	WA/EOAD
	GT	0,030	1,754	0,064*	WA/EOAD
<b>Block 1:</b> rs12113404, rs12672536	GC	0,078	-2,078	<b>0,042**</b>	WW/LOAD
	AT	0,912	2,360	<b>0,017**</b>	BNT/LOAD
	GC	0,078	-2,832	<b>0,004**</b>	BNT/LOAD

Wsum =Wortliste Gesamtergebnis aller drei Durchgänge (CERAD); WA = Wortliste abrufen (CERAD); WW = Wortliste wiedererkennen (CERAD); BNT = *Boston Naming Test* (CERAD)

### 5.6.2.2 ELAVL4

Auch auf dem ELAVL4-Gen konnten zwei Haplotypblöcke identifiziert werden, die mit signifikant veränderten Leistungen im Alzheimerkollektiv einhergingen (Tabelle 5.35). Schlechter schnitt in der EOAD-Gruppe durchschnittlich die GG-Kombination (rs4412638, rs12024093) beim MMSE ab (score = -3,081, p = 0,004); in der LOAD-Gruppe zeigte sich eine weitere Haplotypkombination (rs3009113, rs913858) auffällig: TG-Träger waren sowohl im MMSE als auch beim Abrufen der Wortliste signifikant schlechter (TG score (MMSE) = -2,192, p = 0,037; TG score (Wortliste abrufen) = -1,666, p = 0,098). Die CG- und TA-Kombination auf demselben Haplotypenblock konnte hingegen eine bessere Leistung in Teilen der psychometrischen Testung erbringen (CG score (MMSE) = 2,146, p = 0,018; TA score (Wortliste abrufen) = 2,441, p = 0,008).

**Tab.5.34:** Assoziation der Haplotypen auf ELAVL4 mit kognitiven Domänen

<b>ELAVL4</b>	<b>Haplotyp</b>	<b>Frequenz</b>	<b>Score</b>	<b>Simulierter p-Wert</b>	<b>Phänotyp</b>
<b>Block 1:</b> rs4412638, rs12024093	GG	0,061	-3,081	<b>0,004**</b>	MMSE/EOAD
<b>Block 2:</b> rs3009113, rs913858	TG	0,432	-2,192	<b>0,037**</b>	MMSE/LOAD
	CG	0,369	2,146	<b>0,018**</b>	MMSE/LOAD
	TG	0,460	-1,666	0,098*	WA/LOAD
	TA	0,204	2,441	<b>0,008**</b>	WA/LOAD

MMSE = *Mini Mental State Examination*; WA = Wortliste abrufen (CERAD)

### 5.6.2.3 PCBP2

Zwei weitere Haplotypblöcke auf PCBP2 ließen sich mit kognitiven Domänen assoziieren: auf Block 1 (rs1683152, rs784566, rs11170562, rs784563, rs2249381, rs1716966) war bei den früh Erkrankten die TGATAT-Kombination mit einer besseren Leistung im MMSE verbunden (score = 1,900, p = 0,069), die CAGGGC-Variante schnitt hingegen durchschnittlich schlechter ab (score = -2,161, p = 0,028) (Tabelle 5.36). Auf einem zweiten identifizierten Haplotypblock (rs1683152, rs784566, rs11170562, rs784563, rs2249381, rs1716966) zeigten sich Träger der CAGGGC-Variante im LOAD-Kollektiv mit einer schlechteren Leistung im Wortliste-abrufen-Test der CERAD assoziierbar (score = -2,301, p = 0,019).

**Tab.5.35:** Assoziation der Haplotypen auf PCBP2 mit kognitiven Domänen

<b>PCBP2</b>	<b>Haplotyp</b>	<b>Frequenz</b>	<b>Score</b>	<b>Simulierter p-Wert</b>	<b>Phänotyp</b>
<b>Block 1:</b> rs1683152, rs784566, rs11170562, rs784563, rs2249381, rs1716966	TGATAT	0,477	1,900	0,069*	MMSE/EOAD
	CAGGGC	0,300	-2,161	<b>0,028**</b>	MMSE/EOAD
<b>Block 1:</b> rs1683152, rs784566, rs11170562, rs784563, rs2249381, rs1716966	CAGGGC	0,298	-2,301	<b>0,019**</b>	WA/LOAD

MMSE = *Mini Mental State Examination*; WA = Wortliste abrufen (CERAD)

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden 19 SNPs vier unterschiedlicher Gene an 323 Alzheimer-Patienten und 677 Kontrollprobanden auf eine mögliche Assoziation mit der Alzheimer Demenz und relevanten kognitiven Endophänotypen untersucht.

Bei den vier untersuchten Genen handelt es sich um HNRNPA2B1, HNRNPH3, PCBP2 und ELAVL4. Alle vier Gene codieren für RBPs (*RNA-binding proteins*), die eine große Anzahl an unterschiedlichen Aufgaben in der RNA-Prozessierung und -Modifikation übernehmen. Wenngleich die RBPs eine entscheidende Schlüsselposition in diversen zellulären Prozessen einnehmen, konnten bislang nur einige wenige ausreichend untersucht, und in Struktur und Funktion verstanden werden.

Gerade weil RBPs eine enorme Bandbreite an Aufgaben haben, und an praktisch jedem Schritt der RNA-Biogenese, -Expression und -Funktion beteiligt sind, gestaltet sich ihre Charakterisierung schwierig und langwierig. Die wenigen vorliegenden Studienergebnisse deuten bislang auf eine Beteiligung von fehlfunktionierenden RBPs an neurodegenerativen Prozessen hin.

### 6.1 HNRNPA2B1

In der vorliegenden Arbeit wurden für HNRNPA2B1 drei SNPs untersucht. Zwei davon, rs12672536 und rs4722589, lagen dabei im Gen selbst, während rs12113404 im 3'-Genbereich und gleichzeitig auf NFE2L3 (*nuclear factor erythroid-derived 2-like 3*), aber im Kopplungsungleichgewicht mit rs12672536 auf HNRNPA2B1 liegt, und daher in die Analyse miteinbezogen wurde. Alle drei SNPs liegen in intronischen Bereichen. Das HNRNPA2B1-Gen liegt auf Chromosom 7.

In der Gegenüberstellung der Gesamtstichprobe der Patienten mit den Kontrollprobanden konnte für die drei SNPs kein Hinweis auf eine Assoziation mit AD gefunden werden. Bei der separaten Betrachtung der beiden Patientenkollektive konnte ein Hinweis auf eine Assoziation mit dem minoren C-Allel auf rs4722589 und der EOAD-Gruppe gefunden werden (p-Wert = 0,012).

Von den vier in dieser Arbeit untersuchten Genen ist die Assoziation zwischen HNRNPA2B1 und neurodegenerativen Erkrankungen insgesamt die bislang am besten belegte.

In einigen neueren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen fehlfunktionierenden hnRNPA2/B1 und neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere mit der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) und der Multisystematrophie (MSP), aber auch mit AD festgestellt werden. Der genaue Pathomechanismus des Proteins ist gegenwärtig nicht bekannt. Während selektiver Verlust von hnRNPA2B1 im Mausmodell in Dendritenschwund und Gedächtnisschwierigkeiten resultierte (Berson et al., 2012), zeigte sich immunhistochemischen bei Patienten mit schwerer AD (Braak-Stadien V-VI) in den Hippokampusregionen CA4 und CA2 eine Überexpression von hnRNPA2/B1 (Mizukami et al., 2005). Die gegenwärtigen Befunde lassen insgesamt ein Ungleichgewicht von hnRNPA2/B1 mit in der Folge veränderten Spleißbedingungen für die betroffene Zelle in bestimmten Hirnregionen vermuten.

Eine 2011 veröffentlichte Studie identifizierte den Genotyp C/C auf rs7967622 des HNRNPA1-Gens als Risikofaktor in der männlichen Patientenpopulation für FTLD, während für AD-Patienten keine Assoziation gefunden wurde (Villa et al., 2011). Die untersuchte Stichprobe umfasste 287 Patienten mit Alzheimer, eine Unterscheidung in *early-* bzw. *late-onset* wurde dabei nicht berücksichtigt. Bei multifaktoriellen Erkrankungen mit uneinheitlichen Krankheitsbildern und dem Problem der ätiologischen Heterogenität ist eine Aufteilung des Krankheitskollektivs in kleinere homogene Subgruppen im Sinne einer möglichst genauen Analyse sinnvoll. Neben der Einteilung nach *age at onset* bietet sich beispielsweise eine Einteilung nach klinischen Symptomen (beispielsweise Alzheimer mit/ohne optische Halluzinationen) oder Komorbiditäten (beispielsweise vaskuläre Risikofaktoren) an, und spricht für die Validität der Aussage. In dieser Studie wurde das Patientenkollektiv in EOAD und LOAD unterteilt, eine weitere Unterteilung war aufgrund des Stichprobenumfangs, speziell wegen der sehr kleinen EOAD-Gruppe, nicht sinnvoll. Wie in der Studie von Villa et al. zeigte auch hier die Genotypverteilung der Gesamtgruppe keine signifikanten Assoziationen mit AD, erst durch eine Aufteilung in EOAD und LOAD kristallisierte sich ein Unterschied im Verteilungsmuster heraus: auf rs4722589 trat das C-Allel signifikant häufiger in der EOAD-Patientengruppe auf.

Neben der Überprüfung der Einzelmarker, wurde in einem weiteren Schritt eine Haplotypanalyse durchgeführt. Im Kopplungsungleichgewicht lagen auf HNRNPA2B1 in den beiden Patientengruppen (EOAD und LOAD), sowie im Kontrollkollektiv

rs12113404 und rs12672536. In der Verteilung der Haplotypfrequenzen zwischen den drei Gruppen konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Diese Ergebnisse standen im Einklang mit den Befunden der Einzelmarker, da sich der assoziierte SNP (rs4722589) nicht auf dem Haplotypblock mit den beiden anderen SNPs befand.

Insgesamt ist es bei der gegenwärtig vorliegenden Studienlage schwierig, einen Einfluss des HNRNPA2B1-Gens auf die AD nachweisen zu können. In hiesiger Population scheint der Marker rs4722589 mit der Subgruppe EOAD assoziiert zu sein. SNPs, die in intronischen Bereichen liegen, können potenziell regulatorische Sequenzen beeinflussen, in dem sie beispielsweise 1.) Transkriptionsfaktor- oder Spleißfaktorbindungsstellen, 2.) Polyadenylierungsstellen, 3.) Methylierungsmuster der chromosomal DNA verändern oder 4.) die mRNA-Faltung beeinflussen. Zudem können die SNPs im LD mit direkt funktionalen Varianten stehen, die über eine veränderte AS-Sequenz zu einer Proteinisoform mit anderen Eigenschaften führen können. Rs4722589 liegt im intronischen Bereich des HNRNPA2B1-Gens, daher wären weiterführende Haplotypuntersuchungen mit diesem Marker von besonderem Interesse.

Bei der Assoziation der SNPs mit kognitiven Domänen konnten hingegen einige Assoziationen festgestellt werden (Tabelle 6.1).

**Tab.6.1:** Übersicht Ergebnisse HNRNPA2B1

Marker/ Haplotyp	Assoziation mit AD			Assoziation mit Endophänotypen		
	GESAMT	EOAD	LOAD	GESAMT	EOAD	LOAD
rs12672536	ns	ns	ns	T↑ (MMSE) p = 0,004  T↑ (Wsum) p = 0,006  T↑ (WA) p = 0,025  T↑ (WW) p = 0,011  T↑ (BNT) p = 0,009	T↑ (WA) p = 0,018	T↑ (Wsum) p = 0,036  T↑ (WW) p = 0,007  T↑ (BNT) p = 0,017
rs4722589	ns	C↑ p*= 0,008	ns	C↑ (Wsum) p = 0,003	A↑(Wsum) p = 0,019	ns
rs12113404	ns	ns	ns	A↑ (MMSE) p = 0,057  A↑ (Wsum) p = 0,064  A↑ (BNT) p = 0,058	ns	A↑ (Wsum) p = 0,065  A↑ (WW) p = 0,086  A↑ (BNT) p = 0,018
rs12113404/ rs12672536	-	ns	ns	ns	GC↓ (Wsum) p = 0,015  GC↓ (WA) p = 0,002  GT↑(WA) p = 0,064	GC↓ (WW) p = 0,042  GC↓ (BNT) p = 0,004  AT↑(BNT) p = 0,017

Assoziation mit AD: ↑ = signifikant häufiger im Patientenkollektiv ; ↓ = signifikant seltener im Patientenkollektiv; ns = nicht signifikant; Assoziation mit Endophänotypen: ↑ = Allel/Haplotyp mit signifikant besserer Leistung; ↓ = Allel/Haplotyp mit signifikant schlechterer Leistung; - = nicht berechnet; MMSE = Mini Mental State Examination; WW = Wortliste wiedererkennen (CERAD); WA = Wortliste abrufen (CERAD); Wsum = Gesamtergebnis der drei Durchgänge Wortliste lernen (CERAD); BNT = *Boston Naming Test*; p = p-Wert additives Modell; p\*= p-Wert Genotypverteilung

Das T-Allel des Markers rs12672536 konnte in allen drei Analysegruppen mit einer signifikant besseren Leistung in den Subtests der CERAD und dem MMSE assoziiert werden. Als selteneres Allel kam es sowohl in der EOAD-, als auch in der LOAD-Gruppe in seiner homozygoten Ausführung nicht vor.

Ein auf den ersten Blick widersprüchliches Ergebnis wurde auf dem Marker rs4722589 erzielt: zwar fanden sich signifikant häufiger C-Allel-Träger im EOAD-Kollektiv, was infolgedessen zu einem schlechteren Ergebnis der C-Träger in Aufgaben zur Gedächtnisleistung der CERAD führte, allerdings war im Gesamtkollektiv der Patienten (EOAD und LOAD) das C-Allel mit einer besseren Leistung im selben Test verbunden. Dies ist ein Hinweis dafür, wie wichtig die separate Analyse der beiden diagnostischen Entitäten ist.

Zusammenfassend lässt sich das C-Allel auf rs4722589 mit dem Phänotyp *early-onset* AD und auch mit einer schlechteren Gedächtnisleistung assoziieren. Aufgrund der geringen Gruppengröße des hier untersuchten EOAD-Kollektivs ist eine abschließende Bewertung dieser Assoziation allerdings nicht möglich.

Für rs12113404 zeigte sich ein homogenes Bild in der Gesamtgruppe der Patienten und der LOAD-Gruppe: das A-Allel war mit einer besseren Leistung in den Wortliste-*Items*, dem *Boston Naming Test* und dem MMSE assoziiert. Analog zu den Einzelmarkerbefunden ließen sich in der Haplotypanalyse der Markerblöcke rs12113404 und rs12672536 die GC-Kombination mit einer schlechteren Gedächtnisleistung in der EOAD- und der LOAD-Gruppe assoziieren. Die Kombination GT schnitt in einem CERAD-Subtest (Wortliste abrufen) im EOAD-Kollektiv, und die AT-Kombination im LOAD-Kollektiv (*Boston Naming Test*) besser ab.

Da es bislang keine veröffentlichten Assoziationsstudien zu den untersuchten Markern bzw. zu weiteren Markern auf HNRNRA2B1 und AD gibt, ist eine abschließende Bewertung der Befunde nur bedingt möglich. Trotz der signifikanten Ergebnisse in der Assoziation der Marker auf HNRNPA2B1 mit den kognitiven Domänen, bedarf es zur Untermauerung dieser Befunde weiterer Analysen.

## 6.2 HNRNPH3

In der vorliegenden Studie konnten die fünf untersuchten SNPs auf dem HNRNPH3-Gen (Chromosom 10) nicht mit der Alzheimer Demenz assoziiert werden. Das seltener C-Allel (rs16925347) konnte mit einer besseren Leistung im Kurzzeitgedächtnis der *early-onset* Patienten assoziiert werden (Tabelle 6.3). Insgesamt deuten die negativen Befunde der fünf Marker darauf hin, dass es sich bei HNRNPH3 wohl nicht um ein Suszeptibilitätsgen für den Alzheimer Demenz-Phänotyp in der hier untersuchten Population handelt. Die gegenwärtige Studienlage gibt keinen Hinweis auf eine Assoziation des HNRNPH3-Gens mit der Alzheimer Demenz.

**Tab.6.3:** Übersicht Ergebnisse HNRNPH3

Marker/ Haplotyp	Assoziation mit AD			Assoziation mit Endophänotypen		
	GESAMT	EOAD	LOAD	GESAMT	EOAD	LOAD
rs10998072	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rs10998076	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rs1162757	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rs16925347	ns	ns	ns	ns	<b>C↑ (WA)</b> $p = 0,013$	ns
rs1162756	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Assoziation mit AD: ↑ = Allel/Haplotyp signifikant häufiger im Patientenkollektiv ; ↓ = Allel/Haplotyp signifikant seltener im Patientenkollektiv; ns = nicht signifikant; Assoziation mit Endophänotypen: ↑ = Allel/Haplotyp mit signifikant besserer Leistung; ↓ = Allel/Haplotyp mit signifikant schlechterer Leistung; WA = Wortliste abrufen (CERAD); p = p-Wert additives Modell

### 6.3 PCBP2

Das PCBP2-Protein spielt eine wichtige Rolle in der posttranskriptionalen und translationalen Regulierung der Zelle und ist insbesondere für seine Interaktion mit MAVS (*mitochondrial antiviral signaling protein*) bekannt (Leffers et al., 1995; You et al., 2009). Auf dem dritten HNRNP-Gen ließen sich zwei Marker (rs784563 und rs2249381) mit dem Phänotyp Alzheimer Demenz assoziieren. Dabei befanden sich in beiden Fällen signifikant mehr G-Träger im Patientenkollektiv. Die Unterteilung in EOAD und LOAD brachte keine weiteren Aufschlüsse. In der Endophänotypenuntersuchung ließen sich eine Reihe von Assoziationen feststellen (Tabelle 6.4).

**Tab.6.4:** Übersicht Ergebnisse PCBp2

Marker/ Haplotyp	Assoziation mit AD			Assoziation mit Endophänotypen		
	GESAMT	EOAD	LOAD	GESAMT	EOAD	LOAD
rs1683152	ns	ns	ns	T↑ (MMSE) p = 0,003 <b>T↑ (BNT)</b> p = 0,019 <b>T↑ (WA)</b> p = 0,011 <b>T↑ (WW)</b> p = 0,039	<b>C↑ (WW)</b> p = 0,088	T↑ (WA) p = 0,023
rs784566	ns	ns	ns	<b>G↑ (MMSE)</b> p = 0,002 <b>G↑ (BNT)</b> p = 0,035 <b>G↑ (WA)</b> p = 0,018	ns	<b>G↑ (WA)</b> p = 0,030
rs11170562	ns	ns	ns	<b>A↑ (MMSE)</b> p = 0,002 <b>A↑ (BNT)</b> p = 0,011 <b>A↑ (WA)</b> p = 0,017	<b>A↑ (BNT)</b> p = 0,025 <b>A↑ (WW)</b> p = 0,055	<b>A↑ (WA)</b> p = 0,033
rs784563	<b>G↑</b> p* = 0,041	ns	ns	<b>T↑ (BNT)</b> p = 0,025	<b>T (WA)</b> p* = 0,026	ns
rs2249381	<b>G↑</b> p* = 0,042	ns	ns	<b>A↑ (BNT)</b> p = 0,025	<b>A↑ (BNT)</b> p = 0,037 <b>A↑ (WA)</b> p = 0,082	ns
rs1716966*	ns	ns	ns	T↑ (MMSE) p = 0,031 <b>T↑ (WA)</b> p = 0,032 <b>T↑ (BNT)</b> p = 0,029	<b>T↑ (BNT)</b> p = 0,048 <b>C↑ (WA)</b> p = 0,020	ns
rs1683152/ rs784566/ rs11170562/ rs784563/ rs2249381/ rs1716966	-	<b>TGATAT↓</b> p = 0,045	ns	ns	<b>TGATAT↑</b> (MMSE) p = 0,069 <b>CAGGGC↓</b> (MMSE) p = 0,028	<b>CAGGGC↓</b> (WA) p = 0,019

Assoziation mit AD: ↑ = Allel/Haplotyp signifikant häufiger im Patientenkollektiv ; ↓ = Allel/Haplotyp signifikant seltener im Patientenkollektiv; ns = nicht signifikant; Assoziation mit Endophänotypen: ↑ = Allel/Haplotyp mit signifikant besserer Leistung; ↓ = Allel/Haplotyp mit signifikant schlechterer Leistung; - = nicht berechnet; MMSE = Mini Mental State Examination; WW = Wortliste wiedererkennen (CERAD); WA = Wortliste abrufen (CERAD); BNT = Boston Naming Test; p = p-Wert additives Modell; p\* = p-Wert dominantes Modell

Die Übersichtstabelle verdeutlicht, dass auf PCBP2 alle 6 SNPs signifikante Assoziationen mit der Gedächtnisleistung aufwiesen. Für rs1683152 konnte das T-Allel in der Gesamtgruppe der Patienten, sowie im LOAD-Kollektiv, mit einer besseren Punktwertung in der Gedächtnisleistung und in der Wortfindung assoziiert werden. Einzig in der EOAD-Gruppe zeigten C-Träger eine bessere Leistung in der Wortliste-Wiedererkennen-Aufgabe.

Auch für rs784563 und rs1716966 zeigten T-Träger eine bessere Leistung in den Gedächtnisaufgaben, während für rs1716966 in der EOAD-Gruppe das C-Allel im Wortliste-Abrufen-/item mit einem besseren Ergebnis assoziiert war.

In beiden Fällen können nun entweder tatsächlich unterschiedliche Allelkombinationen unterschiedliche Risikovarianten darstellen, oder aber es handelt sich um falsch-positive Ergebnisse, die insbesondere durch den kleineren Stichprobenumfang in der EOAD-Gruppe ( $n$  (rs1716966) = 85;  $n$  (rs784563) = 77) bedingt sind.

Auf rs11170562 konnte in allen drei Analysegruppen das häufigere A-Allel mit einer besseren Leistung in den Aufgaben zur Wortliste und dem *Boston Naming Test* (CERAD), sowie im MMSE assoziiert werden.

Die beiden Allele, die eine signifikante Assoziation mit Alzheimer aufwiesen, zeigten in der Endophänotypenstudie kohärente Ergebnisse: Da sich in beiden Fällen (rs784563 und rs2249381) jeweils überzufällig mehr G-Träger im Patientenkollektiv befanden, konnten die Träger des jeweils anderen Allels (T und A) mit einer besseren Gedächtnis- und Wortfindungsleistung assoziiert werden.

Alle auf PCBP2 untersuchten 6 SNPs befanden sich im Kopplungsungleichgewicht. Die Haplotypanalyse ergab eine signifikante Assoziation mit der Allelkombination TGATAT und dem Alzheimer-Phänotyp. Dieselbe Kombination war mit einer besseren Leistung im MMSE in Verbindung zu bringen. CAGGGC war hingegen mit einer schlechteren Gedächtnisleistung assoziiert.

Auch auf diesem Gen, das insbesondere in Spleißprozessen, der Regulierung von MAVS und der zellulären Immunreaktion involviert ist, ist eine Assoziation mit der Alzheimer Demenz gut vorstellbar. Sowohl mitochondriale Fehlfunktion als auch immunologische Faktoren werden als Pathomechanismen der AD diskutiert (Ishii und Haga, 1976; Akiyama et al., 2000; Eikelenboom und Stam, 1982; Eikelenboom et al., 1988; McGeer et al., 1989; Mecocci et al., 1994; Good et al., 1996).

Die untersuchten intronischen SNPs auf PCBP2 könnten indirekt regulatorische Sequenzen beeinflussen, die eine veränderte Isoformkomposition des PCBP2-Proteins nach sich ziehen, bzw. im Kopplungsungleichgewicht mit funktionellen Varianten liegen. Die in der Folge exprimierten, fehlfunktionierenden PCBP2-Proteine können als negativer Regulationsfaktor der MAVS diese möglicherweise nicht mehr richtig regulieren, was eine schädliche Immunantwort zur Folge hätte. Es ist bekannt, dass Über- bzw. Unterexpression von PCBP2 die Aufhebung der adequaten zellulären Antwort bei viraler Überexpression zur Folge hat (You et al., 2009) und eine inadäquate Immunantwort in Bezug auf Art, Stärke und Dauer schwerwiegende chronische Erkrankungen bzw. Gewebsschädigungen zur Folge haben kann.

Da in den vorliegenden Ergebnisse zwei Marker mit dem Alzheimer'schen Phänotyp und insgesamt für alle sechs SNPs bestimmte Allele mit einer signifikant besseren oder schlechteren Gedächtnisleistung assoziiert werden konnten, deutet dies auf eine mögliche Verbindung zwischen PCBP2 und der AD bzw. der Gedächtnisleistung hin. Aus Mangel an vergleichbaren Studien, ist eine gegenwärtige Interpretation der Resultate schwierig.

Nachdem oxidativer Stress und damit die Mitochondrien zunehmend in den Fokus der Alzheimerforschung geraten sind, wären weiterführende Assoziationsstudien zu PCBP2 mit einer überzeugenden Individuenzahl von Relevanz.

## 6.4 ELAVL4

Das auf Chromsom 1 befindliche ELAVL4 ist ein weiteres, allerdings nicht zur Familie der hnRNPs gehörendes RNA-bindendes Protein. ELAVL4 wird in Neuronen exprimiert und fungiert dort als Regulator diverser mRNA-assozierter Prozesse. In der vorliegenden Studie konnten zwei Marker (rs12024093 und rs3009113) mit dem Alzheimer-Phänotyp assoziiert werden. Für rs12024093 kamen A-Allel-Träger weniger häufig im Patientenkollektiv vor, dafür befanden sich signifikant häufiger G-Allel-Träger in der EOAD-Gruppe. Bei rs3009113 konnten vermehrt T-Träger in der Gesamtgruppe der Alzheimerpatienten, ebenso wie in der EOAD- bzw. LOAD-Gruppe identifiziert werden (Tabelle 6.5).

In der Assoziation mit kognitiven Endophänotypen zeigte sich neben rs913858 die Haplotypeanalyse signifikant: für rs913858 war das A-Allel mit einer besseren Leistung im Gesamt- und im LOAD-Kollektiv im Hinblick auf die Gedächtnisleistung assoziiert.

Die Allelstruktur GG auf dem ersten Haplotypblock (rs4412638 und rs12024093) konnte in der Fall-Kontroll-Analyse mit AD assoziiert werden. In der Endophänotypenauswertung war dieselbe Kombination mit einer schlechteren Leistung im MMSE (EOAD) assoziiert. Beim zweiten Haplotypblock bestehend aus rs3009113 und rs913858 kam die CG-Kombination tendenziell seltener im Patientenkollektiv der LOAD vor und konnte mit einer besseren Leistung im MMSE assoziiert werden. Die TG-Allelkombination zeigte eine schlechtere Performance in diversen Gedächtnisaufgaben.

**Tab.6.5:** Übersicht Ergebnisse ELAVL4

Marker/ Haplotyp	Assoziation mit AD			Assoziation mit Endophänotypen		
	GESAMT	EOAD	LOAD	GESAMT	EOAD	LOAD
rs4412638	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rs12024093	A↓ p***= 0,017	G↑ p***= 0,018	ns	ns	ns	ns
rs12043872	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rs3009113	T↑ p**= 0,002	T↑ p**= 0,029	T↑ p**= 0,012	ns	ns	ns
rs913858	ns	ns	ns	A↑ (Wsum) p = 0,088 A↑ (WA) p = 0,035	G↑ (BNT) p* = 0,017	A↑ (Wsum) p = 0,019 A↑ (WA) p = 0,019
rs4412638/ rs12024093	-	GG↑ p = 0,017	ns	ns	GG↓ (MMSE) p = 0,004	ns
rs3009113/ rs913858	-	ns	CG↓ p = 0,062	ns	ns	TG↓(MMSE) p = 0,037 CG↑ (MMSE) p = 0,018 TG↓(WA) p = 0,098 TA↑ (WA) p = 0,008

Assoziation mit AD: ↑ = Allel/Haplotyp signifikant häufiger im Patientenkollektiv ; ↓ = Allel/Haplotyp signifikant seltener im Patientenkollektiv; ↓↑/↑↓ = Trend; ns = nicht signifikant; Assoziation mit Endophänotypen: ↑ = Allel/Haplotyp mit signifikant besserer Leistung; ↓ = Allel/Haplotyp mit signifikant schlechterer Leistung; - = nicht berechnet; MMSE = Mini Mental State Examination; WW = Wortliste wiedererkennen (CERAD); WA = Wortliste abrufen (CERAD); Wsum = Gesamtergebnis der drei Durchgänge Wortliste lernen (CERAD); BNT = Boston Naming Test; p = p-Wert additives Modell; p\* = p-Wert rezessives Modell; p\*\* = p-Wert dominantes Modell; p\*\*\* = p-Wert Allelverteilung

In einer amerikanischen genomweiten Assoziationsstudie wurde ELAVL4 mit depressiven LOAD-Fällen assoziiert (Naj et al., 2009). Obwohl es neben den Genen SORL1 (*sortilin-related receptor L (DLR class) A repeats-containing*), VDR (*vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor*) und WWC1 (*WW and C2 domain containing*) als möglicher Suszeptibilitätslocus galt, wurden die Befunde zu ELAVL4 bisher in keiner weiterführenden Studie repliziert, noch sind Negativergebnisse zu diesem Gen publiziert. Da die Studie an einem nicht genauer definierten amerikanischen Kollektiv durchgeführt wurde, kann zwar insgesamt von einem zur vorliegenden Studie vergleichbaren Genpool ausgegangen werden, allerdings müssen bei dem Ergebnis Populationsstratifizierungen in Betracht gezogen werden. Eine Assoziation von ELAVL4 mit ausschließlich depressiven LOAD-Fällen konnte in vorliegender Arbeit nicht gestellt werden.

Da ELAVL4 in dieser Arbeit neben einer grundsätzlichen Assoziation mit AD insbesondere mit unterschiedlichen Gedächtnisleistungen in Verbindung gebracht werden konnte, ist die Assoziation dieses Gens mit einer veränderten Gedächtnisleistung im Rahmen der AD gut vorstellbar. Dafür spricht in weiteren Befundanalysen, dass eine Überexpression von ELAVL4 bei Mäusen mit Gedächtnistraining beobachtet werden konnte (Bolognani et al., 2007). Inwiefern ELAVL4 als Protein die Gedächtniskapazität mitmoduliert, ist bislang nicht klar, eine veränderte Spleißaktivität könnte auch im Fall von ELAVL4 zu neuronenschädigenden Folgen führen.

## 6.5 Inhaltliche Interpretation der Ergebnisse

Die vorliegende Studie konnte die Rolle der 19 Marker auf den vier untersuchten Genen insgesamt nicht abschließend beantworten. Eine grundsätzlich mögliche Assoziation mit der Alzheimer Demenz und der Gedächtnisleistung ist aufgrund der vorliegenden Analysen insbesondere bei ELAVL4, PCBP2 und HNRNPA2B1 zu vermuten. Die untersuchten Marker auf HNRNPH3 können aufgrund der Ergebnisse in der hier untersuchten Population weder mit AD, noch mit veränderten Gedächtnisleistungen assoziiert werden.

SNPs in nicht-kodierenden Bereichen können durch multiple Mechanismen (beispielsweise der Veränderung von Polyadenylierung- oder

Spleißfaktorbindungsstellen) regulatorische Sequenzen beeinflussen bzw. die Transkriptionsrate oder den Spleißprozess verändern.

Zudem können intronische SNPs im Kopplungsungleichgewicht mit funktionellen Polymorphismen sein, die sich in codierenden Regionen bzw. Spleißstellen befinden. Um eine zuverlässige Interpretation über die Funktionalität der intronischen SNPs treffen zu können, sind weiterführende Studien, die in ihre Analyse auch möglichst funktionelle SNPs miteinschließen, vonnöten. Umfangreiche Haplotypanalysen könnten des Weiteren Aufschluss darüber geben, ob die intronischen SNPs im Kopplungsungleichgewicht mit funktionalen Polymorphismen liegen. In den letzten Jahren wurden vermehrt Studien veröffentlicht, die auf eine Beteiligung intronischer SNPs an der AD hindeuten. Insgesamt wird deutlich, dass SNPs, die in nicht-codierenden Bereichen der DNA liegen, durch spezifische Mechanismen indirekt auf die Proteinexpression einwirken und damit einen bedeutenden Beitrag in der Entwicklung komplexer Erkrankungen leisten.

Welche Auswirkungen die Aktivität verschiedener RBPs auf die AD hat, ist bislang nicht bekannt. Mutationen in unterschiedlichen RBP-assoziierten Genen können für den gesamten RNP-Komplex, bestehend aus RNA und RBPs, bedeutsam sein. Die bislang identifizierten Erkrankungen, verursacht durch die RBP-Gene, reichen von Krebserkrankungen bis hin zu neurodegenerativen Phänotypen. Wie folgeschwer beispielweise Fehlspleißen sein kann, wird am Beispiel der Mutationen im MAPT-Gen offensichtlich: diese führen zur FDTL (Coppola et al., 2012). Insgesamt wird in zunehmendem Maße deutlich, dass Fehlregulationen von RNA-bindenden-Proteinen die Zelle empfindlich aus dem Gleichgewicht bringen und zu schwerwiegenden Krankheiten führen können. Kommt es durch Mutationen zu einer Veränderung von regulatorischen Elementen bzw. von Spleißosomkomponenten, können unterschiedliche Krankheitsbilder mit heterogenen Symptomen ausgebildet werden. Entsprechend ist daher vorstellbar, dass auch bei der AD Mutationen, die eine veränderte Protein-RNA-Interaktion zur Folge haben, zur Ausprägung der Krankheit beitragen.

## 6.6 Diskussion der Methoden

### 6.6.1 Diagnoseverfahren und Einschlusskriterien

In der hier vorliegenden Untersuchung wurden ausschließlich Patienten eingeschlossen, die nach den aktuellen NINCDS-ADRDA Kriterien an einer "wahrscheinlichen" Alzheimer Demenz erkrankt sind (Dubois et al., 2007) oder einen begründeten Verdacht auf eine solche aufwiesen. Personen mit schwerwiegenden somatischen oder psychiatrischen Erkrankungen wurden zwar ausgeschlossen, allerdings sind psychiatrische Begleitsymptome wie beispielsweise Depression, Schlaflosigkeit oder Halluzinationen mit der Diagnose einer AD vereinbar. Zudem gilt zu bedenken, dass bei Patienten mit einem begründetem Verdacht auf AD u.a. vaskuläre Ko-Pathologien nicht völlig ausgeschlossen werden können, welche neben den AD-typischen Veränderungen die kognitiven Einbußen möglicherweise mitbedingen.

Grundsätzlich gestaltet sich die Diagnose der AD aufgrund ihres heterogenen Phänotyps und der bislang nicht vollständig definierten Ätiologie schwierig. Während eine definitive Diagnose erst durch histopathologische Befundstellung *post mortem* erfolgen kann, ist eine Klassifizierung der Patienten nach ihrem Alter bei Krankheitsausbruch im Sinne einer einheitlicheren Gruppierung sinnvoll. Die Unterteilung der Patienten in *early-* bzw. *late-onset* folgte in der vorliegenden Studie nach der ICD-10 Definition: beginnt die AD vor dem 65. Lebensjahr wird von einem frühen Beginn gesprochen, nach 65 handelt es sich um eine AD mit spätem Beginn. Während es sich bei einem geringen Prozentsatz der AD um eine monogene Erkrankung handelt, deren Vererbung nach den Gesetzen von Mendel erfolgt, handelt es sich beim Großteil der *early-* und *late-onset* Fälle um die nichterbliche-sporadische Form der AD. Sowohl bei der frühen, als auch bei der späten Form der AD handelt es sich unabhängig vom Alter bei Krankheitsausbruch um eine ätiologisch homogene Erkrankung. Wenngleich klinisch sehr ähnlich, konnten bei *early-onset* Patienten häufiger apraxische und visuospatiale Defizite verglichen mit *late-onset* Patienten festgestellt werden (Koedam et al., 2010).

Grundsätzlich sind die Kriterien der drei gängigen Diagnostikmanuale (ICD-10, DSM-IV und NINCDS-ADRDA) ähnlich, sodass die Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Studien gegeben ist.

## **6.6.2 Ethnische Abstammung**

Genetische Untersuchungen bedürfen einer möglichst einheitlichen ethnischen Abstammung der Stichprobe, um populationsspezifische Differenzen mit falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen in der Allel- und Genotypfrequenz auszuschließen. Um Populationsstratifikationen in der vorliegenden Untersuchung zu vermeiden, umfasst die untersuchte Stichprobe ausschließlich ein kaukasisches Patienten- und Probandenkollektiv. Nicht-kaukasische Personen wurden von der Studie ausgeschlossen.

Um die gegebenen Allel- und Genotypfrequenzen des untersuchten Kollektivs mit unterschiedlichen Populationen vergleichen zu können und grobe Abweichungen von den Durchschnittswerten auszuschließen, wurden zum Vergleich die Angaben des HapMap Projects (hapmap, 2009) herangezogen.

Das internationale HapMap-Forschungsprojekt kartographiert die Haplotypen des menschlichen Genoms in unterschiedlichen ethnischen Populationen und stellt die Daten frei zur Verfügung. Gegenwärtig sind die Allel- und Genotypfrequenzen von elf unterschiedlichen Populationen erfasst. Zum Vergleich mit den vorliegenden Daten wurden die Daten der Einwohner aus UTAH (USA) mit Vorfahren aus Nord- und Westeuropa, und der Gruppe Italiener aus der Toskana herangezogen. Die Allelfrequenzen der vorliegenden Arbeit weichen nur geringfügig von den Daten der HapMap-Daten ab und können insgesamt als reliabel befunden werden.

**Tab.7.6:** HapMap Allelfrequenzen im Vergleich zur vorliegenden Studie (Hapmap, 2003)

SNP	CEU	TSI	Vorliegende Studie
	Minore AF	Minore AF	Minore AF
<b>rs4412638</b>	0,243	0,248	0,240
<b>rs12024093</b>	0,181	0,176	0,190
<b>rs12043872</b>	0,062	0,044	0,049
<b>rs3009113</b>	0,372	0,358	0,376
<b>rs913858</b>	0,188	n.a.	0,202
<b>rs12113404</b>	0,097	0,142	0,098
<b>rs12672536</b>	0,097	0,142	0,092
<b>rs4722589</b>	0,102	0,088	0,090
<b>rs10998072</b>	0,084	0,064	0,080
<b>rs10998076</b>	0,067	0,044	0,038
<b>rs1162757</b>	0,125	0,149	0,154
<b>rs16925347</b>	0,103	n.a.	0,097
<b>rs1162756</b>	0,015	n.a.	0,051
<b>rs1683152</b>	n.a.	n.a.	0,305
<b>rs784566</b>	0,274	0,333	0,304
<b>rs11170562</b>	0,274	0,333	0,305
<b>rs784563</b>	0,425	0,461	0,469
<b>rs2249381</b>	0,419	0,460	0,480
<b>rs1716966</b>	0,531	0,490	0,495

CEU = Einwohner aus Utah (USA) mit Vorfahren aus Nord- und Westeuropa; TSI = Italiener aus der Toskana; AF = Allelfrequenz; n.a. = nicht angegeben

### 6.6.3 Studiendesign

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Häufigkeiten von 19 Markerallelen bei Patienten mit AD und gesunden Kontrollprobanden in einer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie verglichen, um das relative Erkrankungsrisiko ausgehend von diesen Allelen abzuschätzen. Um die statistische Aussagekraft zu erhöhen, und eventuelle Assoziationen aufzudecken, wurde die Untersuchung auf Haplotypen ausgeweitet.

Bei den untersuchten genetischen Markern handelt es sich in dieser Studie um SNPs, die neben Mikrosatelliten im Mittelpunkt vieler humangenetischer Untersuchungen stehen. SNPs sind kleinste Veränderungen in der Abfolge der vier Komplementärbasen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) in der DNA-

Sequenz.

Viele publizierte Ergebnisse genetischer Studien lassen sich gerade bei komplexen Erkrankungen, die durch das Zusammenspiel genetischer Faktoren und Umwelteinflüsse gekennzeichnet sind, oftmals nicht replizieren. Generell lässt sich feststellen, dass in vielen Studien die Assoziation zwischen Gen und Erkrankung überschätzt wird, wobei insgesamt beobachtet werden kann, dass die jeweils erste Studie einen höheren genetischen Effekt postuliert, als die Nachfolgenden replizieren können (Ioannidis et al., 2001; McCarthy et al., 2008). Aus diesem Grund ist es wichtig, auf die Güte und Qualität der durchzuführenden Studie zu achten, um die Aussagefähigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erhöhen. Insbesondere sind Populationsstratifikationen an kleinen Stichproben zu vermeiden.

In vorliegender Studie wurde dem Problem der Populationsstratifikation durch eine sorgfältige Auswahl von ethnisch vergleichbaren und ausschließlich kaukasischen Probanden vorgebeugt. Eine weitere Unterteilung der Patienten in *early-* bzw. *late-onset* sollte der homogeneren Subgruppierung dienen, und eine aussagekräftigere Assoziation der genetischen Vulnerabilitätsmarker ermöglichen. Zudem wurden ausschließlich Patienten eingeschlossen, die keine schwerwiegenden psychiatrischen oder somatischen Komorbiditäten aufwiesen. Eine zusätzliche Unterteilung nach klinischem Erscheinungsbild konnte im Rahmen dieser Studie nicht vorgenommen werden.

Ein weiteres Problem in der Auswahl der Patienten stellte sich insbesondere durch die Tatsache, dass die gängigen Klassifikationssystemen (NINCDS-ADRDA, ICD-10 und DSM-V) die ätiologische und klinische Heterogenität der AD nicht ausreichend berücksichtigen. Das Konzept der Endophänotypen steht als intermediäres Erscheinungsbild zwischen dem multiplen Genotyp und der heterogenen Krankheitssymptomatik und trägt zum molekulargenetischen Verständnis komplexer Erkrankungen bei. Endophänotypen sind als intermediärer Phänotyp genetisch weniger komplex determiniert, als die Erkrankung in der Summe ihrer klinischen Merkmale. Aus diesem Grund eignen sie sich zur Identifikation von Vulnerabilitätsmarkern auf der Suche nach Suszeptibilitätsgenen für eine bestimmte Erkrankung. Für diese Studie wurde ein Kernsymptom der AD, nämlich Gedächtnissstörungen, als endophänotypischer Marker ausgewählt. Diese wurden mittels standardisierten Tests objektiviert und einer vergleichbaren Norm entsprechend ausgewertet.

Zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie liegen keine ausreichenden Referenzstudien mit vergleichbarem Studiendesign vor, an denen sich die Ergebnisse orientieren könnten. Um falsch-positive Ergebnisse der untersuchten Population ausschließen zu können, und den Einfluss der vier Gene HNRNPA2B1, HNRNPH3, PCBP2 und ELAVL4 auf die Alzheimer Demenz abschließend klären zu können, sind weiterführende Studien mit zusätzlichen exonischen Markern an einer großen Individuenzahl vonnöten.

## 6.7 Ausblick

Die Alzheimerforschung ist trotz großer Bemühungen in den letzten Jahrzehnten immer wieder an ihre Grenzen gestoßen: bisweilen identifizierte geglaubte Pathomechanismen zeigten in therapeutischen Ansätzen teilweise wenig bis keinerlei Verbesserung der klinischen Symptomatik. Die zunehmende Verschiebung des Forschungsfokus weg von amyloidogenen und tauspezifischen Mechanismen hin zu neuen Modellen - die von gastrointestinalen über mitochondriale bis hin zu prionenartigen Erklärungsansätzen reichen – spiegelt die Schwierigkeiten wider, die die ätiologische Erforschung einer komplexen und multifaktoriellen Erkrankung mit sich bringt.

Eine große Herausforderung ist dabei, die Heterogenität der Erkrankung zu berücksichtigen. Die Alzheimer Demenz ist mannigfaltig in Klinik, Progredienz und Pathologie. Alzheimer-Patienten sind unterschiedlichen Risikofaktoren ausgesetzt, haben unterschiedliche Symptome, Komorbiditäten, Lebensstile und genetische Prädispositionen. Die Identifizierung von Pathomechanismen im alterndem Gehirn, und vor allem aber die kausale Verknüpfung der Befunde mit einem bestimmten Phänotyp ist demnach von vorstellbarer Schwierigkeit.

Genetische Untersuchungen können hier einen großen Beitrag leisten, da mit zunehmenden Verständnis der Funktionalität der Gene auf ursächliche Prozesse geschlossen werden kann, die nur schwer im bereits neurodegenerativ veränderten Gewebe bei Diagnosestellung nachgewiesen werden können. Die Identifikation der mit AD assoziierten Suszeptibilitätsgenen ist dabei der erste Schritt, um bislang unbekannte molekulare *Pathways*, die möglicherweise die Entstehung der AD begünstigen, zu erfassen. Mit einem besseren Verständnis der AD-Pathogenese geht insbesondere die Hoffnung einher, frühe zuverlässige Diagnosestellung und

präventive Interventionen zu ermöglichen, um der steigenden Inzidenzrate entgegenzuwirken.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin
aao	<i>age at onset</i> (Alter bei Krankheitsausbruch)
AD	Alzheimer Demenz
ADD	additives Modell
Allel A1	Allel mit der geringeren Stichprobenfrequenz
Allel A2	Allel mit der häufigeren Stichprobenfrequenz
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid Receptor
APOE, ApoE	Apolipoprotein (Gen bzw. Protein)
APP	Amyloid-Precursor-Protein
AS	Aminosäure
A $\beta$	Amyloid Beta
C	Cytosin
CBD	Kortikobasale Degeneration
CERAD	<i>Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i>
CT	Computertomographie
ddNTB	Didesoxiribonukleosid-Triphosphat
DEGAM	Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOM	dominantes Modell
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Fourth Edition) der American Psychiatric Organisation
EDTA	Ethyldiaminetetraessigsäure
EEG	Elektro Enzephalogramm
ELAVL4	ELAV-Like Neuron-Specific RNA Binding Protein 4
EOAD	Early-Onset Alzheimer's Disease
FAD	Familiäre Alzheimer Demenz
fMRT	Funktionelle Magnetresonanztomographie
FTLD	Frontotemporale Lobärdegeneration
G	Guanin
GWA	Genomweite Assoziationsstudie
hnRNA	heterogeneous nuclear ribonucleic acid (prä-mRNA)

hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (heterogene nukleäre Ribonukleoproteine)
hnRNPA2B1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein A2/B1)
hnRNPH3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein H3)
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
KH Domäne	K homology domain (K-Homologie-Domäne)
LD	Linkage Disequilibrium
LKS	Leichte kognitive Störung
LOAD	Late-Onset Alzheimer's Disease
LTD	long term depression (Langzeitdepression)
LTP	long term potentiation (Langzeitpotenzierung)
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization - time-of-flight
MAP	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
MAVS	Mitochondrial Antiviral Signaling Protein
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
mtDNA	mitochondriale DNA
NB	Nukleus basalis (Meynert, Ch4)
nDNA	<i>nuclear deoxyribonucleic acid</i>
NFT	Neurofibrillary Tangles
NINCDS-ADRDA	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
nM	Nanomol
NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartate</i>
PCBP2	<i>Poly(rC)-binding protein 2</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PHF	<i>paired helical filaments</i>
PS1, PS2	Präsenilin 1, 2
RBD	<i>RNA-binding domain</i> (RNA-bindende Domäne)
RBP	<i>RNA-binding proteins</i> (RNA-bindende Proteine)
REZ	rezessives Modell
RNA	Ribonukleinsäure

ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
SKID I, II	Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV Achse I, II
SNP	<i>Single Nucleotid Polymorphism</i>
snRNA, snRNP	<i>small nuclear ribonucleic acid, particles</i>
T	Tymin
UTR	untranslatierter Bereich
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem

## 8 Literaturverzeichnis

Aebi C. Validierung der neuropsychologischen Testbatterie CERAD-NP: eine Multi-Center Studie. *Diss. University of Basel.* 2002.

Aguero-Torres H, Kivipelto M, von Strauss E. Rethinking the dementia diagnoses in a population-based study: what is Alzheimer's disease and what is vascular dementia?. A study from the kungsholmen project. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2006;22(3):244-9.

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2000 May-Jun;21(3):383-421.

Akten B, Kye MJ, Hao le T, Wertz MH, Singh S, Nie D, Huang J, Merianda TT, Twiss JL, Beattie CE, Steen JA, Sahin M. Interaction of survival of motor neuron (SMN) and HuD proteins with mRNA cpg15 rescues motor neuron axonal deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jun 21;108(25):10337-42.

Alberti S, Halfmann R, King O, Kapila A, Lindquist S. A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins. *Cell.* 2009 Apr 3;137(1):146-58.

Alzheimer A. Über einen eigenartigen schweren Krankheitsprozess der Hirnrinde." *Zentralblatt für Nervenkrankheiten.* 1906 25: 1134.

Alzheimer A. Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie.* 1911 4: 356-385.

Amadio M, Pascale A, Wang J, Ho L, Quattrone A, Gandy S, Haroutunian V, Racchi M, Pasinetti GM. nELAV proteins alteration in Alzheimer's disease brain: a novel putative target for amyloid-beta reverberating on AbetaPP processing. *J Alzheimers Dis.* 2009;16(2):409-19.

Anantharaman V, Koonin EV, Aravind L. Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism. *Nucleic Acids Res.* 2002 Apr 1;30(7):1427-64.

Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, von Arnim CA, Breiderhoff T, Jansen P, Wu X, Bales KR, Cappai R, Masters CL, Gliemann J, Mufson EJ, Hyman BT, Paul SM, Nykjaer A, Willnow TE. Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 20;102(38):13461-6.

Anderson KD, Merhege MA, Morin M, Bolognani F, Perrone-Bizzozero NI. Increased expression and localization of the RNA-binding protein HuD and GAP-43 mRNA to cytoplasmic granules in DRG neurons during nerve regeneration. *Exp Neurol.* 2003 Sep;183(1):100-8.

Anselmo A. Aurelia Anselmi Mantuani Gerocomica sive de senum regimine opus Non modo Philosophis & Medicis gratum, sed omnibus hominibus utile. 1606.

Antic D, Keene JD. Messenger ribonucleoprotein complexes containing human ELAV proteins: interactions with cytoskeleton and translational apparatus. *J Cell Sci.* 1998 Jan;111 ( Pt 2):183-97.

Apelt J, Schliebs R. Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. *Brain Res.* 2001 Mar 9;894(1):21-30.

Araujo DM, Cotman CW. Beta-amyloid stimulates glial cells in vitro to produce growth factors that accumulate in senile plaques in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1992 Jan 8;569(1):141-5.

Ashford JW. APOE genotype effects on Alzheimer's disease onset and epidemiology. *J Mol Neurosci.* 2004;23(3):157-65. Review.

Bagyinszky E, Youn YC, An SS, Kim S. The genetics of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging.* 2014 Apr 1;9:535-51.

Bandziulis RJ, Swanson MS, Dreyfuss G. RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes Dev.* 1989 Apr;3(4):431-7. Review.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haplovew: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005 Jan 15;21(2):263-5.

Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science.* 1982 Jul 30;217(4558):408-14. Review.

Bauer J, Strauss S, Schreiter-Gasser U, Ganter U, Schlegel P, Witt I, Yolk B, Berger M. Interleukin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices. *FEBS Lett.* 1991 Jul 8;285(1):111-4.

Berrios GE. Dementia during the seventeenth and eighteenth centuries: a conceptual history. *Psychol Med.* 1987 Nov;17(4):829-37.

Berson A, Barbash S, Shaltiel G, Goll Y, Hanin G, Greenberg DS, Ketzef M, Becker AJ, Friedman A, Soreq H. Cholinergic-associated loss of hnRNP-A/B in Alzheimer's disease impairs cortical splicing and cognitive function in mice. *EMBO Mol Med*. 2012 Aug;4(8):730-42.

Berthier ML, Leiguarda R, Starkstein SE, Sevlever G, Taratuto AL. Alzheimer's disease in a patient with posterior cortical atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1991 Dec;54(12):1110-1.

Bielschowsky M. Zur Kenntnis der Alzheimerschen Krankheit (präsenilen Demenz mit Herdsymptomen). 1911, *J Psychol Neurol* 18: 1-20.

Birney E, Kumar S, Krainer AR. Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res*. 1993 Dec 25;21(25):5803-16.

Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:291-336. Epub 2003 Feb 27. Review.

Blocq P, Babes V, Marinesco G. Atlas der pathologischen Histologie des Nervensystems. *Berlin: Hirschwald*, 1892.

Bolognani F, Qiu S, Tanner DC, Paik J, Perrone-Bizzozero NI, Weeber EJ. Associative and spatial learning and memory deficits in transgenic mice overexpressing the RNA-binding protein HuD. *Neurobiol Learn Mem*. 2007 May;87(4):635-43.

Bondareff W, Mountjoy CQ, Roth M, Hauser DL. Neurofibrillary degeneration and neuronal loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1989 Nov-Dec;10(6):709-15.

Bonfiglio F. Di speciali reperti in un caso di probabile sifilide cerebrale. *Tipografia di Stefano Calderini e Figlio*, 1908.

Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82(4):239-59.

Braak H, Braak E. Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl*. 1996;165:3-12.

Braak H, Braak E. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*. 1998;53:127-40.

Breteler MM. Vascular involvement in cognitive decline and dementia. Epidemiologic evidence from the Rotterdam Study and the Rotterdam Scan Study. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 Apr;903:457-65.

Brun A, Englund E. Regional pattern of degeneration in Alzheimer's disease: neuronal loss and histopathological grading. *Histopathology*. 1981 Sep;5(5):549-64.

Burd CG, Dreyfuss G. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*. 1994 Jul 29;265(5172):615-21.

Busciglio J, Lorenzo A, Yankner BA. Methodological variables in the assessment of beta amyloid neurotoxicity. *Neurobiol Aging*. 1992 Sep-Oct;13(5):609-12.

Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med*. 2001 Dec;7(12):548-54.

Butterfield DA. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res*. 2002 Dec;36(12):1307-13.

Calkins MJ, Reddy PH. Amyloid beta impairs mitochondrial anterograde transport and degenerates synapses in Alzheimer's disease neurons. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Apr;1812(4):507-13.

Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, Thomas-Anterion C, Michon A, Martin C, Charbonnier F, Raux G, Camuzat A, Penet C, Mesnage V, Martinez M, Clerget-Darpoux F, Brice A, Frebourg T. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet*. 1999 Sep;65(3):664-70.

Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O, van der Kolk N, Vingtdeux V, van de Steeg E, Ret G, Canton T, Drobecq H, Clark A, Bonici B, Delacourte A, Benavides J, Schmitz C, Tremp G, Bayer TA, Benoit P, Pradier L. Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol*. 2004 Oct;165(4):1289-300.

Chandler MJ, Lacritz LH, Hynan LS, Barnard HD, Allen G, Deschner M, Weiner MF, Cullum CM. A total score for the CERAD neuropsychological battery. *Neurology*. 2005 Jul 12;65(1):102-6.

Chaudhury A, Chander P, Howe PH. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *RNA*. 2010 Aug;16(8):1449-62.

Chen M, Manley JL. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Nov;10(11):741-54.

Chen Q, Schubert D. Presenilin-interacting proteins. *Expert Rev Mol Med*. 2002 Aug 22;4(19):1-18.

Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*. 2000 Feb;71(2):621S-629S.

Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*. 1992 Dec 17;360(6405):672-4.

Citron M, Vigo-Pelfrey C, Teplow DB, Miller C, Schenk D, Johnston J, Winblad B, Venizelos N, Lannfelt L, Selkoe DJ. Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 6;91(25):11993-7.

Collingridge GL & Bliss TVP. NMDA receptors-their role in long-term potentiation. *Trends Neurosci*. 1987, 10(7), 288-293.

Cooper TA, Wan L, Dreyfuss G. RNA and disease. *Cell*. 2009 Feb 20;136(4):777-93.

Coppola G, Chinnathambi S, Lee JJ, Dombroski BA, Baker MC, Soto-Ortolaza AI, Lee SE, Klein E, Huang AY, Sears R, Lane JR, Karydas AM, Kenet RO, Biernat J, Wang LS, Cotman CW, Decarli CS, Levey AI, Ringman JM, Mendez MF, Chui HC, Le Ber I, Brice A, Lupton MK, Preza E, Lovestone S, Powell J, Graff-Radford N, Petersen RC, Boeve BF, Lippa CF, Bigio EH, Mackenzie I, Finger E, Kertesz A, Caselli RJ, Gearing M, Juncos JL, Ghetti B, Spina S, Bordelon YM, Tourtellotte WW, Frosch MP, Vonsattel JP, Zarow C, Beach TG, Albin RL, Lieberman AP, Lee VM, Trojanowski JQ, Van Deerlin VM, Bird TD, Galasko DR, Masliah E, White CL, Troncoso JC, Hannequin D, Boxer AL, Geschwind MD, Kumar S, Mandelkow EM, Wszolek ZK, Uitti RJ, Dickson DW, Haines JL, Mayeux R, Pericak-Vance MA, Farrer LA; Alzheimer's Disease Genetics Consortium, Ross OA, Rademakers R, Schellenberg GD, Miller BL, Mandelkow E, Geschwind DH. Evidence for a role of the rare p.A152T variant in MAPT in increasing the risk for FTD-spectrum and Alzheimer's diseases. *Hum Mol Genet*. 2012 Aug 1;21(15):3500-12.

Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmeichel DE, Gaskell PC Jr, Rimmier JB, Locke PA, Conneally PM, Schmader KE, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet*. 1994 Jun;7(2):180-4.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmeichel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993 Aug 13;261(5123):921-3.

Cross AJ, Crow TJ, Ferrier IN, Johnson JA, Bloom SR, Corsellis JA. Serotonin receptor changes in dementia of the Alzheimer type. *J Neurochem*. 1984 Dec;43(6):1574-81.

Cruts M, Hendriks L, Van Broeckhoven C. The presenilin genes: a new gene family involved in Alzheimer disease pathology. *Hum Mol Genet*. 1996;5 Spec No:1449-55.

Dalmau J, Furneaux HM, Gralla RJ, Kris MG, Posner JB. Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer--a quantitative western blot analysis. *Ann Neurol.* 1990 May;27(5):544-52.

Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet.* 1976 Dec 25;2(8000):1403.

DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J, Kouri N, Wojtas A, Sengdy P, Hsiung GY, Karydas A, Seeley WW, Josephs KA, Coppola G, Geschwind DH, Wszolek ZK, Feldman H, Knopman DS, Petersen RC, Miller BL, Dickson DW, Boylan KB, Graff-Radford NR, Rademakers R. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron.* 2011 Oct 20;72(2):245-56.

DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol.* 1990 May;27(5):457-64.

DeStefano AL, Latourelle J, Lew MF, Suchowersky O, Klein C, Golbe LI, Mark MH, Growdon JH, Wooten GF, Watts R, Guttman M, Racette BA, Perlmutter JS, Marlor L, Shill HA, Singer C, Goldwurm S, Pezzoli G, Saint-Hilaire MH, Hendricks AE, Gower A, Williamson S, Nagle MW, Wilk JB, Massood T, Huskey KW, Baker KB, Itin I, Litvan I, Nicholson G, Corbett A, Nance M, Drasby E, Isaacson S, Burn DJ, Chinnery PF, Pramstaller PP, Al-Hinti J, Moller AT, Ostergaard K, Sherman SJ, Roxburgh R, Snow B, Slevin JT, Cambi F, Gusella JF, Myers RH. Replication of association between ELAVL4 and Parkinson disease: the GenePD study. *Hum Genet.* 2008 Aug;124(1):95-9.

Di Paola M, Spalletta G, Caltagirone C. In vivo structural neuroanatomy of corpus callosum in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment using different MRI techniques: a review. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(1):67-95.

Drachman DA, Leavitt J. Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch Neurol.* 1974 Feb;30(2):113-21.

Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Mar;3(3):195-205.

Dreyfuss G, Matunis MJ, Piñol-Roma S, Burd CG. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:289-321.

Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S,

Stern Y, Visser PJ, Scheltens P. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol*. 2007 Aug;6(8):734-46.

Eikelenboom P, Stam FC. Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. An immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol*. 1982;57(2-3):239-42.

Eikelenboom P, Hack CE, Rozemuller JM, Stam FC. Complement activation in amyloid plaques in Alzheimer's dementia. *Virchows Archiv B*. 1988, 56(1), 259-262.

Esquirol JE. Des Maladies Mentales. *Paris, Baillière*, 1838.

Expert-Bezançon A, Sureau A, Durosay P, Salesse R, Groeneveld H, Lecaer JP, Marie J. hnRNP A1 and the SR proteins ASF/SF2 and SC35 have antagonistic functions in splicing of beta-tropomyosin exon 6B. *J Biol Chem*. 2004 Sep 10;279(37):38249-59.

Feng Y, Wang X. Antioxidant therapies for Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:472932.

Fischer O. Miliare Nekrosen mit drusigen Wucherungen der Neurofibrillen, eine regelmaessige Veränderung der Hirnrinde bei seniler Demenz. *Monatszeitschrift für Psychiatrie und Neurologie*. 1907, 22:361-72.

Fischer O. Die presbyophrene Demenz, deren anatomische Grundlage und klinische Abgrenzung. *Neurol Psychiat*. 1910, 3:371-471

Förstl, H. (Ed.). (2009). *Demenzen in Theorie und Praxis*. Springer.

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975 Nov;12(3):189-98.

Foßgreen A. Funktionelle Analyse des Amyloid Vorläuferproteins (APP) der Alzheimer Krankheit in *Drosophila melanogaster*, 1998, Doctoral dissertation.

Fourrier A, Letenneur L, Bégaud B, Dartigues JF. Nonsteroidal antiinflammatory drug use and cognitive function in the elderly: inconclusive results from a population-based cohort study. *J Clin Epidemiol*. 1996 Oct;49(10):1201.

Fox NC, Warrington EK, Freeborough PA, Hartikainen P, Kennedy AM, Stevens JM, Rossor MN. Presymptomatic hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. A longitudinal MRI study. *Brain*. 1996 Dec;119 ( Pt 6):2001-7.

Frankenstein Z, Sperling J, Sperling R, Eisenstein M. A unique spatial arrangement of the snRNPs within the native spliceosome emerges from in silico studies. *Structure*. 2012 Jun 6;20(6):1097-106.

Fujimura K, Kano F, Murata M. Identification of PCBP2, a facilitator of IRES-mediated translation, as a novel constituent of stress granules and processing bodies. *RNA*. 2008 Mar;14(3):425-31.

Fujiwara M, Kamma H, Wu W, Hamasaki M, Kaneko S, Horiguchi H, Matsui-Horiguchi M, Satoh H. Expression and alternative splicing pattern of human telomerase reverse transcriptase in human lung cancer cells. *Int J Oncol*. 2004 Apr;24(4):925-30.

Fuller SC. ALZHEIMER'S DISEASE (SENIUM PRAECOX): THE REPORT OF A CASE AND REVIEW OF PUBLISHED CASES. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 39.08.1912;536-557.

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002 Jun 21;296(5576):2225-9.

Gauthier S, Reisberg B, Zaudig M, Petersen RC, Ritchie K, Broich K, Belleville S, Brodaty H, Bennett D, Chertkow H, Cummings JL, de Leon M, Feldman H, Ganguli M, Hampel H, Scheltens P, Tierney MC, Whitehouse P, Winblad B; International Psychogeriatric Association Expert Conference on mild cognitive impairment. Mild cognitive impairment. *Lancet*. 2006 Apr 15;367(9518):1262-70.

Gerbasi VR, Link AJ. The myotonic dystrophy type 2 protein ZNF9 is part of an ITAF complex that promotes cap-independent translation. *Mol Cell Proteomics*. 2007 Jun;6(6):1049-58.

Gerschütz A, Heinsen H, Grünblatt E, Wagner AK, Bartl J, Meissner C, Fallgatter AJ, Al-Sarraj S, Troakes C, Ferrer I, Arzberger T, Deckert J, Riederer P, Fischer M, Tatschner T, Monoranu CM. Neuron-specific mitochondrial DNA deletion levels in sporadic Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2013 Dec;10(10):1041-6.

Ghiso J, Frangione B. Amyloidosis and Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002 Dec 7;54(12):1539-51.

Giaccone G, Tagliavini F, Linoli G, Bouras C, Frigerio L, Frangione B, Bugiani O. Down patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques. *Neurosci Lett*. 1989 Feb 13;97(1-2):232-8.

Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 Aug 16;122(3):1131-5.

Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, Dreyfuss G. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* 2008 Jun 18;582(14):1977-86.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1991 Feb 21;349(6311):704-6.

Goedert M. Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 1993 Nov;16(11):460-5. Review.

Gómez-Isla T, Price JL, McKeel DW Jr, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 1996 Jul 15;16(14):4491-500.

Goodglass H, Kaplan E. Boston diagnostic aphasia examination booklet. Lea & Febiger, 1983.

Good PF, Werner P, Hsu A, Olanow CW, Perl DP. Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 1996 Jul;149(1):21-8.

Graff J, Cha J, Blyn LB, Ehrenfeld E. Interaction of poly(rC) binding protein 2 with the 5' noncoding region of hepatitis A virus RNA and its effects on translation. *J Virol*. 1998 Dec;72(12):9668-75.

Griffin WS, Sheng JG, Royston MC, Gentleman SM, McKenzie JE, Graham DI, Roberts GW, Mrak RE. Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol*. 1998 Jan;8(1):65-72.

Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL 3rd, Araoz C. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Oct;86(19):7611-5.

Grundke-Iqbali I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem*. 1986 May 5;261(13):6084-9.

Guthrie C, Patterson B. Spliceosomal snRNAs. *Annu Rev Genet*. 1988;22:387-419.

Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Feb;8(2):101-12.

Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, Lannfelt L, Selkoe DJ. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med*. 1995 Dec;1(12):1291-6.

Habelhah H, Shah K, Huang L, Ostareck-Lederer A, Burlingame AL, Shokat KM, Hentze MW, Ronai Z. ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nat Cell Biol.* 2001 Mar;3(3):325-30.

Haga S, Ikeda K, Sato M, Ishii T. Synthetic Alzheimer amyloid beta/A4 peptides enhance production of complement C3 component by cultured microglial cells. *Brain Res.* 1993 Jan 22;601(1-2):88-94.

Hamos JE, DeGennaro LJ, Drachman DA. Synaptic loss in Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology.* 1989 Mar;39(3):355-61.

Hampel H, Bürger K, Fuchsberger T, in Möller HJ, Laux G. *Psychiatrie, Psychosomatik, Psychotherapie*. Springer, 2011.

Han J, Li WM, Tang FM, Pu D, Chen WB. [Effects of hnRNP B1 on DNA-PK activity, cell cycle and apoptosis in human lung adenocarcinoma cell line A549]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2008 Sep;39(5):815-8.

Han W, Xin Z, Zhao Z, Bao W, Lin X, Yin B, Zhao J, Yuan J, Qiang B, Peng X. RNA-binding protein PCBP2 modulates glioma growth by regulating FHL3. *J Clin Invest.* 2013 May;123(5):2103-18.

Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1991 Oct;12(10):383-8.

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002 Jul 19;297(5580):353-6.

Harigaya Y, Shoji M, Kawarabayashi T, Kanai M, Nakamura T, Iizuka T, Igeta Y, Saido TC, Sahara N, Mori H, et al. Modified amyloid beta protein ending at 42 or 40 with different solubility accumulates in the brain of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Jun 26;211(3):1015-22.

Harold D, Abraham R, Hollingsworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan AR, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Love S, Kehoe PG, Hardy J, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schürmann B, Heun R, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wilfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Hüll M, Rujescu D, Goate AM, Kauwe JS, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühlleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel KH, Klopp N, Wichmann HE, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Holmans PA,

O'Donovan M, Owen MJ, Williams J. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2009 Oct;41(10):1088-93.

Helzner EP, Luchsinger JA, Scarneas N, Cosentino S, Brickman AM, Glymour MM, Stern Y. Contribution of vascular risk factors to the progression in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2009 Mar;66(3):343-8.

Heneka MT, O'Banion MK. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*. 2007 Mar;184(1-2):69-91.

Hinman MN, Lou H. Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Oct;65(20):3168-81.

Hirabayashi K, Ikeda K, Shimokawa K, Orthner H. [Cerebral degeneration in Down's syndrome]. *Folia Psychiatr Neurol Jpn*. 1979;33(1):81-96.

Hinney A, Albayrak O, Antel J, Volckmar AL, Sims R, Chapman J, Harold D, Gerrish A, Heid IM, Winkler TW, Scherag A, Wilfong J, Williams J, Hebebrand J; GERAD Consortium; IGAP Consortium; GIANT Consortium. Genetic variation at the CELF1 (CUGBP, elav-like family member 1 gene) locus is genome-wide associated with Alzheimer's disease and obesity. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2014 Jun;165B(4):283-93.

Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2001 May 1;21(9):3017-23.

Holland AJ, Oliver C. Down's syndrome and the links with Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995 Aug;59(2):111-4.

Holroyd S, Shepherd ML, Downs JH 3rd. Occipital atrophy is associated with visual hallucinations in Alzheimer's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2000 Winter;12(1):25-8.

Holtzman DM, Pitas RE, Kilbridge J, Nathan B, Mahley RW, Bu G, Schwartz AL. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in a central nervous system-derived neuronal cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Oct 10;92(21):9480-4.

Hu X, Pickering E, Liu YC, Hall S, Fournier H, Katz E, Dechairo B, John S, Van Eerdewegh P, Soares H; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Meta-analysis for genome-wide association study identifies multiple variants at the BIN1 locus associated with late-onset Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2011 Feb 24;6(2):e16616.

<http://www.deutsche-alzheimer.de>

<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>

Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*. 1984 Sep 14;225(4667):1168-70.

International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature*. 2003 Dec 18;426(6968):789-96.

Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet*. 2001 Nov;29(3):306-9.

Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso Adel C, Grundke-Iqbali I. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol*. 2009 Jul;118(1):53-69.

Isaacs B, Kennie AT. The Set test as an aid to the detection of dementia in old people. *Br J Psychiatry*. 1973 Oct;123(575):467-70.

Ishii T, Haga S. Immuno-electron microscopic localization of immunoglobulins in amyloid fibrils of senile plaques. *Acta Neuropathol*. 1976 Nov 15;36(3):243-9.

Ishikawa M, Mizukami K, Iwakiri M, Kamma H, Ikonomovic MD, Dekosky ST, Asada T. Immunohistochemical study of hnRNP B1 in the postmortem temporal cortices of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Res*. 2004 Dec;50(4):481-4.

Jahn T. Neuropsychologie der Demenz. Neuropsychologie psychischer Störungen. Springer Berlin Heidelberg, 2010. 347-381.

Jayadev S, Leverenz JB, Steinbart E, Stahl J, Klunk W, Yu CE, Bird TD. Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2. *Brain*. 2010 Apr;133(Pt 4):1143-54.

Jellinger KA, Attems J. Prevalence and impact of cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease and parkinsonism. *Acta Neurol Scand*. 2006 Jul;114(1):38-46.

Jobst KA, Barnetson LP, Shepstone BJ. Accurate prediction of histologically confirmed Alzheimer's disease and the differential diagnosis of dementia: the use of NINCDS-ADRDA and DSM-III-R criteria, SPECT, X-ray CT, and APO E4 medial temporal lobe dementias. The Oxford Project to Investigate Memory and Aging. *Int Psychogeriatr*. 1997;9 Suppl 1:191-222; discussion 247-52. Corrected and republished in: *Int Psychogeriatr*. 1998 Sep;10(3):271-302.

Johnston JA, Cowburn RF, Norgren S, Wiehager B, Venizelos N, Winblad B, Vigo-Pelfrey C, Schenk D, Lannfelt L, O'Neill C. Increased beta-amyloid release and levels of amyloid precursor protein (APP) in fibroblast cell lines from family members with the Swedish Alzheimer's disease APP670/671 mutation. *FEBS Lett.* 1994 Nov 14;354(3):274-8.

Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R. APP processing and synaptic function. *Neuron*. 2003 Mar 27;37(6):925-37.

Kamma H, Portman DS, Dreyfuss G. Cell type-specific expression of hnRNP proteins. *Exp Cell Res.* 1995 Nov;221(1):187-96.

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987 Feb 19-25;325(6106):733-6.

Kang JH, Grodstein F. Regular use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cognitive function in aging women. *Neurology*. 2003 May 27;60(10):1591-7.

Kashima T, Rao N, David CJ, Manley JL. hnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing. *Hum Mol Genet*. 2007 Dec 15;16(24):3149-59.

Kedersha N, Cho MR, Li W, Yacono PW, Chen S, Gilks N, Golan DE, Anderson P. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J Cell Biol*. 2000 Dec 11;151(6):1257-68.

Keene JD. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet*. 2007 Jul;8(7):533-43.

Kidd M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature*. 1963 Jan 12;197:192-3.

Kidd M, Allsop D, Landon M. Senile plaque amyloid, paired helical filaments, and cerebrovascular amyloid in Alzheimer's disease are all deposits of the same protein. *Lancet*. 1985 Feb 2;1(8423):278.

Kiledjian M, Wang X, Liebhaber SA. Identification of two KH domain proteins in the alpha-globin mRNP stability complex. *EMBO J*. 1995 Sep 1;14(17):4357-64.

Kiledjian M, Dreyfuss G. Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J*. 1992 Jul;11(7):2655-64.

Kim HJ, Kim NC, Wang YD, Scarborough EA, Moore J, Diaz Z, MacLea KS, Freibaum B, Li S, Molliex A, Kanagaraj AP, Carter R, Boylan KB, Wojtas AM, Rademakers R, Pinkus JL, Greenberg SA, Trojanowski JQ, Traynor BJ, Smith BN, Topp S, Gkazi AS, Miller J, Shaw CE, Kottlors M, Kirschner J, Pestronk A, Li YR, Ford AF, Gitler AD, Benatar M, King OD, Kimonis VE, Ross ED, Weihl CC, Shorter J, Taylor JP. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature*. 2013 Mar 28;495(7442):467-73.

Kitaguchi N, Takahashi Y, Tokushima Y, Shiojiri S, Ito H. Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature*. 1988 Feb 11;331(6156):530-2.

Koedam EL, Lauffer V, van der Vlies AE, van der Flier WM, Scheltens P, Pijnenburg YA. Early-versus late-onset Alzheimer's disease: more than age alone. *J Alzheimers Dis*. 2010;19(4):1401-8.

Kopan R, Goate A. Aph-2/Nicastrin: an essential component of gamma-secretase and regulator of Notch signaling and Presenilin localization. *Neuron*. 2002 Jan 31;33(3):321-4.

Kounnas MZ, Moir RD, Rebeck GW, Bush AI, Argraves WS, Tanzi RE, Hyman BT, Strickland DK. LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell*. 1995 Jul 28;82(2):331-40.

Kraepelin E. Psychiatrie: ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte. Leipzig, Johann Ambrosius Barth. 1910.

Kril JJ, Patel S, Harding AJ, Halliday GM. Neuron loss from the hippocampus of Alzheimer's disease exceeds extracellular neurofibrillary tangle formation. *Acta Neuropathol*. 2002 Apr;103(4):370-6.

Kume K, Hanyu H, Sato T, Hirao K, Shimizu S, Kanetaka H, Sakurai H, Iwamoto T. Vascular risk factors are associated with faster decline of Alzheimer disease: a longitudinal SPECT study. *J Neurol*. 2011 Jul;258(7):1295-303.

LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Jul;8(7):499-509.

Lamb BT, Sisodia SS, Lawler AM, Slunt HH, Kitt CA, Kearns WG, Pearson PL, Price DL, Gearhart JD. Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice [corrected]. *Nat Genet*. 1993 Sep;5(1):22-30. Erratum in: *Nat Genet* 1993 Nov;5(3):312.

Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, Letenneur L, Bettens K, Berr C, Pasquier F, Fiévet N, Barberger-Gateau P, Engelborghs S, De Deyn P, Mateo I, Franck A, Helisalmi S, Porcellini E, Hanon O; European Alzheimer's Disease Initiative Investigators, de Pancorbo MM, Lendon C, Dufouil C, Jaillard C,

Leveillard T, Alvarez V, Bosco P, Mancuso M, Panza F, Nacmias B, Bossù P, Piccardi P, Annoni G, Seripa D, Galimberti D, Hannequin D, Licastro F, Soininen H, Ritchie K, Blanché H, Dartigues JF, Tzourio C, Gut I, Van Broeckhoven C, Alpérovitch A, Lathrop M, Amouyel P. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2009 Oct;41(10):1094-9.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Cleo C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kaspryzk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korff I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ; International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860-921.

Lauderback CM, Kanski J, Hackett JM, Maeda N, Kindy MS, Butterfield DA. Apolipoprotein E modulates Alzheimer's Abeta(1-42)-induced oxidative damage to synaptosomes in an allele-specific manner. *Brain Res.* 2002 Jan 4;924(1):90-7.

Lebedeva S, Jens M, Theil K, Schwanhäusser B, Selbach M, Landthaler M, Rajewsky N. Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR. *Mol Cell.* 2011 Aug 5;43(3):340-52.

Le Ber I, Van Bortel I, Nicolas G, Bouya-Ahmed K, Camuzat A, Wallon D, De Septenville A, Latouche M, Lattante S, Kabashi E, Jornea L, Hannequin D, Brice A; French research Network on FTLD/FTLD-ALS. hnRNPA2B1 and hnRNPA1 mutations are rare in patients with "multisystem proteinopathy" and frontotemporal lobar degeneration phenotypes. *Neurobiol Aging.* 2014 Apr;35(4):934.e5-6.

Lautenschlager NT, and Förstl H. Primäre und sekundäre Demenzen. *Steinkopff*, 2003.

Lauter H. Die organischen Psychosyndrome. *Psychiatrie der Gegenwart* 6. Springer Berlin Heidelberg, 1988. 3-56.

Lee HG, Perry G, Moreira PI, Garrett MR, Liu Q, Zhu X, Takeda A, Nunomura A, Smith MA. Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends Mol Med.* 2005 Apr;11(4):164-9.

Leffers H, Dejgaard K, Celis JE. Characterisation of two major cellular poly(rC)-binding human proteins, each containing three K-homologous (KH) domains. *Eur J Biochem.* 1995 Jun 1;230(2):447-53.

Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kayed R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature.* 2006 Mar 16;440(7082):352-7.

Levine TD, Gao F, King PH, Andrews LG, Keene JD. Hel-N1: an autoimmune RNA-binding protein with specificity for 3' uridylate-rich untranslated regions of growth factor mRNAs. *Mol Cell Biol.* 1993 Jun;13(6):3494-504

Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science.* 1995 Aug 18;269(5226):973-7.

Liang Y, Shi SL, Li QF, Chen LY, Jing GJ, Tan GW, Wang SY, Wu FY. The localization of hnRNP A2/B1 in nuclear matrix and the aberrant expression during the RA-induced differentiation of human neuroblastoma SK-N-SH cells. *J Cell Biochem.* 2011 Jul;112(7):1722-9.

Licastro F, Pedrini S, Caputo L, Annoni G, Davis LJ, Ferri C, Casadei V, Grimaldi LM. Increased plasma levels of interleukin-1, interleukin-6 and alpha-1-antichymotrypsin in patients with Alzheimer's disease: peripheral inflammation or signals from the brain? *J Neuroimmunol.* 2000 Feb 1;103(1):97-102.

Licalosi DD, Darnell RB. RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. *Nat Rev Genet.* 2010 Jan;11(1):75-87.

Lindsay J, Laurin D, Verreault R, Hébert R, Helliwell B, Hill GB, McDowell I. Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Epidemiol.* 2002 Sep 1;156(5):445-53.

Liu WK, Ksiezak-Reding H, Yen SH. Abnormal tau proteins from Alzheimer's disease brains. Purification and amino acid analysis. *J Biol Chem.* 1991 Nov 15;266(32):21723-7.

Lowe SL, Bowen DM, Francis PT, Neary D. Ante mortem cerebral amino acid concentrations indicate selective degeneration of glutamate-enriched neurons in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 1990;38(3):571-7.

Lukong KE, Chang KW, Khandjian EW, Richard S. RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet.* 2008 Aug;24(8):416-25.

Lynch G, Baudry M. The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science.* 1984 Jun 8;224(4653):1057-63.

Lyness SA, Zarow C, Chui HC. Neuron loss in key cholinergic and aminergic nuclei in Alzheimer disease: a meta-analysis. *Neurobiol Aging.* 2003 Jan-Feb;24(1):1-23.

Magaki S, Yong WH, Khanlou N, Tung S, Vinters HV. Comorbidity in dementia: update of an ongoing autopsy study. *J Am Geriatr Soc.* 2014 Sep;62(9):1722-8.

Maggipinto M, Rabiner C, Kidd GJ, Hawkins AJ, Smith R, Barbaresi E. Increased expression of the MBP mRNA binding protein HnRNP A2 during oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci Res.* 2004 Mar 1;75(5):614-23.

Makeyev AV, Liebhaber SA. The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms. *RNA.* 2002 Mar;8(3):265-78.

Mancuso M, Orsucci D, Siciliano G, Murri L. Mitochondria, mitochondrial DNA and Alzheimer's disease. What comes first? *Curr Alzheimer Res.* 2008 Oct;5(5):457-68.

Manczak M, Calkins MJ, Reddy PH. Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet*. 2011 Jul 1;20(13):2495-509.

Mandal M, Vadlamudi R, Nguyen D, Wang RA, Costa L, Bagheri-Yarmand R, Mendelsohn J, Kumar R. Growth factors regulate heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K expression and function. *J Biol Chem*. 2001 Mar 30;276(13):9699-704.

Maragos WF, Greenamyre JT, Penney Jr JB, Young AB. Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis. *Trends Neurosci*. 1987;10(2), 65-68.

Markesberry WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(1):134-47.

Markesberry WR, Carney JM. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 1999 Jan;9(1):133-46.

Masliah E, Terry RD, DeTeresa RM, Hansen LA. Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease. *Neurosci Lett*. 1989 Aug 28;103(2):234-9.

Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K. Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J*. 1985 Nov;4(11):2757-63.

Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Jun;82(12):4245-9.

Matlin AJ, Clark F, Smith CW. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 May;6(5):386-98.

Matunis MJ, Michael WM, Dreyfuss G. Characterization and primary structure of the poly(C)-binding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K protein. *Mol Cell Biol*. 1992 Jan;12(1):164-71.

Mauger DM, Lin C, Garcia-Blanco MA. hnRNP H and hnRNP F complex with Fox2 to silence fibroblast growth factor receptor 2 exon IIIC. *Mol Cell Biol*. 2008 Sep;28(17):5403-19.

Mayeda A, Helfman DM, Krainer AR. Modulation of exon skipping and inclusion by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and pre-mRNA splicing factor SF2/ASF. *Mol Cell Biol*. 1993 May;13(5):2993-3001. Erratum in: *Mol Cell Biol* 1993 Jul;13(7):4458.

Mazumder B, Seshadri V, Fox PL. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci*. 2003 Feb;28(2):91-8.

McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, Hirschhorn JN. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet*. 2008 May;9(5):356-69.

McGeer PL, McGeer EG. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev*. 1995 Sep;21(2):195-218.

McGeer PL, Akiyama H, Itagaki S, McGeer EG. Activation of the classical complement pathway in brain tissue of Alzheimer patients. *Neurosci Lett*. 1989 Dec 15;107(1-3):341-6.

McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology*. 1996 Aug;47(2):425-32.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. 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*. 1984 Jul;34(7):939-44.

Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1994 Nov;36(5):747-51.

Miller OL Jr, Bakken AH. Morphological studies of transcription. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*. 1972;168:155-77.

Mizukami K, Ishikawa M, Iwakiri M, Ikonomovic MD, Dekosky ST, Kamma H, Asada T. Immunohistochemical study of the hnRNP A2 and B1 in the hippocampal formations of brains with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2005 Sep 30;386(2):111-5.

Moran-Jones K, Wayman L, Kennedy DD, Reddel RR, Sara S, Snee MJ, Smith R. hnRNP A2, a potential ssDNA/RNA molecular adapter at the telomere. *Nucleic Acids Res*. 2005 Jan 19;33(2):486-96.

Morris JC, Edland S, Clark C, Galasko D, Koss E, Mohs R, van Belle G, Fillenbaum G, Heyman A. The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part IV. Rates of cognitive change in the longitudinal assessment of probable Alzheimer's disease. *Neurology*. 1993 Dec;43(12):2457-65.

Morris JC, Heyman A, Mohs RC, Hughes JP, van Belle G, Fillenbaum G, Mellits ED, Clark C. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part I. Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1989 Sep;39(9):1159-65.

Morrison JH, Hof PR. Life and death of neurons in the aging brain. *Science*. 1997 Oct 17;278(5337):412-9.

Mukherjee N, Corcoran DL, Nusbaum JD, Reid DW, Georgiev S, Hafner M, Ascano M Jr, Tuschl T, Ohler U, Keene JD. Integrative regulatory mapping indicates that the RNA-binding protein HuR couples pre-mRNA processing and mRNA stability. *Mol Cell*. 2011 Aug 5;43(3):327-39.

Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*. 1992 Aug;1(5):345-7.

Mullan M, Houlden H, Windelspecht M, Fidani L, Lombardi C, Diaz P, Rossor M, Crook R, Hardy J, Duff K, et al. A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1-antichymotrypsin gene. *Nat Genet*. 1992 Dec;2(4):340-2.

Nabors LB, Gillespie GY, Harkins L, King PH. HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements within the 3' untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs. *Cancer Res*. 2001 Mar 1;61(5):2154-61.

Näslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum JD. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA*. 2000 Mar 22-29;283(12):1571-7.

Naj AN, Beecham GW, Slifer MA, Martin ER, Gallins PJ, Konidari I, Whitehead PL, Cai G, Kajiwara Y, Haroutunian V, Gwirtsman HE, Gilbert JR. Genome-wide association study validates associations in APOE, VDR, SORL1, WWC1, and ELavl4 and identifies novel candidate genes for late-onset Alzheimer's disease. *Alzheimers & Dementia*. 2009 Jan 5(4).

Neumann M, Kretzschmar HA. [Molecular neuropathology of Non-Alzheimer dementia]. *Pathologe*. 2008 Nov;29(6):434-41.

NCBI, Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. (dbSNP Build ID: {build ID}). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/Genecards>

Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W,

Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006 Oct 6;314(5796):130-3.

Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, Stenl C, Luthman J, Teplow DB, Younkin SG, Näslund J, Lannfelt L. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci*. 2001 Sep;4(9):887-93.

Noureddine MA, Qin XJ, Oliveira SA, Skelly TJ, van der Walt J, Hauser MA, Pericak-Vance MA, Vance JM, Li YJ. Association between the neuron-specific RNA-binding protein ELAVL4 and Parkinson disease. *Hum Genet*. 2005 Jun;117(1):27-33.

Nover L, Scharf KD, Neumann D. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol Cell Biol*. 1989 Mar;9(3):1298-308.

Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, Smith MA. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 1999 Mar 15;19(6):1959-64.

Okano HJ, Darnell RB. A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons. *J Neurosci*. 1997 May 1;17(9):3024-37.

Oreland L, Gottfries CG. Brain and brain monoamine oxidase in aging and in dementia of Alzheimer's type. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1986;10(3-5):533-40.

Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet*. 2008 Dec;40(12):1413-5.

Parker WD Jr, Filley CM, Parks JK. Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology*. 1990 Aug;40(8):1302-3.

Pascale A, Govoni S. The complex world of post-transcriptional mechanisms: is their deregulation a common link for diseases? Focus on ELAV-like RNA-binding proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2012 Feb;69(4):501-17.

Perrone-Bizzozero N, Bolognani F. Role of HuD and other RNA-binding proteins in neural development and plasticity. *J Neurosci Res*. 2002 Apr 15;68(2):121-6.

Perry G, Friedman R, Shaw G, Chau V. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 May;84(9):3033-6.

Perusini G. Über klinisch und histologisch eigenartige psychische Erkrankungen des späteren Lebensalters. *Histologische und histopathologische Arbeiten über die Gehirnrinde* 3. 1909;297-351.

Petersen RC, Roberts RO, Knopman DS, Boeve BF, Geda YE, Ivnik RJ, Smith GE, Jack CR Jr. Mild cognitive impairment: ten years later. *Arch Neurol.* 2009 Dec;66(12):1447-55.

Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW. In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.* 1991 Nov 1;563(1-2):311-4.

Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem.* 1995 Jan;64(1):253-65.

Pimplikar SW. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Jun;41(6):1261-8.

Pinel P. *Traité médico-philosophique sur laliénation mentale*. J. Ant. Brosson, 1809.  
Piñol-Roma S, Dreyfuss G. Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature.* 1992 Feb 20;355(6362):730-2.

Piscopo P, Marcon G, Piras MR, Crestini A, Campeggi LM, Deiana E, Cherchi R, Tanda F, Deplano A, Vanacore N, Tagliavini F, Pocchiari M, Giaccone G, Confalonieri A. A novel PSEN2 mutation associated with a peculiar phenotype. *Neurology.* 2008 Apr 22;70(17):1549-54.

Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretzschmar HA, Herms J. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci.* 2006 Jul 5;26(27):7212-21.

Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement.* 2013 Jan;9(1):63-75.e2.

Prince M, Rabe-Hesketh S, Brennan P. Do antiarthritic drugs decrease the risk for cognitive decline? An analysis based on data from the MRC treatment trial of hypertension in older adults. *Neurology.* 1998 Feb;50(2):374-9.

Prusiner SB. Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med.* 2001 May 17;344(20):1516-26.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 2007 Sep;81(3):559-75.

Quattrone A, Pascale A, Nogues X, Zhao W, Gusev P, Pacini A, Alkon DL. Posttranscriptional regulation of gene expression in learning by the neuronal ELAV-like mRNA-stabilizing proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 25;98(20):11668-73.

Query CC, Bentley RC, Keene JD. A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell*. 1989 Apr 7;57(1):89-101.

Raskind MA, Peskind ER, Halter JB, Jimerson DC. Norepinephrine and MHPG levels in CSF and plasma in Alzheimer's disease. *Arch Gen Psychiatry*. 1984 Apr;41(4):343-6.

Raux G, Guyant-Maréchal L, Martin C, Bou J, Penet C, Brice A, Hannequin D, Frebourg T, Campion D. Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease: an update. *J Med Genet*. 2005 Oct;42(10):793-5.

Raz N, Lindenberger U, Rodrigue KM, Kennedy KM, Head D, Williamson A, Dahle C, Gerstorf D, Acker JD. Regional brain changes in aging healthy adults: general trends, individual differences and modifiers. *Cereb Cortex*. 2005 Nov;15(11):1676-89.

Rebeck GW, Perls TT, West HL, Sodhi P, Lipsitz LA, Hyman BT. Reduced apolipoprotein epsilon 4 allele frequency in the oldest old Alzheimer's patients and cognitively normal individuals. *Neurology*. 1994 Aug;44(8):1513-6. Erratum in: *Neurology*. 1995 Mar;45(3 Pt 1):598.

Reddy PH. Amyloid beta, mitochondrial structural and functional dynamics in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 2009 Aug;218(2):286-92.

Redlich E. Über miliare Sklerose der Hirnrinde bei seniler Atrophie. *Jahrb Psychiat Neurol* 17 (1898): 208-216.

Reed R, Palandjian L. Spliceosome assembly. *Eukaryotic mRNA processing* 17 (1997):103.

Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L, Kalimo H, Paetau A, Abramzon Y, Remes AM, Kaganovich A, Scholz SW, Duckworth J, Ding J, Harmer DW, Hernandez DG, Johnson JO, Mok K, Ryten M, Trabzuni D, Guerreiro RJ, Orrell RW, Neal J, Murray A, Pearson J, Jansen IE, Sondergaard D, Seelaar H, Blake D, Young K, Halliwell N, Callister JB, Toulson G, Richardson A, Gerhard A, Snowden J, Mann D, Neary D, Nalls MA, Peuralinna T, Jansson L, Isoviita VM, Kaivorinne AL, Hölttä-Vuori M, Ikonen E, Sulkava R, Benatar M, Wuu J, Chiò A, Restagno G, Borghero G, Sabatelli M; ITALSGEN Consortium, Heckerman D, Rogeira E, Zinman L, Rothstein JD, Sendtner M, Drepper C, Eichler EE, Alkan C, Abdullaev Z, Pack SD, Dutra A, Pak E, Hardy J, Singleton A, Williams NM, Heutink P, Pickering-Brown S, Morris HR, Tienari PJ, Traynor BJ. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*. 2011 Oct 20;72(2):257-68.

Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*. 1995 Aug 31;376(6543):775-8.

Rogaeva E. The solved and unsolved mysteries of the genetics of early-onset Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*. 2002;2(1):1-10.

Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, Katayama T, Baldwin CT, Cheng R, Hasegawa H, Chen F, Shibata N, Lunetta KL, Pardossi-Piquard R, Bohm C, Wakutani Y, Cupples LA, Cuenco KT, Green RC, Pinessi L, Rainero I, Sorbi S, Bruni A, Duara R, Friedland RP, Inzelberg R, Hampe W, Bujo H, Song YQ, Andersen OM, Willnow TE, Graff-Radford N, Petersen RC, Dickson D, Der SD, Fraser PE, Schmitt-Ulms G, Younkin S, Mayeux R, Farrer LA, St George-Hyslop P. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet*. 2007 Feb;39(2):168-77.

Rogers J, Cooper NR, Webster S, Schultz J, McGeer PL, Styren SD, Civin WH, Brachova L, Bradt B, Ward P, et al. Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov 1;89(21):10016-20.

Rogers J, Kirby LC, Hempelman SR, Berry DL, McGeer PL, Kaszniak AW, Zalinski J, Cofield M, Mansukhani L, Willson P, et al. Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. *Neurology*. 1993 Aug;43(8):1609-11.

Rozemuller JM, Abbink JJ, Kamp AM, Stam FC, Hack CE, Eikelenboom P. Distribution pattern and functional state of alpha 1-antichymotrypsin in plaques and vascular amyloid in Alzheimer's disease. A immunohistochemical study with monoclonal antibodies against native and inactivated alpha 1-antichymotrypsin. *Acta Neuropathol*. 1991;82(3):200-7.

Sanan DA, Weisgraber KH, Russell SJ, Mahley RW, Huang D, Saunders A, Schmechel D, Wisniewski T, Frangione B, Roses AD, et al. Apolipoprotein E associates with beta amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils. Isoform apoE4 associates more efficiently than apoE3. *J Clin Invest*. 1994 Aug;94(2):860-9.

Sarteschi U. Contributo all'istologia patologica della presbiofrenia. *Riv Sper Freniatr* 35. 1909:464-84.

Sasaki H, Muramoto O, Kanazawa I, Arai H, Kosaka K, Iizuka R. Regional distribution of amino acid transmitters in postmortem brains of presenile and senile dementia of Alzheimer type. *Ann Neurol*. 1986 Mar;19(3):263-9.

Satoh H, Kamma H, Ishikawa H, Horiguchi H, Fujiwara M, Yamashita YT, Ohtsuka M, Sekizawa K. Expression of hnRNP A2/B1 proteins in human cancer cell lines. *Int J Oncol*. 2000 Apr;16(4):763-7.

Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. 1993 Aug;43(8):1467-72.

Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 2006 Oct;27(10):1372-84.

Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonycastle L, Weber JL, Alonso ME, et al. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science*. 1992 Oct 23;258(5082):668-71.

Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*. 1996 Aug;2(8):864-70.

Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Oct 15;90(20):9649-53.

Schramm M, Falkai P, Pietsch T, Neidt I, Egensperger R, Bayer TA. Neural expression profile of Elav-like genes in human brain. *Clin Neuropathol*. 1999 Jan-Feb;18(1):17-22.

Seelen M, Visser AE, Overste DJ, Kim HJ, Palud A, Wong TH, van Swieten JC, Scheltens P, Voermans NC, Baas F, de Jong JM, van der Kooi AJ, de Visser M, Veldink JH, Taylor JP, Van Es MA, van den Berg LH. No mutations in hnRNPA1 and hnRNPA2B1 in Dutch patients with amyotrophic lateral sclerosis, frontotemporal dementia, and inclusion body myopathy. *Neurobiol Aging*. 2014 Aug;35(8):1956.e9-1956.e11.

Selkoe DJ. The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*. 1998 Nov;8(11):447-53.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 2002 Oct 25;298(5594):789-91.

Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee G, Fritz LC, Oltersdorf T. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Oct;85(19):7341-5.

Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA, DeStefano AL, Gudnason V, Boada M, Bis JC, Smith AV, Carassquillo MM, Lambert JC, Harold D, Schrijvers EM, Ramirez-Lorca R, Debette S, Longstreth WT Jr, Janssens AC, Pankratz VS, Dartigues JF, Hollingworth P, Aspelund T, Hernandez I, Beiser A, Kuller LH, Koudstaal PJ, Dickson DW, Tzourio C, Abraham R, Antunez C, Du Y, Rotter JI, Aulchenko YS, Harris TB, Petersen RC, Berr C, Owen MJ, Lopez-Arrieta J, Varadarajan BN, Becker JT, Rivadeneira F, Nalls MA, Graff-Radford NR, Campion D, Auerbach S, Rice K, Hofman A, Jonsson PV, Schmidt H, Lathrop M, Mosley TH, Au R, Psaty BM, Uitterlinden AG, Farrer LA, Lumley T, Ruiz A, Williams J, Amouyel P, Younkin SG, Wolf PA, Launer LJ, Lopez OL, van Duijn CM, Breteler MM; CHARGE Consortium; GERAD1 Consortium; EADI1 Consortium. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA*. 2010 May 12;303(18):1832-40.

Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*. 2008 Aug;14(8):837-42.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Perkicak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995 Jun 29;375(6534):754-60.

Shulman JM, Imboywa S, Giagtzoglou N, Powers MP, Hu Y, Devenport D, Chipendo P, Chibnik LB, Diamond A, Perrimon N, Brown NH, De Jager PL, Feany MB. Functional screening in *Drosophila* identifies Alzheimer's disease susceptibility genes and implicates Tau-mediated mechanisms. *Hum Mol Genet*. 2014 Feb 15;23(4):870-7.

Siomi H, Matunis MJ, Michael WM, Dreyfuss G. The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res*. 1993 Mar 11;21(5):1193-8.

Smith CW, Valcárcel J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci*. 2000 Aug;25(8):381-8.

Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jul 26;1502(1):139-44.

Snow AD, Sekiguchi RT, Nochlin D, Kalaria RN, Kimata K. Heparan sulfate proteoglycan in diffuse plaques of hippocampus but not of cerebellum in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol*. 1994 Feb;144(2):337-47.

Stern Y. Cognitive reserve and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2006 Apr-Jun;20(2):112-7.

Stewart WF, Kawas C, Corrada M, Metter EJ. Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology*. 1997 Mar;48(3):626-32.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, Huang DY, Pericak-Vance M, Schmechel D, Roses AD. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Nov 8;91(23):11183-6.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Mar 1;90(5):1977-81.

Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Goedert M, Saunders AM, Huang D, Corder EH, Dong LM, Jakes R, Alberts MJ, Gilbert JR, et al. Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype. *Exp Neurol*. 1994 Feb;125(2):163-71.

Stumm C, Hiebel C, Hanstein R, Purrio M, Nagel H, Conrad A, Lutz B, Behl C, Clement AB. Cannabinoid receptor 1 deficiency in a mouse model of Alzheimer's disease leads to enhanced cognitive impairment despite of a reduction in amyloid deposition. *Neurobiol Aging*. 2013 Nov;34(11):2574-84.

Sun YX, Minthon L, Wallmark A, Warkentin S, Blennow K, Janciauskiene S. Inflammatory markers in matched plasma and cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2003;16(3):136-44.

Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L Jr, Eckman C, Golde TE, Younkin SG. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*. 1994 May 27;264(5163):1336-40.

Sleegers K, Roks G, Theuns J, Aulchenko YS, Rademakers R, Cruts M, van Gool WA, Van Broeckhoven C, Heutink P, Oostra BA, van Swieten JC, van Duijn CM. Familial clustering and genetic risk for dementia in a genetically isolated Dutch population. *Brain*. 2004 Jul;127(Pt 7):1641-9.

Spies PE, Verbeek MM, Sjogren MJ, de Leeuw FE, Claassen JA. Alzheimer biomarkers and clinical Alzheimer disease were not associated with increased cerebrovascular disease in a memory clinic population. *Curr Alzheimer Res*. 2014 Jan;11(1):40-6.

Tanaka S, Nakamura S, Ueda K, Kameyama M, Shiojiri S, Takahashi Y, Kitaguchi N, Ito H. Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988 Dec 15;157(2):472-9.

Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet.* 1996 Aug 17;348(9025):429-32.

Tang YH, Han SP, Kassahn KS, Skarszewski A, Rothnagel JA, Smith R. Complex evolutionary relationships among four classes of modular RNA-binding splicing regulators in eukaryotes: the hnRNP, SR, ELAV-like and CELF proteins. *J Mol Evol.* 2012 Dec;75(5-6):214-28.

Tanzi RE, McClatchey AI, Lamperti ED, Villa-Komaroff L, Gusella JF, Neve RL. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature.* 1988 Feb 11;331(6156):528-30.

Tarkowski E, Blennow K, Wallin A, Tarkowski A. Intracerebral production of tumor necrosis factor-alpha, a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia. *J Clin Immunol.* 1999 Jul;19(4):223-30.

Thalmann B, Monsch AU. CERAD. The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease. Neuropsychologische Testbatterie. *Memory Clinic Basel, Basel.* 1997.

Terry RD. The fine structure of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1963 Oct;22:629-42.

Terry RD, Gonatas NK, Weiss M. Ultrastructural studies in Alzheimer's presenile dementia. *Am J Pathol.* 1964 Feb;44:269-97.

Terry RD, Hansen LA, DeTeresa R, Davies P, Tobias H, Katzman R. Senile dementia of the Alzheimer type without neocortical neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1987 May;46(3):262-8.

Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol.* 1991 Oct;30(4):572-80.

Tocco G, Maren S, Shors TJ, Baudry M, Thompson RF. Long-term potentiation is associated with increased [<sup>3</sup>H]AMPA binding in rat hippocampus. *Brain Res.* 1992 Feb 28;573(2):228-34.

Tockman MS, Mulshine JL, Piantadosi S, Erozan YS, Gupta PK, Ruckdeschel JC, Taylor PR, Zhukov T, Zhou WH, Qiao YL, Yao SX. Prospective detection of preclinical lung cancer: results from two

studies of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 overexpression. *Clin Cancer Res.* 1997 Dec;3(12 Pt 1):2237-46.

Tondelli M, Bedin R, Chiari A, Molinari MA, Bonifacio G, Lelli N, Trenti T, Nichelli P. Role of cerebrospinal fluid biomarkers to predict conversion to dementia in patients with mild cognitive impairment: a clinical cohort study. *Clin Chem Lab Med.* 2014 Oct 2.

van der Houven van Oordt W, Diaz-Meco MT, Lozano J, Krainer AR, Moscat J, Cáceres JF. The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation. *J Cell Biol.* 2000 Apr 17;149(2):307-16.

Varadarajan S, Yatin S, Aksanova M, Butterfield DA. Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol.* 2000 Jun;130(2-3):184-208.

Villa C, Fenoglio C, De Riz M, Clerici F, Marcone A, Benussi L, Ghidoni R, Gallone S, Cortini F, Serpente M, Cantoni C, Fumagalli G, Martinelli Boneschi F, Cappa S, Binetti G, Franceschi M, Rainero I, Giordana MT, Mariani C, Bresolin N, Scarpini E, Galimberti D. Role of hnRNP-A1 and miR-590-3p in neuronal death: genetics and expression analysis in patients with Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Rejuvenation Res.* 2011 Jun;14(3):275-81.

Visa N, Alzhanova-Ericsson AT, Sun X, Kiseleva E, Björkroth B, Wurtz T, Daneholt B. A pre-mRNA-binding protein accompanies the RNA from the gene through the nuclear pores and into polysomes. *Cell.* 1996 Jan 26;84(2):253-64.

Vogels OJ, Broere CA, ter Laak HJ, ten Donkelaar HJ, Nieuwenhuys R, Schulte BP. Cell loss and shrinkage in the nucleus basalis Meynert complex in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1990 Jan-Feb;11(1):3-13.

von Braunmühl HJ, Weber W. Einführung in die angewandte Akustik. *Verlag von S. Hirzel,* 1936.

Wakamatsu Y, Weston JA. Sequential expression and role of Hu RNA-binding proteins during neurogenesis. *Development.* 1997 Sep;124(17):3449-60.

Walsh DM, Selkoe DJ. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem.* 2007 Jun;101(5):1172-84.

Wang JZ, Gong CX, Zaidi T, Grundke-Iqbali I, Iqbal K. Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B. *J Biol Chem.* 1995 Mar 3;270(9):4854-60.

Welsh K, Butters N, Hughes J, Mohs R, Heyman A. Detection of abnormal memory decline in mild cases of Alzheimer's disease using CERAD neuropsychological measures. *Arch Neurol.* 1991 Mar;48(3):278-81.

West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet.* 1994 Sep 17;344(8925):769-72.

Weyerer S, Bickel H. *Epidemiologie psychischer Erkrankungen im höheren Lebensalter.* Vol. 764. W. Kohlhammer Verlag, 2007.

Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR. Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol.* 1981 Aug;10(2):122-6.

Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science.* 1982 Mar 5;215(4537):1237-9.

Will CL, Lührmann R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol.* 2001 Jun;13(3):290-301.

Wiśniewski HM, Terry RD. Morphology of the aging brain, human and animal. *Prog Brain Res.* 1973;40(0):167-86.

Wisniewski KE, Wisniewski HM, Wen GY. Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann Neurol.* 1985 Mar;17(3):278-82.

Wisniewski T, Golabek A, Matsubara E, Ghiso J, Frangione B. Apolipoprotein E: binding to soluble Alzheimer's beta-amyloid. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Apr 30;192(2):359-65.

Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Jun;83(11):4040-3. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986 Dec;83(24):9773.

[www.aging.senate.gov/reports/rpt2012.pdf](http://www.aging.senate.gov/reports/rpt2012.pdf), (2011). Report of the Special Committee on Aging United States Senate Resolution Authorizing a Study of the Problems of Aged and Aging

[www.molgen.ua.ac.be/ADmutations](http://www.molgen.ua.ac.be/ADmutations)

Yankner BA. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron.* 1996 May;16(5):921-32.

Yen SH, Liu WK, Hall FL, Yan SD, Stern D, Dickson DW. Alzheimer neurofibrillary lesions: molecular nature and potential roles of different components. *Neurobiol Aging*. 1995 May-Jun;16(3):381-7.

You F, Sun H, Zhou X, Sun W, Liang S, Zhai Z, Jiang Z. PCBP2 mediates degradation of the adaptor MAVS via the HECT ubiquitin ligase AIP4. *Nat Immunol*. 2009 Dec;10(12):1300-8.

Zaudig M. The Prodromes and Early Detection of Alzheimer's Disease. *Early Detection and Management of Mental Disorders* 2005:277-294.

Zech VF, Dlaska M, Tzankov A, Hilbe W. Prognostic and diagnostic relevance of hnRNP A2/B1, hnRNP B1 and S100 A2 in non-small cell lung cancer. *Cancer Detect Prev*. 2006;30(5):395-402.

Zhou J, Allred DC, Avis I, Martínez A, Vos MD, Smith L, Treston AM, Mulshine JL. Differential expression of the early lung cancer detection marker, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2/B1 (hnRNP-A2/B1) in normal breast and neoplastic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2001 Apr;66(3):217-24.

## **9 Danksagung**

Allen voran möchte ich mich bei den Demenz-Patienten der LMU München bedanken, deren Geschichten mich sehr berührten und zum Weitermachen motivieren.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dan Rujescu, der die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte. Mit ihm sei der gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Ina Giegling gedankt.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Annette Hartmann, die sowohl im klinischen Alltag, als auch bei der Erstellung dieser Arbeit eine große Stütze war und meine Fragen mit viel Geduld beantwortete. Für die Unterstützung mit der statistischen Auswertung sei Bettina Konte herzlichst gedankt.

Ein inniger Dank geht an Jörg, der mich immer unterstützt und an mich glaubt.

Zutiefst dankbar bin ich Christina, Elisabeth und Kathrin, ohne die vieles nicht vorstellbar war und die mir auch in mageren Zeiten mit viel Geduld und Energie zur Seite gestanden haben. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Marika, Markus, Simon und Sebastian für ihre Freundschaft und ihre Anregungen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, ohne sie wäre ich heute nicht hier. Großer Dank geht an meine Mutter, die mich immer unterstützt und an Carmen, die immer an mich glaubt.

Meiner lieben Lia sei herzlichst gedankt für unser erstes spannendes Jahrzehnt, das mich mehr gelehrt hat als eine Dissertation je könnte.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Barbara Plagg, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Einfluss genetischer Variationen RNA-bindender Proteine auf die Alzheimer Demenz und relevante kognitive Endophänotypen**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 01.02.2016